



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Generación de Microquimerismo Prenatal para
Donantes en Xenotrasplante

Dña. Juana María Abellaneda Cuadrado
2016



Universidad de Murcia

Generación de microquimerismo prenatal para donantes en xenotrasplante

JUANA MARÍA ABELLANEDA CUADRADO

2016

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dedicar la finalización de esta Tesis Doctoral a todas aquellas personas que me han acompañado y facilitado su apoyo, consejo y ánimo a lo largo de este proceso, sin las cuales no hubiera sido posible lograr este objetivo.

De forma muy especial quiero dar las gracias al Dr. Guillermo Ramis Vidal, Director de esta Tesis, por haber trabajado conmigo todo el tiempo necesario con una entrega y dedicación absoluta, supo trasmitirme su ilusión para despertar en mí el "gusanito" de la investigación, además de ofrecerme lo más importante, su amistad.

Al Dr. Francisco Pallarés, Co-director de esta Tesis, por las valiosas aportaciones realizadas para mejorar este proyecto, por su disponibilidad y colaboración en este trabajo.

A mis compañeros, Juanma, Aida, Livia, Laura y Juanjo, algunos de los cuales ya han emprendido otros caminos y con quienes he compartido los mejores y peores momentos de estos años, debo agradecerles que a pesar de lo difícil del camino han conseguido que sólo las risas acompañen nuestro trabajo diario.

A todos los que estuvieron vinculados de alguna manera a este proyecto, técnicos de Laboratorio, alumnos de Veterinaria como a los que han contribuido en el estudio de forma externa, por su colaboración.

A mis padres, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de la vida, hayan sido buenas o malas, y especialmente por enseñarme a luchar por lo que

quiero y a terminar lo que he empezado. Sin ellos nunca habría terminado esta Tesis Doctoral.

A mis hermanas, por prestarme toda su ayuda incondicional no solo en este proyecto sino en todas las etapas de mi vida.

A Salva por estar ahí apoyándome y saber entenderme en mis buenos y malos momentos.

A Martín, mi ilusión, que ha llegado a mi vida con el final de la Tesis. Gracias

ÍNDICE

I. INTRODUCCION	9
1.1. Estado del arte sobre trasplante	11
1.1.1. Trasplante hepático (TH)	12
1.2- . Xenotrasplante	17
1.2.1. Definición de xenotrasplante	17
1.2.2. Historia del xenotrasplante	20
1.2.3. Animales idóneos para xenotrasplante	21
1.2.4. Barreras en xenotrasplantes	23
1.2.4.1. Barreras inmunológicas	23
1.2.4.2. Barrera infecciosa	27
1.2.4.3. Barrera fisiológica	31
1.2.5. Estrategias para superar las barreras al xenotrasplante	33
1.2.5.1. Manipulación del receptor	34
1.2.5.2. Manipulación del donante	35
1.2.5.3. Animales transgénicos	37
1.2.6 Estado actual del xenotrasplante	39
1.3. Tolerancia inmunológica	42
1.3.1. Prevención del rechazo celular	42
1.3.2. Tolerancia células B y células T	44
1.3.2.1. Células T	44
1.3.2.2. Células B	45
1.3.3. Quimerismo y tolerancia	47
1.3.4. Inducción de quimerismo mixto	51
II. Objetivos	57
III. Material y métodos	63
3.1. Generación de microquimerismo prenatal in útero	65
3.1.1. Cerdas	65
3.1.2. Células	66
3.1.2.1. Aislamiento y cultivo de células	66
3.1.2.2. Aislamiento, cultivo y expansión de MMO	67
3.1.2.3. Aislamiento de MCU	69
3.1.2.4. Aislamiento de células CD34+ procedentes de cordón umbilical	70
3.1.3. Técnica ecográfica	71
3.1.3.1. Preparación celular	71
3.1.3.2. Evaluación del efecto citotóxico del contraste ecográfico SONOVUE® mediante análisis de perfil de impedancia usando un sistema RTCA xCELLigence	71
3.1.3.3. Preparación de las cerdas objeto de inyección celular	74
3.1.3.4. Procedimiento de inyección celular en útero	74
3.2. Registro de rendimientos reproductivos	77
3.3. Detección de lechones quiméricos	78
3.3.1. Toma de muestras	78
3.3.1.1. Muestras de Sangre	78
3.3.1.2. Muestras de tejidos	79
3.3.2. Puesta a punto de una PCR en tiempo real para el gen Alu Yb8	80
3.3.2.1. Extracción de ADN	80
3.3.2.2 Amplificación por PCR para el gen humano Alu	81
3.3.2.3 Muestras analizadas	82

3.3.2.4. Secuenciación del producto de PCR.....	83
3.3.3. Citometría de Flujo.....	83
3.3.4. Inmunocitoquímica.....	85
3.3.4.1. Fijación.....	85
3.3.4.2. Procesado histológico	85
3.3.4.3. Obtención de cortes.....	85
3.3.4.4. Técnica Inmunohistoquímica	85
3.3.5. ELISA para la detección de albúmina humana	87
3.3.5.1. Muestras analizadas.....	87
3.3.5.2. Procedimiento.....	88
3.4. Pruebas de compatibilidad <i>in vitro</i>	90
3.4.1. Toma de muestras.....	90
3.4.2. Hemólisis clásica.....	91
3.4.2.1. APA clásica.....	91
3.4.2.2.- APA clásica comparando hematíes tomados a los 15 días y a los dos meses de vida..	93
3.4.3. Hemólisis mediante xCELLigence® RTCA. Validación del sistema.....	93
3.4.3.1. Animales.....	94
3.4.1.2. APA mediante RTCA.....	94
3.4. Análisis estadístico	96
IV. RESULTADOS	99
4.1. RESULTADOS DE LA INYECCIÓN CELULAR EN ÚTERO	101
4.1.1. Evaluación del efecto citotóxico del contraste ecográfico SONOVUE® mediante análisis de perfil de impedancia usando un sistema RTCA xcelligence	101
4.1.2. Resultados ecográficos.....	111
4.1.2.1. Inyecciones negativas.....	111
4.1.2.2. Inyecciones positivas.....	112
4.1.3. Resultados reproductivos.....	114
4.1.3.1. Datos productivos	119
4.2. DETECCIÓN DE LECHONES QUIMÉRICOS	120
4.2.1. Citometría de flujo para identificación de células HLA I A, B o C.....	120
4.2.1.1. Citometría de flujo para identificación de células HLA I A, B o C a los lechones nacidos vivos a los 15 días de edad	120
4.2.1.1. Citometría de flujo para identificación de células HLA I A, B o C a los lechones nacidos vivos a los dos meses de edad	125
4.2.1.2. Citometría de flujo para identificación de células HLA I A, B o C a los 2 meses de edad.....	126
4.2.2. Determinación de la presencia del gen Alu-Yb8 humano	129
4.2.2.1. Evaluación de la PCR cuantitativa para el gen Alu-Yb8 humano.....	129
4.2.2.2. Determinación del gen Alu Ib8 humano en tejido de animales muertos perinatalmente y en lactación.....	139
4.2.2.3. Determinación de la presencia del gen Alu Yb8 humano en tejidos y sangre	142
4.2.2.4. Correlación entre la presencia de células sanguíneas microquiméricas y la presencia del gen Alu en tejidos.....	149
4.2.3. Inmunocitoquímica sobre tejidos	154
4.2.4. Resultados técnica ELISA para la detección de albúmina humana	157
4.3. Determinación de compatibilidad <i>in vitro</i>	158
4.3.1 Tipado ABO de los cerdos y primates	158
4.3.2. Hemólisis mediada por anticuerpos y complemento mediante sistema RTCA xCELLigence.....	159
4.3.2.1. Validación del método	159
4.3.2 .2. Perfil de impedancia de los animales quiméricos control	164

4.3.2.3. Hemólisis mediada por anticuerpos y complemento medida con RTCA	166
4.3.3. Hemólisis mediada por anticuerpos y complementos mediante el método clásico (APA).....	169
4.3.3.1. Hemólisis media obtenida mediante APA.....	169
4.3.3.2. APA clásicas comparando la primera extracción sanguínea con la segunda	174
4.3.3.3. Correlación hemólisis clásica vs RTCA.....	178
4.4. Relación entre los distintos parámetros analizados	180
4.4.1. Correlación entre las hemólisis clásicas y la CF.....	180
4.4.2. Correlación entre las hemólisis RTCA y la CF	180
4.4.3. Correlación entre las hemólisis clásicas y la determinación de Alu-Y8.....	181
4.4.4. Correlación entre las hemólisis RTCA y la determinación de Alu-Y8	181
V. CONCLUSIONES	185
VI. RESUMEN	189
VII. SUMMARY	195
VIII. ABREVIATURAS	201
IX. BIBLIOGRAFÍA	207

I. INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCION

1.1- Estado del arte sobre trasplante

El trasplante es uno de los grandes logros de la medicina del siglo XX, habiéndose incorporado a la rutina terapéutica en un número cada vez mayor de centros en los países desarrollados. Ello ha sido posible gracias a una selección de los receptores más rigurosa, a una mejor técnica quirúrgica y anestésica, a los mejores cuidados postoperatorios y al desarrollo de la Inmunología y de la Farmacoterapia, con la aparición de nuevos y más potentes medicamentos inmunosupresores, antibacterianos, antivíricos y antimicóticos (López-Navidad *et al.*, 1997).

El trasplante se puede clasificar 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) Autotrasplante, el donante y el receptor son el mismo individuo;
- 2) Isotrasplante o trasplante singénico, el donante y el receptor son genéticamente idénticos (por ejemplo, gemelos monocigóticos);
- 3) Alotrasplante u homotrasplante, el donante y el receptor no están genéticamente relacionados, pero pertenecen a la misma especie; y
- 4) 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 *et al.*, 1997).

1.1.1- Trasplante hepático (TH)

El trasplante de hígado se considera actualmente la terapéutica para distintas enfermedades hepáticas agudas irreversibles y crónicas.

El primer trasplante hepático exitoso fue realizado por Thomas Starzl en 1963, aunque la sobrevida fue muy limitada, y no fue hasta la década de los ochenta cuando se incrementó al 60% de supervivencia al primer año postrasplante. Desde este momento, adelantos en la preservación de órganos, el manejo transoperatorio, la experiencia en la técnica quirúrgica, el desarrollo de inmunosupresores nuevos y más seguros, así como el reconocimiento y tratamiento oportuno de las complicaciones, permitieron que la sobrevida mejorara aún más, declarándose en 1983 que el TH dejaba de ser un procedimiento experimental para convertirse en una modalidad terapéutica.

Desde entonces este procedimiento se realiza en múltiples centros a nivel mundial con sobrevidas, en aquellos que cuentan con gran experiencia, de 85-90% a un año y del 60-70% a los 5 años (Contreras *et al.*, 2003). El TH, hoy día, no sólo es una de las alternativas terapéuticas plenamente consolidadas, sino que además se está convirtiendo en uno de los principales tipos de trasplante que se realizan en el mundo, y de forma especial en nuestro país.

Cada año se realizan en el mundo más de 22.500 trasplantes hepáticos, lo que hace que la actividad de los equipos españoles de trasplante hepático suponga el 5,4% de la actividad en el mundo, hecho de gran relevancia teniendo en cuenta que la población española representa apenas el 0,7% de la población mundial.

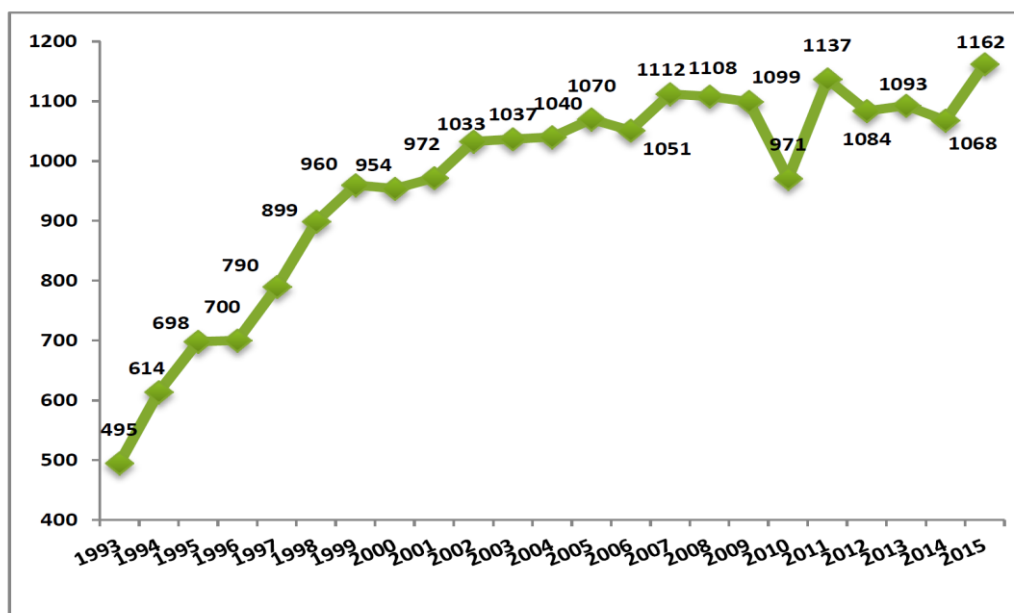


Figura 1. Trasplante hepático. Actividad en España. 1993-2014 (Fuente: Memoria de Actividad de Trasplante hepático 2015, ONT).

Un total de 1.162 trasplantes hepáticos se realizaron en territorio español durante el año 2015 (Figura 1). Esto supone una tasa de 24,9 trasplantes por millón de habitantes (Figura 2), lo que sitúa a España entre las máximas registradas a nivel internacional junto con Bélgica (23,6), Portugal (19,1) o Estados Unidos (20,9), aunque en estos dos primeros países la actividad trasplantadora hepática disminuyó en este año con respecto al 2014 y en España se incrementó.

En el año 2015 hubo en España 1851 donantes de órganos. Esta actividad de donación

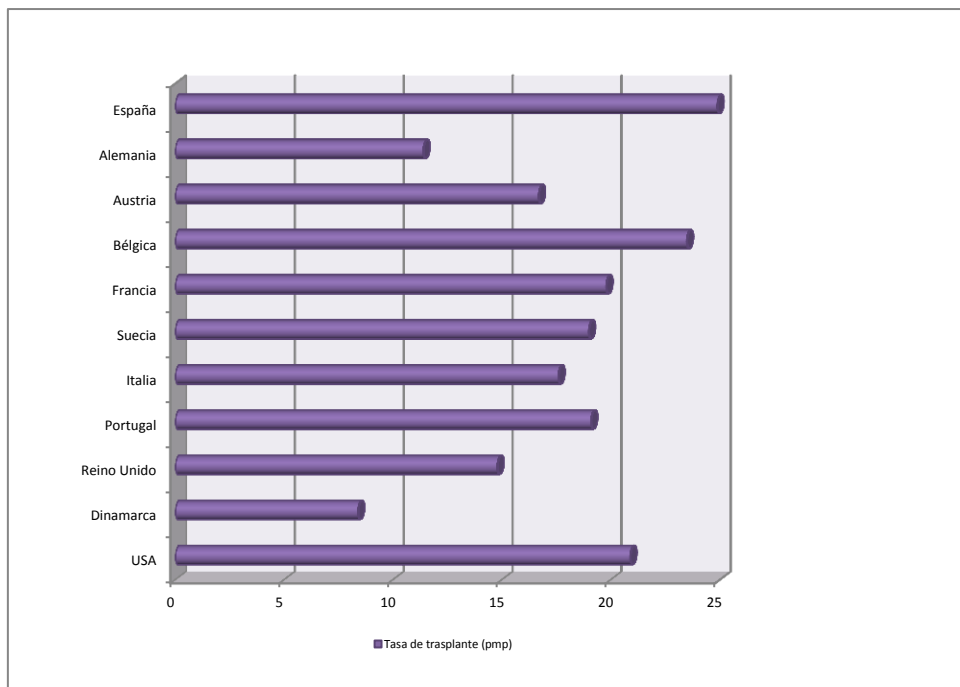


Figura 2. Tasa de trasplante hepático en diferentes países año 2015. (Fuente: Memoria de Actividad de Trasplante hepático 2015, ONT).

(sumada a la procedente de donantes vivos) permitió la realización de un total de 4.769 trasplantes de órganos sólidos: 2.905 trasplantes renales, 1.162 THs, 299 trasplantes cardíacos, 294 trasplantes pulmonares, 97 trasplantes de páncreas y 12 trasplantes intestinales (Figuras 3 y 4).

El TH constituye el segundo trasplante más realizado en España, después del trasplante renal. En este último año han aumentado todos los tipos de trasplantes, especialmente el de pulmón (19,7%) y el de páncreas (10,8%).

A pesar de que España es el país del mundo con mayor tasa de donación, el desequilibrio entre la escasez de órganos disponibles y la ingente demanda de éstos ha conllevado que se generen listas de espera prolongadas, pese al crecimiento generalizado de la actividad trasplantadora

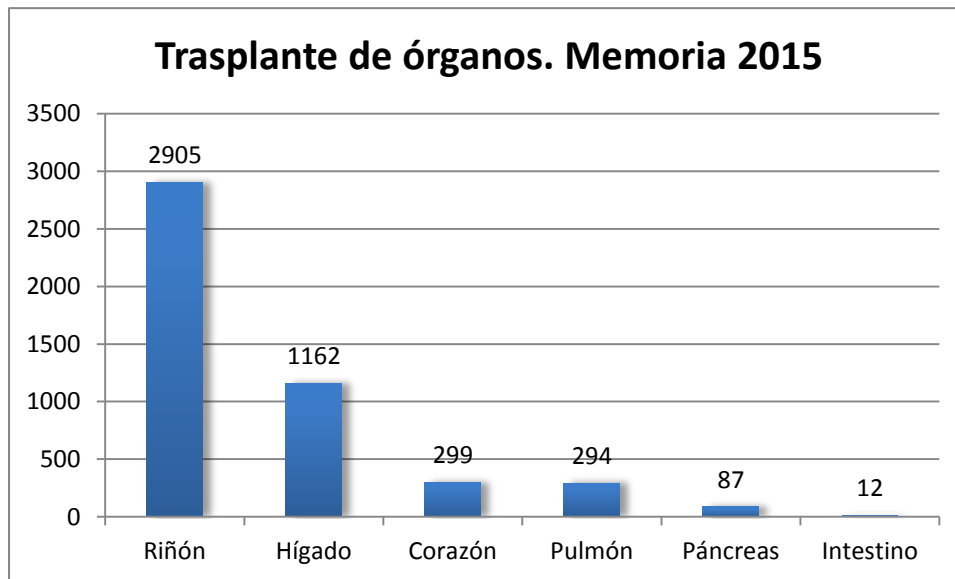


Figura 3. Trasplantes realizados en España en el año 2015. (Fuente: Memoria de Actividad de Trasplante hepático 2015, ONT)

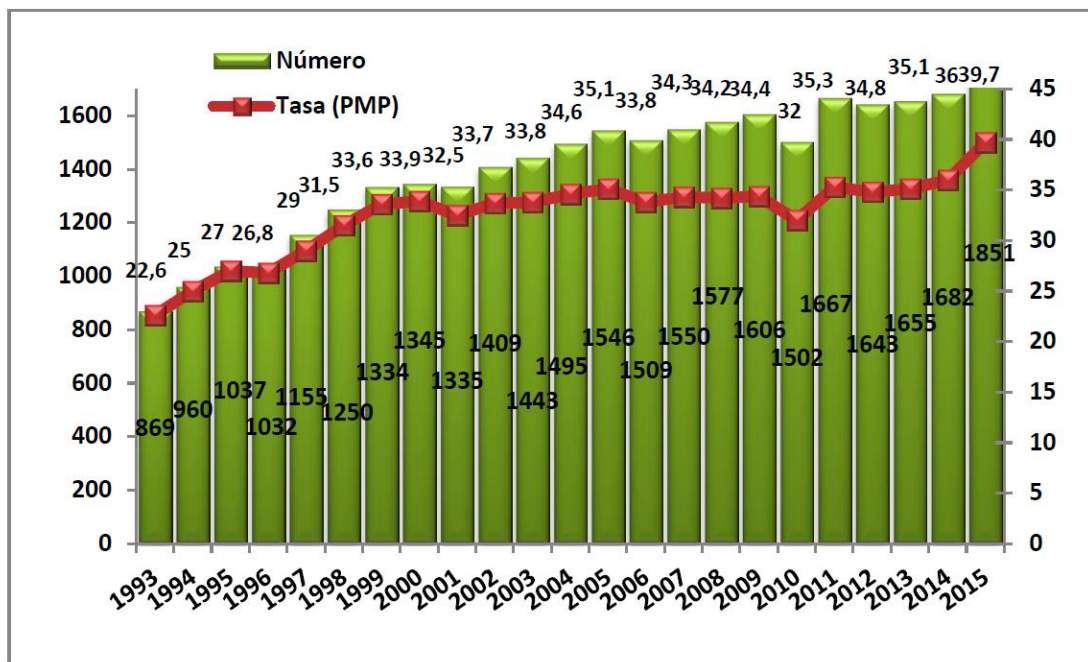


Figura 4. Número Total de donantes de órganos y tasa por millón de población. España 1993-2015.

(Fuente: Memoria de Actividad de Trasplante hepático 2015, ONT).

Tras establecer la indicación de TH, transcurre un periodo de tiempo con consecuencias potenciales que incluyen mortalidad en lista de espera (Figura 5), exclusión de la lista por agravamiento y peor supervivencia tras el trasplante. Durante el año 2015, el tiempo medio de estancia en lista de espera ha sido de 148,7 días, lo que significa un incremento de casi 15 días con respecto al años anterior.

La reducción de la mortalidad que clásicamente ha sido clave para la donación de órganos (mortalidad por tráfico y por enfermedad cerebrovascular), unida a cambios en la atención al paciente crítico en general y neurocrítico en particular, está determinando un descenso progresivo en la potencialidad de donación en muerte encefálica en nuestro país

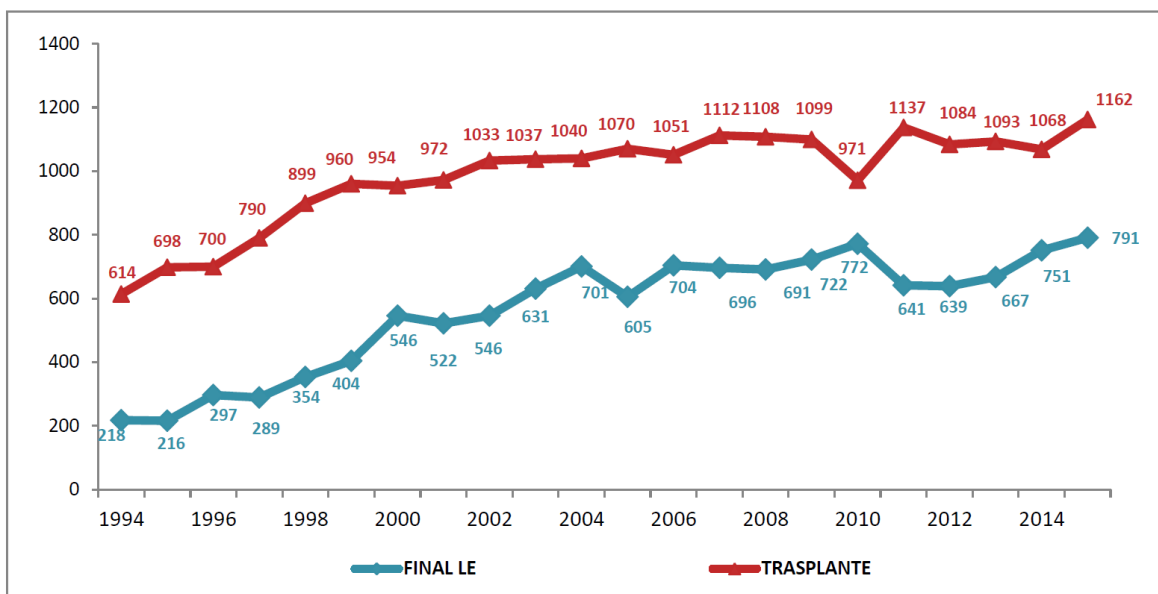


Figura 5. Evolución lista de espera para trasplantes de hígado 1993-2015. (Fuente: Memoria de Actividad de Trasplante hepático 2015, ONT).

De lo anterior se deriva la necesidad de desarrollar fuentes alternativas a la donación de órganos de personas en muerte encefálica. En concreto, la donación en asistolia, la donación en vivo y el xenotrasplante.

La donación en asistolia (DA), en creciente expansión en diversos países de nuestro entorno y en España, se vislumbra como una estrategia imprescindible a la hora de asegurar la disponibilidad de órganos para trasplante. La terminología aplicada a la DA en el mundo anglosajón ha ido evolucionando a lo largo de los años, siendo actualmente reconocido el término 'Donation after the Circulatory Determination of Death' como el más apropiado, si bien todavía coexiste con otros términos.

El motivo que subyace a la selección de la denominación antes mencionada como la más adecuada es el reconocimiento de que el fallecimiento de la persona no viene determinado por la pérdida irreversible de la función cardíaca, sino por la pérdida irreversible de la función circulatoria y respiratoria.

La clasificación de Maastricht sigue siendo ampliamente utilizada en el ámbito internacional para categorizar los donantes en asistolia. Sin embargo, en nuestro país es reconocido que tal clasificación no capta con precisión y claridad la realidad del tipo de DA llevada a cabo en España de manera mayoritaria. Por todo lo anterior, se ha considerado necesario consensuar la clasificación de los donantes en asistolia, aclarando las categorías Maastricht y adaptando dicha clasificación, de manera que se adecúe a la realidad y la experiencia de nuestro país. La clasificación de Maastricht modificada (Madrid 2011) se presenta en la Tabla 1.

Dado que la DA mayoritaria en España es aquella que se produce en personas fallecidas tras considerarse infructuosas las maniobras de reanimación cardiopulmonar (RCP) aplicadas, se ha considerado apropiado incluir a todos estos donantes en la categoría II.

Tabla 1: Clasificación de Maastricht modificada (Madrid 2011). (Fuente: Donación en Asistolia en España: Situación actual y Recomendaciones. Documento de Consenso Nacional 2012).

DONACIÓN EN ASISTOLIA CONTROLADA		DONACIÓN EN ASISTOLIA NO CONTROLADA	
Fallecido fuera del hospital	Resucitación infructuosa	A la espera del paro cardíaco	Paro cardíaco en muerte encefálica
CATEGORÍA I	CATEGORÍA II	CATEGORÍA III	CATEGORÍA IV
Incluye víctimas de una muerte súbita, traumática o no, acontecida fuera del hospital que, por razones obvias, no son resucitadas.	<p>Incluye pacientes que sufren una parada cardíaca y son sometidos a maniobras de reanimación que resultan no exitosas. En esta categoría se diferencian dos subcategorías:</p> <p>II.a. Extrahospitalaria</p> <p>La parada cardíaca ocurre en el ámbito extrahospitalario y es atendida por el servicio de emergencias extrahospitalario, quien traslada al paciente al hospital con maniobras de cardio-compresión y soporte ventilatorio.</p> <p>II.b. Intrahospitalaria</p> <p>La parada cardíaca ocurre en el ámbito intrahospitalario, siendo presenciada por el personal sanitario, con inicio inmediato de maniobras de reanimación.</p>	Incluye pacientes a los que se aplica limitación del tratamiento de soporte vital, tras el acuerdo entre el equipo sanitario y éste con los familiares o representantes del enfermo.	Incluye pacientes que sufren una parada cardíaca mientras se establece el diagnóstico de muerte encefálica o después de haber establecido dicho diagnóstico, pero antes de que sean llevados a quirófano. Es probable que primero se trate de restablecer la actividad cardíaca, pero, cuando no se consigue, puede modificarse el proceso al de donación en asistolia

El TH de donante vivo se inició para solucionar la falta de donantes apropiados para niños, lo que motivaba una mortalidad en lista de espera del 30-40% (Broelsch *et al.*, 1994; Jurim *et al.*, 1995; Emond *et al.*, 1996; Heffron *et al.*, 1996; Otte *et al.*, 1996; Bucuvalas *et al.*, 1999). El primer trasplante con éxito de este tipo se realizó en Australia (Strong *et al.*, 1990), y la primera experiencia piloto en Chicago por Broelsch (Singer *et al.*, 1989). Sin embargo, el trasplante hepático infantil a partir de donante vivo se ha desarrollado principalmente en Japón debido a las peculiares características culturales de este país, donde no se admitía la muerte cerebral como indicativa del fallecimiento del individuo.

La donación en vivo en la edad infantil no sólo permitió iniciar programas de trasplantes en los países asiáticos y reducir ostensiblemente la mortalidad en la lista de espera en los programas occidentales, sino también el desarrollo de técnicas de división de hígado de donante cadáver, de tal forma que un mismo hígado era útil para una persona adulta y una en edad infantil (Malago *et al.*, 1997).

El éxito del TH de donante vivo en niños provocó interés para su aplicación en pacientes adultos. El primer TH de donante vivo (THDV) en adultos se realizó en noviembre de 1993 por el Grupo de Shinshu (Hashikura *et al.*, 1994).

La posibilidad de esta alternativa se fue contemplando con mayor intensidad a medida que se resolvieron aspectos como el cálculo del volumen hepático la cantidad mínima de parénquima necesario en el receptor en función del peso, el procedimiento y la técnica quirúrgica segura tanto en el donante como en el receptor (Bak *et al.*, 2001).

1.2.- Xenotrasplante

1.2.1- Definición de xenotrasplante

Según la Food and Drug Administration (FDA), se entiende por ``xenotrasplante`` cualquier procedimiento que implique el trasplante, implante o infusión en receptores humanos de células, tejidos u órganos procedentes de animales no humanos, aunque el concepto se puede extender a cualquier especie que reciba un injerto de otra especie diferente

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 anticuerpos preformados o naturales en el receptor frente al donante, por ejemplo, el 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 anticuerpos 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 (Samstsein y Platt, 2001).

Al igual que el alotrasplante, el xenotrasplante se puede definir como ortotópico y heterotópico, dependiendo de si el órgano se implanta en su región topográfica natural o no.

1.2.2.- Historia del xenotrasplante

El uso de animales (mamíferos) como fuente de órganos y tejidos para su posterior trasplante a personas no es una idea nueva (Grant *et al.*, 2001). Los intentos iniciales, en la era moderna, datan de 1906, año en que Faboulay conectó el riñón de un cerdo al pliegue del codo de un ser humano, con fracaso al tercer día (Faboulay *et al.*, 1906). Posteriormente, Unger y Neuhof (Unger *et al.*, 1908; Neuhof *et al.*, 1923) lo intentaron con riñones de cabra y oveja. El poco éxito obtenido con los mismos frenó el desarrollo de más estudios y retardó su avance durante décadas (Samstein *et al.*, 2001). A principios de 1960 se desarrolló la inmunosupresión farmacológica con el uso de azatioprina, actinomicina-C y corticoides, antes y después del trasplante en combinación con irradiación local del órgano, lo que permitió que los alotrasplantes renales mejoraran la supervivencia, logrando la consolidación y el éxito de los programas clínicos de alotrasplante.

Reemtsma realizó 12 xenotrasplantes renales de chimpancés con supervivencias de los pacientes desde 11 días hasta 2 meses (Reemtsma *et al.*, 1964). Un paciente con supervivencia de casi 9 meses falleció por trastornos electrolíticos sin presentar rechazo. A lo largo del año 1964, Starzl llevó a cabo una segunda serie de xenotrasplantes, también renales, haciendo uso esta vez de una especie de primate diferente, el babuino. Los resultados fueron muy parecidos a los obtenidos por

Reemtsma, con la diferencia de que esta vez la máxima supervivencia que presentó uno de los trasplantes fue tan solo de 60 días y la mayoría de los receptores presentaron graves complicaciones infecciosas en respuesta a la fuerte inmunosupresión recibida.

Hardy en este mismo año realizó el primer xenotrasplante de corazón de chimpancé con fracaso a las 2 horas por incompatibilidad anatómica (Hardy *et al.*, 1964). Los intentos posteriores tuvieron, asimismo, fracasos inmediatos con rechazo de injerto (Ross *et al.*, 1968; Marion *et al.*, 1969; Barnard *et al.*, 1977), la mayoría por rechazo vascular. Posteriormente, Bailey y colaboradores (1984) realizaron un trasplante de corazón de mandril en un recién nacido que duró 20 días. En 1992 Religa (Czaplicki *et al.*, 1992) trasplantó un corazón de cerdo con funcionamiento únicamente de 24 horas.

El xenotrasplante hepático tiene un nombre propio: Thomas Starzl. Realizó 3 trasplantes de hígado de chimpancé en humanos entre 1966 y 1974 con función entre 1 y 14 días, y en 2 casos con mínimas lesiones en el hígado trasplantado. En 1992 y 1993 utilizando hígados de mandril realizó dos trasplantes hepáticos con supervivencias de 70 y 26 días, respectivamente (Starzl *et al.*, 1993; Starzl *et al.*, 1994). En ambos casos con pocas evidencias de rechazo, aunque probablemente, con excesiva inmunosupresión. Finalmente, Makowa en 1993 utilizó, como trasplante puente hasta la consecución de un donante humano apropiado en una situación crítica, el hígado de cerdo con supervivencia de 30 horas (Makowa *et al.*, 1993).

1.2.3- Animales idóneos para xenotrasplante

Es lógico el hecho de que la mayoría de las diversas experiencias clínicas hayan utilizado diferentes especies de primates como donantes por las similitudes anatómicas, fisiológicas y cercanía filogenética de estos animales con los humanos, lo que hacía suponer que el rechazo inmunológico no sería tan importante. 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, y además existen problemas importantes de índole biológico y también ético (Calne *et al.*, 1968; Calne *et al.*, 1970; Daar *et al.*, 1997; Ramírez *et al.*, 2000; Ekser *et al.*, 2010). Una especie alternativa para el trasplante sería el cerdo que, aunque está más alejada filogenéticamente, tiene ventajas como la facilidad de manejo en cautividad, la rápida y eficaz reproducción y que además presenta similitudes anatómicas y fisiológicas con los humanos (Yang *et al.*, 2007).

El cerdo, es por lo tanto aquel animal que cumple muchos de los requisitos necesarios y un amplio potencial como donante de órganos. Se trata de un animal que pertenece a una especie relativamente baja en el árbol filogenético, y que es usado habitualmente como fuente de alimentación para el hombre, se reproduce en camadas numerosas, es fácil de alimentar y crece rápido. La mayoría de grupos de investigación en xenotrasplante están de acuerdo en que la fuente ideal son los órganos de cerdos modificados genéticamente para evitar el rechazo (Caplan *et al.*; 1969; White *et al.*, 1996; Cowan *et al.*, 2011).

1.2.4- Barreras en xenotrasplantes

A la hora de considerar al cerdo como posible fuente de órganos para los humanos existen tres importantes barreras que hay que superar (Ekser *et al.*, 2010).

1.2.4.1-Barreras inmunológicas

El rechazo de los órganos de cerdo en primates humanos y no humanos puede ser **hiperagudo (RHA)**, **vascular agudo (RVA)**, también denominado xenogénico tardío, y el **celular o 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 en días más tarde, el celular comienza en días o meses y se convierte en crónico en meses o años. Además de diferentes tiempos de supervivencia del injerto, estos tipos de rechazo también implican distintas lesiones histológicas y mecanismos inmunológicos.

Después de la revascularización del injerto, el **RHA** se inicia por la unión de anticuerpos 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 complejo de ataque de membrana (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 (Pruit *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 (Ramírez *et al.*, 1999).

En condiciones generales, el complemento es activado de una forma incontrolada y las proteínas reguladoras del complemento (CRP) 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. En el xenotrasplante cerdo-primate las CRP de las células endoteliales del cerdo no pueden inhibir la activación del complemento humano debido a la diferencia en la estructura molecular (Fodor *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 *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 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 *et al.*, 2000). Este sacárido se encuentra presente en las células de todos los mamíferos inferiores y monos del Nuevo Mundo (Catarrinos), en los que sustituye a los azúcares responsables de los grupos ABO, ya que poseen una enzima, la α 1-3 galactosiltransferasa, 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 anticuerpos naturales contra α Gal (Acs anti- α Gal).

Los antígenos α Gal no son una población homogénea (Mckane *et al.*, 1998) sino que engloban diferentes tipos de azúcares en forma de disacárido, trisacáridos tipo 2 y tipo 6 mayoritariamente, 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. 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; y que si el gen $\alpha(1-3)$ 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 *et al.*, 1999).

El control del RHA ha permitido conocer otro tipo de xenorechazo no presente en los trasplantes alogénicos, denominado **RVA** retardado o rechazo xenogénico tardío. Su fisiopatología no se conoce con exactitud. Este tipo de rechazo se da días después de la realización del xenotrasplante. A nivel histopatológico se observan depósitos de xenoAcs, complemento y fibrina en el endotelio, también se observa trombosis vascular, incluso con la administración de tratamiento inmunosupresor. Esto sugiere que la inmunidad humoral juega un papel importante en el RVA, aunque hay discrepancias en la bibliografía, ya que hay autores que creen que el componente humoral y el celular (macrófagos y células Natural Killer o NK, básicamente) tienen el mismo nivel de implicación (Platt *et al.*, 1998; Rodríguez-Gago *et al.*, 2001).

Se han utilizado diferentes estrategias para controlar el RVA, sin embargo, como se considera que los anticuerpos que participan en este tipo de rechazo no son solo los α Gal, tendrían que suprimirse todos los xenoAcs que se cree que pueden participar en

el proceso. También se ha intentado modificar la molécula activadora de los monocitos o transferir moléculas inhibitoras de las células NK. Sin embargo, ha tenido que utilizarse una terapia inmunosupresora tan potente y a tan elevadas dosis que ha provocado la muerte del animal receptor (primates, en los ensayos preclínicos), como consecuencia directa por la toxicidad de los fármacos o indirecta por las infecciones derivadas (Cozzi *et al.*, 2000; Schmelzle *et al.*, 2010; Cowan *et al.*, 2011).

La activación de la coagulación está presente tanto en el RHA como en el RVA. Se cree que esta activación se debe al depósito de xenoAcs en las células endoteliales, sin embargo, no se puede descartar que, independientemente del depósito de anticuerpos en los vasos y del complemento, se dé dicha activación de la coagulación.

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 anticuerpos, aunque el nivel de xenoAcs se restablezca al nivel original en 1-3 semanas después de eliminarlos antes del xenotrasplante (Lin *et al.*, 2000). Después de que se produzca la acomodación, se puede producir **rechazo mediado por células**, en el que participarán tanto células NK como 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 el observado en alotrasplante (Sachs *et al.*, 1995). Hasta ahora no se ha observado la existencia del rechazo crónico en xenotrasplante hepático cerdo-primate, debido posiblemente a que los receptores no sobreviven el suficiente tiempo para que se produzca (Ahn *et al.*, 2004).

Como consecuencia de la supervivencia durante algunos meses de monos trasplantados con riñones transgénicos, ha sido posible observar fenómenos de rechazo celular e incluso de rechazo crónico en estos injertos. Dicha supervivencia ha ofrecido información muy valiosa en el camino hacia la realidad clínica de los xenotrasplantes (Powelson *et al.*, 1994).

1.2.4.2-Barrera infecciosa

Los riesgos potenciales más importantes del xenotrasplante son las infecciones, la transmisión de zoonosis a la especie humana ('xenosis' o 'xenozoonosis'), lo cual también ha generado cierto rechazo social (Ríos *et al.*, 2007; Martínez-Alarcón *et al.*, 2011). Existen 2 tipos de infecciones que potencialmente se podrían transmitir: *a)* las producidas por los gérmenes específicos porcinos, y *b)* las que utilizarían el órgano porcino como vector (retrovirus porcinos):

a) 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, *Toxoplasma gondii*), aquellos microorganismos similares a otros que causan infecciones en el alotrasplante (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.

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 animales SPF (Specific Pathogen Free) minimizaría el riesgo de transmisión tanto de las zoonosis clásicas como de las posibles xenozoosis transmitidas por el xenotrasplante (Muñoz *et al.*, 1999; Fishman *et al.*, 2000). Para ello, es necesario disponer de instalaciones de bioseguridad (grado P3) y tener experiencia en técnicas de obtención de lechones por histerectomía y nutrición artificial.

b) Con la producción de animales SPF, 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 porcinos (PERV) (Patience *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 *et al.*, 2002).

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 han demostrado tener la capacidad de infectar células humanas *in vitro* (Patience *et al.*, 1997). Esta capacidad de infección de ambos tipos de PERV también se ha evidenciado *in vivo*, en un modelo de ratón completamente inmunocompetente (SCID mouse) a los que se les trasplantó islotes pancreáticos porcinos (Deng *et al.*, 2000; Van der laan *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 *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 *et al.*, 2003). Tampoco se ha observado en humanos la 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 (Paridis *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.

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 *et al.*, 2002).

Además, 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 *et al.*, 2003). Otros estudios con ratones SCID confirman los resultados previos mostrando que los Acs anti- α Gal que contienen el suero humano pueden inhibir la infección de las células humanas por PERV *in vivo* (Mckane *et al.*, 2003).

Los cerdos normales expresan de forma natural 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 anticuerpos naturales dirigidos contra éstos (Mckane *et al.*, 2003). Sin embargo, en cerdos *knockout* Gal^{-/-}/Gal^{-/-} esto no sucede (Korsgren *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 un riesgo asociado a los cerdos *knockout* como donantes para xenotrasplantes a humanos (Kurihara *et al.*, 2003) y que el uso de tejidos de estos cerdos podría estar asociado con un aumento del riesgo de transmisión de PERV. Mazurek *et al.* (2013) apoyaron la idea de que la selección de animales para la donación de órganos con número bajo de copias para PERV limitan el riesgo de transmisión a los receptores.

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, el posible impacto de los retrovirus xenozoonóticos 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 (Quereda *et al.*, 2012).

1.2.4.3- Barrera fisiológica

La última barrera a superar sería la fisiológica. Aunque se logran 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. Está bien establecido que algunas proteínas xenogénicas, como la insulina, pueden funcionar correctamente en el humano, pero 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 los 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. Sin embargo, en el caso del corazón, se produjeron algunos fallecimientos por arritmias y bajo gasto cardiaco (Schmoeckel *et al.*, 1998). El xenotrasplante de riñón de cerdo en macacos ha demostrado que funciona hasta 35 días (Zaidi *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 xenotrasplante de 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 *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 (Starzl *et al.*, 1994). Se deben realizar estudios de ingeniería genética para evitar estas barreras (Bucher *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, a que existe un riesgo potencial de transmisión de infecciones, aunque poco probable, 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 haya sido menor de lo esperado y que su paso a la clínica pueda suponer la existencia de muchas más complicaciones que las existentes en el alotrasplante. Se propuso por ello que el xenotrasplante se utilizara sólo como tránsito al alotrasplante hasta que se encontrara el órgano necesario (Ekser *et al.*, 2012).

1.2.5- Estrategias para superar las barreras al xenotrasplante

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, además de utilizarse inmunosupresores farmacológicos que ayuden a minimizar el rechazo, al igual que se hace en alotrasplante.

1.2.5.1- Manipulación del receptor

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, donde los anticuerpos quedaban absorbidos por las células de los tejidos ajenos (Terman *et al.*, 1979).

Otro método utilizado fue el Intercambio plasmático mediante plasmaféresis por el cual parte de los anticuerpos del plasma eran eliminados: en el modelo de trasplante renal de cerdo-babuino se consiguió eliminar los Acs α Gal y prolongar la funcionalidad de órgano hasta 22 días en el que aparecía RVA. Sin embargo, tanto este método como el anterior sólo lograron la disminución transitoria de los Acs y existía un incremento del riesgo de infección, debido a la agammaglobulemia y la manipulación (Alexandre *et al.*, 1989).

El procedimiento de absorción de anticuerpos o inmunoadsorción extracorpórea (EIA) también ha sido utilizado 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 anticuerpos, con las que se obtuvieron modestos resultados (Palmer *et al.*, 1989) por la predisposición a las complicaciones por infecciones derivadas de la agammaglobulinemia, y b) utilizando matrices con oligosacáridos dirigidos a eliminar específicamente anticuerpos 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, se eliminaron la mayoría de los xenoAcs citotóxicos de cerdo de sueros humanos que no habían sido expuestos a antígenos porcinos (Xu *et al.*, 1998; McKane *et al.*, 1998).

Sin embargo, a pesar de que con este método se prolongaba la supervivencia y los animales sufrían menos RVA, estos morían por complicaciones relacionadas con la EIA (Richards *et al.*, 2002); por lo que se deben mejorar las técnicas de EIA y reducir la mortalidad y morbilidad en primates no humanos (Lin *et al.*, 1998; Watts *et al.*, 2000). El efecto de esta técnica aumentaba si se combinaba con una esplenectomía y terapia

con inmunosupresores. También se pueden eliminar los xenoAcs con una inyección intravenosa de carbohidratos usando anticuerpos anti-idiotipo (Simon *et al.*, 1998).

1.2.5.2-Manipulación del donante

La presencia de anticuerpos naturales contra el epítipo α Gal, junto con la alta densidad de residuos α Gal en la mayoría de las células porcinas (Tanemura *et al.*, 2000), sugiere que la eliminación de la actividad galactosiltransferasa podría proporcionar un método práctico para superar tanto el RHA como el RVA y el daño crónico del tejido asociado a la unión del anticuerpo a este epítipo. En base a esta premisa, y tras la obtención de cerdos clonados (Polejaeva *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 *et al.*, 2004). Los cerdos $\text{Gal}^{-/-}$ generados no expresan α Gal en ninguno de los tejidos testados, 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, usando un protocolo dirigido a la inducción de tolerancia mediada por células T al trasplantar conjuntamente tejido del timo vascularizado del donante (Yamada *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* $\text{Gal}^{-/-}$ 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 *et al.*, 2005).

Los últimos resultados publicados en este modelo utilizando cerdos «*knock-out*» para el gen de la α -1-3 galactosiltransferasa con una menor expresión de α -Gal no ha superado la sobrevivencia de 8 días registrada como máximo hasta la actualidad (Ramírez *et al.*, 2013).

Existen diversas estrategias para intentar bloquear la activación del complemento, entre las que está la eliminación del complemento del suero. Dicho elemento puede agotarse con drogas, como el factor de veneno de cobra (CVF), aumentando con esta práctica la supervivencia del injerto en modelos de ratas-primates y cerdos-primates (Leventhal *et al.*, 1993; Glasgow *et al.*, 2006).

También, la administración de reguladores del complemento, que 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). El único inhibidor fisiológico del primer paso en la activación del complemento es el factor inhibidor de C1, la sobreexpresión de este inhibidor se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que previene el rechazo hiperagudo en el xenoinjerto (Dalmasso *et al.*, 1993; Hecker *et al.*, 2002).

1.2.5.3- Animales transgénicos

Se han diseñado diversas estrategias para la obtención de donantes mediante transgénesis. La más utilizada ha sido la generación de cerdos transgénicos para proteínas reguladoras de complemento humano (hCRP). Las CRP no solubles son específicas de especie y por lo tanto sólo son activas frente al complemento de la especie que las expresa. Como consecuencia el RHA se produce, al menos en parte, por la incapacidad de las CRP, 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 hCRP como CD59, *Decay Accelerating Factor* (DAF) y *proteína cofactor de membrana* (MCP), tanto de forma individual como combinadas entre ellas.

El trasplante de órganos de cerdos transgénicos para las hCRP ha permitido evitar el RHA en el trasplante de cerdo a primates no humanos, pero los órganos son rechazados después de un periodo de tiempo variable por RVA (Schuurman *et al.*, 2003). En el caso de xenotrasplantes a babuinos de corazones de cerdos transgénicos para las hCRP expresadas individualmente se han logrado supervivencias de hasta 3 meses utilizando cerdos que expresan hMCP (McGregor *et al.*, 2005) y de hasta 29 días con cerdos transgénicos para hDAF, solos o en combinación con inmunoadsorciones (Brandl *et al.*, 2005). 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 *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 sólo sobreviven unas pocas horas (Sánchez *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 comparando los resultados con los obtenidos de órganos porcinos normales tanto para xenotrasplante de corazón como de riñón (Kroshus *et al.*, 1996).

La experiencia en xenotrasplante hepático con cerdos transgénicos de la Unidad de Investigación en Trasplantes del Hospital Virgen de la Arrixaca (Ramírez *et al.*, 2000), pionera a nivel mundial, ha demostrado en el modelo de cerdo transgénico hDAF a babuino que el hígado porcino sintetiza factores de coagulación funcionalmente compatibles con el primate, proporcionando una hemostasia normal al babuino al menos durante 8 días. Además, los monos trasplantados con estos hígados transgénicos se mantienen despiertos, conscientes y con alimentación oral durante este período

Cuando se utilizan animales que expresan combinaciones de varias CRP, 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 *et al.*, 2000). Por el contrario, se ha observado 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 *et al.*, 2000; Ashton-

Chess *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 *et al.*, 2005). En 2009, un estudio donde se utilizaron cerdos GTKO y GTKO/CD46 como donantes en xenotrasplantes por primera vez, proporcionó nuevos datos, sugiriendo que después de este xenotrasplante algunos parámetros de la actividad hepática funcionaban adecuadamente, aunque no así los factores de coagulación (Ekser *et al.*, 2010).

1.2.6- Estado actual del xenotrasplante

El hígado es el sitio principal para la síntesis y la producción de muchas proteínas, incluyendo los factores de coagulación, y desempeña un papel importante en la desintoxicación y coagulación de la sangre (Castalino *et al.*, 1997). Cuando se produce una insuficiencia hepática los pacientes sufren cada vez más encefalopatías y coagulopatías, que pueden ser peligrosas para la vida (Lee *et al.*, 2008). Cuando el tratamiento médico convencional resulta escaso para la insuficiencia hepática aguda una opción urgente sería el trasplante de hígado.

El xenotrasplante de hígado de cerdo es una opción potencial como puente al alotrasplante (Ekser *et al.*, 2009), por lo que la mayoría de grupos de investigación en xenotrasplante están de acuerdo en que la fuente ideal serían los órganos de cerdos modificados genéticamente para evitar el rechazo (White *et al.*, 1996; Caplan *et al.*, 1999; Cowan *et al.*, 2011). Se ha conseguido prevenir el RHA a través del trasplante preclínico de hígados de cerdos transgénicos para h-DAF (Ramírez *et al.*, 2000) y se ha

observado que además de prevenir este rechazo, el hígado porcino es capaz de sintetizar factores de coagulación funcionalmente compatibles con el primate, proporcionando una hemostasia normal al babuino al menos durante 8 días (Ramírez et al., 2005), con un máximo de supervivencia de hasta 25 días (Shah et al., 2016). El principal factor limitante del xenotrasplante es la presencia de RVA con los órganos de los que disponemos en este momento. Este rechazo conlleva al desarrollo de trombosis microvasculares dentro del órgano trasplantado como consecuencia de la agregación plaquetaria y culmina con el desarrollo de una coagulopatía sistémica que conlleva la muerte del receptor (Cowan et al., 2011; Ekser et al., 2011). Se conocen incompatibilidades en los factores de coagulación entre los cerdos y los humanos (Robson et al., 2000; Cowan et al., 2008), y no se sabe si los factores de coagulación de cerdos funcionarán adecuadamente en los seres humanos después de la hepatectomía y el trasplante de hígado de cerdo.

En 2011, cerdos GTKO y GTKO/CD46 fueron utilizados por primera vez como donantes de hígado en xenotrasplantes, proporcionando nuevos datos y sugiriendo que algunos parámetros de la función hepática, en concreto los factores de coagulación del cerdo, eran adecuados para mantener la hemostasia después del trasplante de hígado de cerdo a primates.

Por otro lado, a pesar de la demostración *in vitro* de la infectividad, se ha demostrado la no infectividad *in vivo* de retrovirus porcinos en pacientes que han estado en contacto con órganos y perfusiones porcinas (Paridis et al., 1999).

Todo esto nos puede llevar, en un futuro no muy lejano, a que la investigación en xenotrasplante abandone el laboratorio y se consiga dar el paso a la clínica.

Finalmente, en 2016 Shah *et al.* comunican mediante una carta al director la supervivencia de un babuino durante 25 días con el hígado de un cerdo GTKO y libre de citomegalovirus porcino (PCMV). En esta ocasión los autores suministraron al receptor factores de coagulación humanos y se cambió el protocolo de inmunosupresión por uno mucho más moderno que cualquiera de los reportados hasta el momento.

Hasta la fecha no se ha comunicado ningún xenotrasplante clínico con órganos porcinos transgénicos. La razón de ello es que existe unanimidad entre los grupos que investigan en xenotrasplante de órganos en que las barreras inmunológicas, tal y como han sido expuestas, no se han superado todavía (Samstein *et al.*, 2001).

Con respecto al xenotrasplante de corazón y riñón, el uso de cerdos GTKO y de agentes inmunosupresores nuevos, permitieron la supervivencia de 2 a 6 meses en el caso del trasplante de corazón de cerdo a babuinos (Kuwaki *et al.*, 2005; Tseng *et al.*, 2005) y 3 meses de supervivencia en el caso de xenotrasplante de riñón (Yamada *et al.*, 2005).

En resumen, podemos decir que en el xenotrasplante las líneas de investigación se están centrando en los siguientes aspectos según Ramírez *et al.* (2013):

1. Ensayos preclínicos con cerdos GTKO.
2. Transgénesis para intentar eliminar el RVA.
3. En el campo de la inmunología para inducir tolerancia y evitar rechazos.
4. En la consecución de órganos quiméricos.
5. Mejoras en los protocolos de selección de donantes y receptores.

1.3. - Tolerancia inmunológica

1.3.1-Prevención del rechazo celular

Aunque los numerosos esfuerzos para evitar el rechazo humoral, tales como la utilización de animales transgénicos como donantes que expresan proteínas reguladoras del complemento humano, la eliminación de los anticuerpos GAL expresados en las superficies celulares del cerdo, etc., nos han llevado al control del RHA, aún nos queda por controlar el RVA (Paridis *et al.*, 1999) y el rechazo celular (Samstein *et al.*, 2001).

Debido a la dificultad en evitar RHA y RVA, el rechazo celular en xenoinjertos no ha sido bien caracterizado en el modelo cerdo a primate en xenotrasplante de órganos. *In vitro* se demostró que las respuestas de los linfocitos T humanos contra antígenos de cerdos, sobre todo en las respuestas indirectas, son más fuertes que las respuestas contra los aloantígenos (Kuwaki *et al.*, 2005).

Los autores también observaron que las terapias inmunosupresoras impedían el rechazo en aloinjertos de la misma especie, lo que también sugería que la respuesta de las células T en xenoinjertos eran más vigorosas y difíciles de controlar que en aloinjertos (Tseng *et al.*, 2005).

Griesemer *et al.* (2014) definieron algunas de las barreras inmunológicas que permanecen y describió el desarrollo de algunas estrategias para superarlas mediante la inducción de tolerancia inmunológica.

Dadas las respuestas sólidas de las células T y B a los xenoinjertos, es probable que el nivel de inmunosupresión sistémica requerida para prevenir el rechazo sea tan alto que dará lugar a efectos secundarios inaceptables en los receptores. Por lo tanto, se cree que la inducción de tolerancia inmunológica en los xenotrasplantes será probablemente necesaria para la aplicación clínica de esta modalidad.

Una de las ventajas de los xenotrasplantes en comparación con el alotrasplante es que cada procedimiento de trasplante se puede planificar. Éste permitirá la aplicación de regímenes de acondicionamiento programados en el receptor antes de la operación y también para cualquier manipulación requerida en el donante. A este respecto, aunque las barreras inmunológicas pueden ser mayores en xenotrasplantes, el desarrollo de regímenes de inducción de tolerancia que se administran a través de un período de tiempo se puede aplicar más fácilmente a los xenotrasplantes que en alotrasplantes (Yamada *et al.*, 2005). Durante los últimos veinticinco años, Griesemer *et al.* (2014) trabajaron en dos estrategias básicas para la inducción de tolerancia inmunológica. La primera estrategia implica el trasplante de tejido tímico y la adecuada vascularización del mismo para inducir tolerancia de las células T y la segunda estrategia que investigaron fue el desarrollo de quimerismo mixto para inducir tolerancia tanto en células T como en células B.

1.3.2-Tolerancia células B y células T

1.3.2.1- Células T

Los primeros experimentos que demostraron que los trasplantes xenogénicos de timo podían inducir tolerancia fueron realizados en modelos de cerdo a ratón (Lee *et al.*,

1994; Zhao *et al.*, 1996). Aunque el modelo de cerdo a ratón demostró que estos trasplantes xenogénicos podrían apoyar el desarrollo de las células T de especies cruzadas, mediar en la selección positiva y negativa de la maduración de timocitos y promover la tolerancia específica del donante, quedaba por demostrar que la combinación de cerdo a humano pudiera producir resultados similares. Para lograr esto, se implantó timo porcino fetal e hígado fetal humano bajo la cápsula renal de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (Nikolic *et al.*, 1999). Estos animales reconstituyeron las células T periféricas durante 10 semanas y los timocitos en los injertos de timo porcinos tenían perfiles fenotípicos similares a las que desarrollaron en el injerto de timo fetal humano. Se demostró que el repertorio de células T humanas generadas en el timo porcino era variada y similar a la generadas en los injertos de timo humano (Shimizu *et al.*, 2008). Posteriormente se demostró que las células T periféricas humanas eran específicamente tolerantes a los antígenos del cerdo donante y que los injertos de timo porcino generaban funciones normales (Kalscheuer *et al.*, 2014).

También se investigaron modelos de trasplante de timo para la inducción de la tolerancia alogénica y xenogénica en modelos de grandes animales (Haller *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2000), los cuales mostraron resultados similares a los observados en modelos de pequeños animales. Los altos niveles de Acs de células T independientes representaban una barrera para la supervivencia del trasplante de timo y las células B que producen estos anticuerpos no se hacen tolerantes por el trasplante de timo.

Tanto en los modelos de grandes como pequeños animales se obtuvieron los mismos resultados, por lo tanto, mientras el trasplante de timo porcino proporcionaba

tolerancia de las células T, la tolerancia de las células B no fue inducida. Para que se llegue a conseguir la eliminación de la respuesta de anticuerpos anti-cerdo con el trasplante de timo parece ser que tiene que estar emparejado con una estrategia para conseguir la tolerancia de las células B. Estrategia especialmente prometedora es la obtención de quimerismo mixto para acercarnos hacia la xenotolerancia, aunque parece que el quimerismo hematopoyético a largo plazo es difícil de lograr en combinaciones xenogénicas. Sin embargo, se ha observado que en combinaciones alogénicas en humanos la obtención de quimerismo transitorio es suficiente para conseguir la supervivencia del aloinjerto (Fudaba *et al.*, 2006).

1.3.2.2- Células B

Diversos grupos han investigado el papel de las células B, células plasmáticas y más recientemente, los estudios se han centrado en la inmunidad innata en el rechazo de xenoinjertos.

Se logra quimerismo mixto mediante el trasplante y el injerto de la médula ósea o de las células progenitoras de la sangre de modo que las células hematopoyéticas del donante y receptor coexisten en el receptor. Cuando esto ocurre, el receptor se convierte en tolerante a los antígenos del donante. Se cree que se producen por un mecanismo central en el que las células del donante migran al timo donde inducen delección clonal de maduración de timocitos donantes reactiva. Este proceso también conduce a la tolerancia de células B en la médula ósea (Sykes *et al.*, 2001).

La capacidad del quimerismo mixto para inducir tolerancia de células B y prevenir la producción de anticuerpos xenoreactivos anti-Gal se demostró por primera vez

mediante estudios que utilizaron ratones knockouts para 1, 3 - galactosiltransferasa (GalT KO). AL igual que en los humanos, los sueros de los ratones GalT KO contienen anticuerpos anti-Gal, proporcionando así un modelo para evaluar métodos de inducción de tolerancia de células B a los antígenos Gal (Chiang *et al.*, 2000). En este estudio, se logró quimerismo hematopoyético mixto después de la irradiación letal en ratones GalT KO por co-trasplante de médula ósea de ratones GalT KO y de tipo salvaje. Las quimeras GalT de anticuerpos anti-Gal en suero se mantuvieron a un nivel indetectable durante las 4 semanas siguiente al trasplante de médula ósea.

La verdadera tolerancia a nivel de las células B se demostró mediante inmunoensayos ligados a enzimas (ELISPOT) donde se mostraba la ausencia de anticuerpos anti-Gal por las células B en las quimeras mixtas (Yang *et al.*, 1998). Estudios posteriores en modelos tanto alogénicos ratón-ratón como modelos xenogénicos rata-ratón demostraron que a largo plazo se podría lograr quimerismo hematopoyético y tolerancia de células B a los antígenos Gal (Ohdan *et al.*, 2001).

Por lo tanto, el quimerismo mixto induce eficazmente la tolerancia específica de células B anti-Gal, además de la tolerancia de células T, proporcionando un único enfoque para superar las barreras inmunitarias tanto humorales como celulares en el xenotrasplante discordante.

1.3.3- Quimerismo y tolerancia

Después del trasplante de un órgano sólido, las células del donante se pueden encontrar en diferentes tejidos del huésped (Cooper *et al.*, 2002). La coexistencia de células de diferentes orígenes genéticos en el mismo organismo se define como

quimerismo, o microquimerismo en el caso en que las células del donante estén presentes en el receptor en menos de un 1% (Platt *et al.*, 1996). La presencia de quimerismo después del trasplante es un reflejo de la tolerancia inmunológica del huésped hacia las células del donante. Esto podría ser un requisito previo para la aceptación a largo plazo del injerto (Rosengard *et al.*, 1995; Sachs *et al.*, 1999).

El quimerismo ha sido evaluado en modelos de trasplantes xenogénicos y alogénicos, tanto en humanos (Diamond *et al.*, 1996) como en animales (Dai *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2002) para demostrar el injerto de las células donantes.

Aunque se ha sugerido que microquimerismo puede conducir a tolerancia en seres humanos y en modelos animales (Starlz *et al.*, 1992), existen numerosas evidencias en contra de este concepto, así como algunas pruebas que sugieren que el microquimerismo temprano puede desempeñar un buen papel en la inducción de la tolerancia, pero no mantenerla en ciertos modelos (Bushell *et al.*, 1995; Ko *et al.*, 1999).

La presencia de microquimerismo no fue útil para predecir la inducción de tolerancia en un modelo de tolerancia neonatal (Alard *et al.*, 1995) y no siempre se observó tolerancia en los receptores de rata de aloinjertos cardíacos (Fisher *et al.*, 1996). Por lo tanto, ha quedado claro que el microquimerismo ni predice la tolerancia ni la mantiene en todas las circunstancias. Sin embargo, el quimerismo mixto, que es considerado cuando coexisten células del donante y el receptor en un compartimento celular dado, al menos un 5% de células del receptor, y por tanto menos del 95% de células del donante, ha demostrado claramente tener la capacidad para inducir de manera fiable la tolerancia específica del donante.

Dentro del quimerismo mixto podemos distinguir:

- a. **Quimerismo mixto transitorio:** en los 6 primeros meses postrasplante y es frecuente detectar células del receptor en una proporción inferior al 10%, las cuales revierten en determinaciones posteriores a quimerismo completo.
- b. **Quimerismo mixto estable:** persiste a lo largo del tiempo una proporción entre 1-20% de células del receptor
- c. **Quimera mixta progresiva:** las células del receptor aumentan > 10% en las siguientes determinaciones.

La asociación de quimerismo con tolerancia inmunológica surgió de los trabajos de Owen y Billingham (Owen *et al.*, 1945; Billingham *et al.*, 1952). Desde entonces se demostró que el quimerismo mixto inducía tolerancia de las células T y B a través de barreras alogénicas en roedores (Slavin *et al.*, 1978; Ildstad *et al.*, 1984; Sykes *et al.*, 1988; Sharabi *et al.*, 1992; Tomita *et al.*, 1994), en grandes animales (Fuchimoto *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000; Horner *et al.*, 2006; Benichou *et al.*, 2013), y en humanos (Scandling *et al.*, 2008; Sachs *et al.*, 2011; Leventhal *et al.*, 2013). Griesemer *et al.* (2014) estudiaron la estrategia de inducir quimerismo mixto con la finalidad de generar tolerancia a través de barreras xenogénicas. Los primeros estudios realizados por estos investigadores se llevaron a cabo en modelos de rata a ratón (Sharabi *et al.*, 1990), modelo concordante que resultó ser un fracaso para inducir quimerismo.

Otros estudios en estos mismos modelos indicaron que tolerancia se asociaba con la presencia de células derivadas de médula ósea de rata, morfológicamente parecidas a

las células dendríticas, en el timo del destinatario y la posterior cancelación de sus donorreactivos clones de células T (Tomita *et al.*, 1994).

El siguiente paso hacia la validación de esta estrategia para la inducción de la tolerancia a través de barreras discordantes era probar que el quimerismo mixto podría crear tolerancia a la respuesta anti-Gal. Para ello, se determinó la capacidad de la médula ósea alogénica de inducir la tolerancia a la respuesta de los anticuerpos anti-Gal en ratones GalTKO (Chiang *et al.*, 2000).

Más tarde se demostró que el quimerismo mixto xenogénico de rata en ratones GalTKO hacía que fueran tolerantes a los xenoAcs de nueva formación y que se podían prevenir todas las formas de rechazo del xenoinjerto cardiaco, incluyendo el rechazo hiperagudo, el vascular agudo y el celular, sólo con esta estrategia (Ohdan *et al.*, 2001).

Aunque el quimerismo mixto se había demostrado en especies concordantes, la inducción de quimerismo entre especies más lejanas como de cerdo a ratón o en modelos discordantes de cerdo a babuino, presentaba desafíos adicionales.

Los primeros experimentos que estudiaron los trasplantes de cerdos a primates no humanos utilizando como fuente de médula cerdos Gal +, no encontraron quimerismo periférico probablemente debido en parte a los altos niveles de xenoAcs en el suero, incluyendo anti-Gal, pero sí proporcionaron evidencia de la persistencia de ADN de cerdo (Kozlowski *et al.*, 1999; Tseng *et al.*, 2004).

Dado que los estudios en roedores indican que se requiere un alto número de células hematopoyéticas del donante para superar una respuesta de anticuerpos anti-donante preexistente (Ohdan *et al.*, 2001), los siguientes estudios de quimerismo xenogénico

en el modelo de cerdo a babuino porcino utilizaron células progenitoras de sangre periférica movilizadas (PBPC). La movilización de las células progenitoras y la recogida por leucoféresis del donante aumentó el número de células administradas (Nash *et al.*, 1999). Esta modificación, combinada con anticoagulante para prevenir la activación de las plaquetas durante la infusión (Buhler *et al.*, 2001) y el uso de bloqueo coestimulador en el régimen de inmunosupresor, dio como resultado la detección de quimerismo periférico mediante citometría de flujo, durante al menos 5 días. Un animal que perdió el quimerismo en el día 5 tuvo un rebote de hasta el 6% en los días 16 a 22, lo que sugiere que se había producido el injerto porcino, al menos transitoriamente (Buhler *et al.*, 2002)

Sin embargo, cuando la inducción de tolerancia se puso a prueba mediante la realización de un trasplante combinado de médula ósea y de riñón, se observó rechazo en los riñones.

Los datos anteriormente citados en modelos de grandes animales indican que para el logro de quimerismo y la tolerancia duradera serían necesarias otras intervenciones para aumentar el número de células implantadas, incluyendo medidas para superar la destrucción rápida mediada por macrófagos de las células de porcino.

1.3.4-Inducción de quimerismo mixto

El trasplante de células madre hematopoyéticas en útero (IUHCT) podría potencialmente ser utilizado para el tratamiento de muchas enfermedades genéticas, aunque raramente ha tenido éxito, excepto en síndromes de inmunodeficiencia

severa.

De forma natural en modelos de trasplante de células hematopoyéticas en útero y en modelos preclínicos en animales, principalmente en el ganado ovino, se han observado resultados que sugieren que los ensayos clínicos en el feto humano deberían ser exitosos (Jolly *et al.*, 1972; Picus *et al.*, 1985; Shields *et al.*, 2002).

El feto ha sido considerado como el candidato óptimo para el trasplante hematopoyético debido a dos principales ventajas biológicas: su sistema inmunológico inmaduro y la potencial expansión del sistema hematopoyético que se produce durante su gestación temprana (Zanjani *et al.*, 1992). A través de la presentación de las células del donante al sistema inmune inmaduro, se pueden lograr el quimerismo hematopoyético mixto y la tolerancia específica del donante, debido a que, en la gestación temprana, la inmadurez del sistema inmune, hace que este sea incapaz de rechazar el trasplante de células donantes. Sin embargo, el fracaso de injerto en los receptores prenatales en los que no existe inmunodeficiencia sugiere la existencia de una barrera inmune fetal para trasplante (Amir *et al.*, 2010). Esta barrera reside probablemente en las células NK en desarrollo.

Se debe lograr un nivel mínimo de quimerismo hematopoyético circulante (1,8%), antes de la maduración de las células NK para establecer la tolerancia y garantizar éxito del injerto. Por debajo de este "umbral de quimerismo" las células NK del receptor rechazaban previsiblemente el injerto a medida que comenzaban a expresar los receptores de reconocimiento del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (Dorfman *et al.*, 1998).

Otra ventaja biológica es que durante la gestación temprana es la única vez en la vida en la que se produce la migración a gran escala de células madre a distintos compartimentos. Durante este tiempo, hay una expansión exponencial del compartimento hematopoyético con la formación continua de nuevos nichos para el injerto (Christensen *et al.*, 2004; Mikkola *et al.*, 2005).

La existencia de quimerismo en gemelos humanos (Gill *et al.*, 1977; van Dijk *et al.*, 1996) y en gemelos de primates no humanos (Picus *et al.*, 1985) está bien documentada, lo cual tiene una cierta relevancia clínica. En el caso de gemelos dicigóticos humanos, la frecuencia de quimerismo es relativamente alta (8%), llegando al 21% en el caso de los tríos (van Dijk *et al.*, 1996), considerándose en algunos casos que los niveles de quimerismo serían terapéuticos para la mayoría de enfermedades hematológicas (Hansen *et al.*, 1984). Estos hallazgos han aportado pruebas del potencial terapéutico de IUHCT.

Sin embargo, debido a que las quimeras naturales resultan de la mezcla de células hematopoyéticas a través de la anastomosis vascular placentaria, la exposición a los componentes sanguíneos alogénicos ocurre continuamente y comienza muy temprano en la gestación, por lo que es difícil de replicar experimentalmente.

La IUHCT se ha estudiado en una gran variedad de modelos animales en los últimos 30 años. Los primeros experimentos con éxito utilizando inyección transplacentaria de células de médula ósea se realizaron en ratones fetales anémicos (Fleischman *et al.*, 1979). Estudios posteriores por Blazar *et al.* (1995) demostraron la capacidad de conseguir quimerismo multilinaje en receptores anémicos, así como la capacidad de

lograr la reconstitución del tejido linfoide en el modelo de ratón con inmunodeficiencia combinada grave.

Posteriormente, los resultados de IUHCT en modelos alogénicos han sido más variables. El más alentador fue generado en el modelo ovino, donde un trasplante alogénico en fetos de ovejas en gestación temprana mantuvieron quimerismo hematopoyético (Flake *et al.*, 1986; Zanjani *et al.*, 1992). El modelo fetal de oveja también tuvo éxito en el injerto xenogénico, documentando la aparición de quimerismo hematopoyético después de un trasplante de CMH humanos (Zanjani *et al.*, 1994). Recientemente, el modelo de cerdo también se ha utilizado con éxito para IUHCT (Lee *et al.*, 2005). El uso del cerdo como modelo animal tiene claras ventajas sobre otros modelos con grandes animales, como es el alto número de fetos en cada gestación, lo que proporciona un gran tamaño muestral para el estudio. En este modelo animal se demostró una nueva ruta para la inyección de células alogénicas hematopoyéticas en útero: en lugar de inyectar las células del donante en la cavidad peritoneal del feto -donde las células tendrían que migrar al sistema linfoide-, se inyectaron directamente en la vena porta del feto, demostrando que la vía de inyección intraportal era segura para la inoculación (Rubin *et al.*, 2001).

Otros modelos en grandes animales, como el primate (Harrison *et al.*, 1989; Shields *et al.*, 1995), la cabra (Pearce *et al.*, 1989) y el perro (Blakemore *et al.*, 2004) tienen mayor resistencia al injerto, con niveles significativamente más bajos de quimerismo.

En los últimos años, se ha avanzado en el estudio del modelo murino que antes era muy resistente al injerto (Carrier *et al.*, 1995; Donahue *et al.*, 2001). Específicamente, se ha logrado el quimerismo hematopoyético mixto y la tolerancia específica (Hayashi

et al., 2003). Gracias a una mayor comprensión de los requisitos para el injerto y los mecanismos de tolerancia después de IUHCT (Shaaban *et al.*, 1999), se han desarrollado estrategias que logran un nivel de quimerismo alto en el ratón sin la necesidad de inmunosupresión o mieloablación (Hayashi *et al.*, 2002; Ashizuka *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de estos éxitos, en general, la eficiencia de injerto en sistemas de modelos animales continúa siendo bajo, y en ratones, además dependiente de la cepa. Todo ello supone un reto para lograr quimerismo de células donantes consistente después de IUHCT.

En la actualidad es probable que, con protocolos óptimos, se puedan lograr en fetos humanos los niveles de quimerismo requeridos para la inducción de tolerancia.

Lo que actualmente se necesita son estudios preclínicos de grandes modelos animales que se aproximen a la biología fetal humana para optimizar los regímenes del trasplante antes de los ensayos en humanos.

II. OBJETIVOS

2. Objetivos

Los objetivos generales de este trabajo fueron **generar lechones con quimerismo mixto mediante la inyección intrauterina de un número bajo de células STEM humanas y determinar la resistencia al RHA in vitro mediante técnicas clásicas.**

Para alcanzar estos objetivos generales, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Puesta a punto de la técnica ecográfica de inyección ecoguiada intrauterina en cerdo.
- Evaluación *in vitro* del agente de contraste sobre la viabilidad de las células STEM humanas de distintos orígenes.
- Identificación de lechones donde se haya producido quimerismo, incluyendo:
 - Puesta a punto de una técnica de PCR en tiempo real para la detección de ADN humano en los lechones candidatos a tener quimerismo mixto.
 - Determinación de la presencia de ADN humano tanto en sangre periférica como en tejidos de lechones candidatos a tener quimerismo mixto.
 - Evaluación mediante citometría de flujo de la presencia en sangre periférica de lechones de células con moléculas de HLA clase I
 - Evaluación mediante inmunocitoquímica de la presencia de células con moléculas de HLA I humano

- Evaluación mediante ELISA de la presencia de albúmina humana como medio de evaluación de la presencia de células quiméricas hepáticas funcionales.
- Determinación de la resistencia al RHA mediado por anticuerpos y complemento mediante la técnica clásica de hemólisis (APA) y
- Puesta a punto y uso de una técnica de evaluación de hemólisis mediante análisis celular en tiempo real (RTCA)

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3. Material y métodos

3.1. Generación de microquimerismo prenatal in útero

3.1.1. Cerdas

Se utilizaron un total de 15 cerdas procedentes de la Granja Docente Veterinaria (GDV) de la Universidad de Murcia. Los animales fueron criados y mantenidos de acuerdo con las transposiciones españolas de las leyes de ordenación de explotaciones porcinas y de protección mínima y bienestar del ganado porcino de la UE (RD 234/2000 y RD 1135/2002).

De las 15 cerdas seleccionadas nueve eran cruce Landrace x Large White, todas entre 2º y 4º parto, y fueron cubiertas con macho Duroc (Du x (LD X LW)), mientras que las seis restantes eran cerdas Landrace, todas entre 2º y 4º parto, y fueron cubiertas con macho Landrace (LD X LD).

Los criterios de selección llevados a cabo para la elección de las cerdas fueron:

- No ser primíparas ni sobrepasar el 4º parto.
- Tiempo de gestación menor a 52 días.
- Condición corporal adecuada.
- Ausencia de signos clínicos de cualquier enfermedad.

Un resumen de las características de las cerdas utilizadas en el estudio aparece en la Tabla 2.

Tabla 2: Cerdas incluidas en el estudio y sus correspondientes días de gestación.

CERDA	GENOTIPO CERDA	GENOTIPO MACHO CUBRICIÓN	DÍAS DE GESTACIÓN
1	LD X LW	Du	45
2	LD X LW	Du	45
3	LD X LW	Du	75
4	LD X LW	Du	45
5	LD X LW	Du	45
6	LD X LW	Du	50
7	LD X LW	Du	51
8	LD	LD	47
9	LD	LD	49
10	LD	LD	51
11	LD	LD	50
12	LD	LD	50
13	LD	LD	49
14	LD	LD	51
15	LD	LD	51

Dónde: LD = Landrace, LW= Large White, Du = Duroc

Se incluyó una cerda en 75 días de gestación para la práctica de abordaje ecoguiado, dado que el tamaño de los fetos es mayor y, por tanto, el abordaje de los fetos era más fácil.

3.1.2.- Células

3.1.2.1. Aislamiento y cultivo de células

Se utilizaron tres tipos de células humanas: mesenquimales aisladas de médula ósea (MMO), STEM procedentes de mononucleares totales de cordón umbilical (MCU), y células CD34+ procedentes de cordón umbilical.

3.1.2.2-. Aislamiento, cultivo y expansión de MMO

La médula ósea se obtuvo de donantes sanos, siempre bajo consentimiento informado, por el Servicio Hematológico del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia). Se procedió al aislamiento de las células mononucleares totales de médula ósea mediante la utilización de un gradiente de densidad para el aislamiento de linfocitos y otras células mononucleares, Histopaque-1077 ($1,077 \text{ g/cm}^3$) (Sigma-Aldrich, EE.UU.), mediante centrifugación a 400 g durante 30 min a temperatura ambiente. Cuidadosamente, se transfirió la interfase que contenía las células mononucleares a un tubo estéril y se procedió al lavado tres veces consecutivas con tampón fosfato salino (PBS; Invitrogen, EE.UU.), mediante centrifugación a 250 g durante 10 min.

Finalmente, el pellet resultante se resuspendió en 1 ml de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina.

La viabilidad celular se determinó mediante tinción de azul tripan en cámara de Neubauer y se procedió al cultivo celular a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células viables por cm^2 en frascos de cultivo de 25 cm^2 . Seguidamente, las células se incubaron en una cámara húmeda en condiciones de 37°C y 5% de CO_2 .

Después de 72 horas las células no adherentes fueron retiradas y se realizó el primer cambio de medio para permitir la proliferación celular y conseguir una confluencia del 70%. A partir de ese momento, el medio de cultivo se cambió cada 3-4 días (Figura 6).

Una vez observada esta confluencia en monocapa de células del 90% (Figura 7) como mínimo, se procedió a realizar el desprendimiento de las células adherentes

(subcultivo celular), mediante una incubación con un volumen de 2 ml de solución de Tripsina 0,05% - EDTA 0,02% durante 10 min a 37°C. Se comprobó que las células estaban en suspensión y se procedió a la inactivación del efecto de la tripsina por adición de 4 ml de medio de cultivo anteriormente descrito. La suspensión celular se introdujo en un tubo Falcon de 50 ml, tras centrifugar durante 10 min a 250 g, el pellet celular obtenido se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo completo y se procedió al cultivo de las células en dos frascos de cultivo de 25 cm² (subcultivo primario).

Tanto el cultivo primario como futuros subcultivos se realizaron en las condiciones de temperatura y atmósfera anteriormente descritas.



Figura 6: Cultivo de MMO.

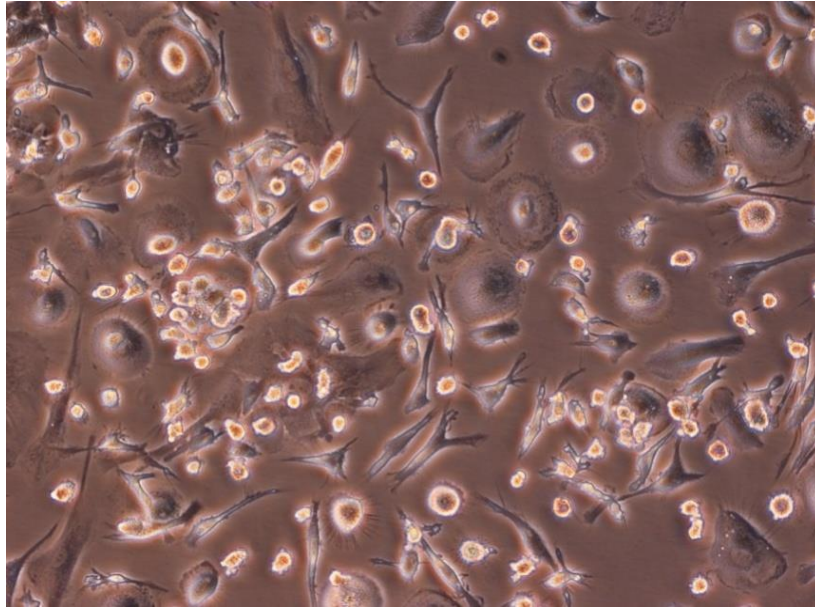


Figura 7: Expansión de MMO.

3.1.2.3-. Aislamiento de MCU

Las muestras se obtuvieron de partos humanos normales a término, se recogieron en una bolsa de sangre de 200 ml estéril que contenía citrato fosfato dextrosa como anticoagulante y se procedió al almacenamiento de las mismas a 2°C hasta que se llevara a cabo el aislamiento de las células mononucleares.

La sangre del cordón umbilical se recogió tras el parto mediante venopunción de la vena umbilical. Las células mononucleares se aislaron mediante un gradiente de densidad utilizando Histopaque-1077 (1,077 g/cm³) (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Después de la centrifugación en gradiente de densidad a 400 g durante 30 min a temperatura ambiente, las células fueron retiradas de la interfase y se procedió al lavado con PBS por centrifugación a 250 g durante 10 min, 3 veces. El pellet obtenido se resuspendió en 0,5 ml de PBS y se procedió a cuantificar la viabilidad celular mediante tinción de azul tripan. Posteriormente se procedió al conteo celular en cámara de Neubauer.

3.1.2.4- Aislamiento de células CD34+ procedentes de cordón umbilical

Las muestras se obtuvieron de partos normales a término, la sangre del cordón umbilical se recogió después de la entrega del niño y al mismo tiempo que la placenta permanecía dentro de la madre, mediante venopunción de la vena umbilical, se recogieron en bolsas de sangre de 200 ml estériles que contenían citrato fosfato dextrosa como anticoagulante y se procedió al almacenamiento de las mismas a 2°C hasta que se llevara a cabo el aislamiento de las células CD34+.

Las células mononucleares se aislaron mediante un gradiente de densidad, utilizando en este caso Ficoll-Paque® (Sigma-Aldrich, EE.UU.), retirando las células de la interfase y trasasándolas a tubos Falcon de 5 ml.

Una vez aisladas se procedió a la preparación de la suspensión celular en un medio libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ de PBS que contenía 2% de suero fetal bovino y 1 Mm de EDTA.

A la suspensión celular se le adicionó la mezcla EasySep® (StemCell's Technologies Inc, EE.UU.) para selección positiva a razón de 100 µL de mezcla por ml de células, se procedió a mezclar bien y a incubar durante 15 min. Se realizó la mezcla de EasySep® Nanopartículas magnéticas a razón de 50 µL de nanopartículas por ml de células mononucleares aisladas, mediante pipeteo enérgico, 5 veces, para asegurarse conseguir una suspensión uniforme y se procedió a la incubación a temperatura ambiente durante 15 min.

Se llevó la suspensión celular a un volumen total de 2,5 ml mediante la adición del medio de PBS anteriormente descrito y se mezcló mediante pipeteo suave 2 ó 3 veces.

Se colocó el tubo en un imán, se levantó el imán y mediante un movimiento continuo se invirtió el imán y el tubo, vertiendo la fracción sobrenadante.

Las células marcadas magnéticamente se posicionaron en el interior del tubo mediante el campo magnético del imán EasySep®.

Se mantuvo el imán y el tubo en posición invertida durante 2 ó 3 segundos y luego se colocó en posición vertical.

Se retiró el tubo del imán y se añadió 2,5 ml del medio recomendado, se procedió a la mezcla de la suspensión mediante pipeteo suave durante 2 ó 3 veces, se colocó de nuevo el imán en el tubo y se dejó reposar durante 5 min. Se repitieron tres veces los dos últimos pasos y posteriormente el penúltimo una vez más para la correcta separación en el imán. Se resuspendieron las células en PBS.

Las células positivamente seleccionadas se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

3.1.3. Técnica ecográfica

3.1.3.1-. Preparación celular

Una vez obtenidas las células y determinada la viabilidad de las mismas se procedió al conteo celular en cámara de Neubauer de todos los tipos de células obtenidas. Se determinó el número de células a inyectar en cada feto y se resuspendieron en 0,5 ml of PBS, adicionándole 0,5 ml de contraste ecográfico (SONOVUE®; Rovi, España).

3.1.3.2-. Evaluación del efecto citotóxico del contraste ecográfico SONOVUE® mediante análisis de perfil de impedancia usando un sistema RTCA xCELLigence

El contraste ecográfico SONOVUE® (Rovi, España) es actualmente el contraste más empleado, las microburbujas contenidas en este reflector de onda ultrasónica

contienen hexafluoruro sulfúrico estabilizadas con surfactantes, lo que mejora la ecogenicidad sanguínea y el contraste entre sangre y tejido. Con el objetivo de evaluar la capacidad citotóxica de dicho contraste ecográfico, ya que no se había testado su efecto sobre cultivos celulares o células fetales en estudios anteriores, se diseñó un sistema de análisis celular en tiempo real mediante la medición de impedancia (RTCA) utilizando un sistema xCELLigence (Acea, EE.UU.). Esta necesidad surge de que, dado que en el implante de células *in útero* se iban a inocular células cultivadas mesenquimales o células mononucleares totales de cordón en el interior de un feto porcino de 50 días de vida, y era necesario contar con un sistema de visualización que permitiera constatar que las células alcanzaban el peritoneo de los fetos, se decidió determinar mediante este sistema el efecto citotóxico de dicho elemento. Previamente, Quereda *et al.*, (2010) validaron el uso del sistema de análisis celular en tiempo real para pruebas de citotoxicidad usando fibroblastos porcinos en el ámbito del xenotrasplante.

Para tener, en la medida de lo posible, representación de los dos tipos de tejidos implicados, se utilizaron por una parte fibroblastos embrionarios de cerdo, y por otra, células mesenquimales humanas cultivadas procedentes de médula ósea. Tras la adición de 150 μ l de DMEM a los pocillos de la placa microelectrónica para la realización de una lectura inicial de ruido de fondo, se sembraron ambos tipos de células a una concentración final de $7,5 \cdot 10^3$ células/50 μ l de DMEM. Se dejaron crecer los cultivos durante 9 horas en estufa a 37°C y 5% de CO₂ para obtener una confluencia del 80% del fondo del pocillo. Tras dicho periodo, se sustituyó una parte del medio de cultivo por el contraste ecográfico, probándose las siguientes cantidades: 200 (el total

del medio de cultivo), 150, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2'5 y 1 μ l. Cada concentración se probó por duplicado.

Se monitorizó el índice celular normalizado (NCI) durante un periodo de 118 horas en total. Dicha normalización hace que el valor del NCI en el punto de normalización (sustitución del medio por el contraste) sea 1 en todos los cultivos, lo que hace comparables todos los resultados. Se monitorizó el IC mínimo (IC_{min}) y el tiempo al que se producía dicho IC_{min} (TIC_{min}). El valor del IC_{min} se comparó con el IC del cultivo control al TIC_{min} para calcular el decremento relativo al control. Se utilizó el software de análisis provisto por el propio sistema xCELLigence para obtener los parámetros de "IC mínimo frente a concentración en un periodo de tiempo", "área bajo la curva frente a concentración en un periodo de tiempo" e IC_{50} , definido como la concentración necesaria para disminuir el número de células al 50% de las que había antes del desafío. Igualmente, se calculó la regresión correspondiente al decremento de NCI (comparado con el NCI del cultivo control no desafiado en el momento en que se produce el IC_{min}).

También se calculó la disminución del NCI con respecto al control (porcentaje) dependiendo del número de células/ μ l de SONOVUE® y con respecto a la cantidad de medio sustituido por contraste. Se realizó una curva de regresión utilizando la función estadística de Excel® (Microsoft, EE.UU.).

3.1.3.3- Preparación de las cerdas objeto de inyección celular

Las cerdas elegidas, según los criterios de selección anteriormente mencionados, se trataron con 22 mg de progesterona oral (Regumate, Hoechst Roussel Vet, EE.UU.) los tres días anteriores y posteriores al procedimiento de inyección celular, con el objetivo de ayudar al mantenimiento de la gestación. La administración se realizó mediante suplementación del producto al pienso suministrado por la mañana, como recomienda el fabricante.

Además, estas cerdas también fueron tratadas esos mismos días con amoxicilina intramuscular para evitar posibles infecciones y así favorecer el mantenimiento de la gestación.

La alimentación de las cerdas fue la habitual en la GDV, administrada por el personal habitual y fue retirada el día antes de la intervención.

Una vez realizada la inyección celular, las cerdas fueron monitorizadas durante las dos semanas posteriores a la intervención con el objetivo de controlar su comportamiento, su estado sanitario, la cantidad de alimento que consumían diariamente y los posibles signos de aborto espontáneo (pirexia, expulsión de anejos fetales y fetos).

3.1.3.4- Procedimiento de inyección celular en útero

Se procedió a la inducción anestésica de las cerdas mediante la administración vía intravenosa de 4 mg/kg de Ketamina (Ketolar; Merial, Francia) por cerda,

posteriormente se realizó la intubación de los animales y se mantuvieron en dicho plano mediante anestesia inhalatoria con isoflurano al 3% en oxígeno.

Los animales fueron colocados en decúbito supino y se procedió al rasurado, lavado y posterior desinfección de las glándulas mamarias y el abdomen inferior.

Una aguja espinal de calibre 25 se insertó a través de la piel, atravesando la pared uterina llegando a cavidad amniótica y posteriormente a cavidad peritoneal de los fetos.

Todo este proceso se llevó a cabo mediante continua ecografía guiada, utilizándose un ecógrafo Phillips HDX11 y otro Siemens X150 (Figura 8) con sonda de 5 MHz.



Phillips Cx50



Siemens X150

Figura 8: Ecógrafos utilizados en el proceso de inyección celular.

Después de la confirmación de la colocación apropiada de la aguja, a la solución de células se le añadió el contraste ecográfico y se inyectaron lentamente pudiéndose identificar fácilmente como se distribuían por todo el feto (Figura 9). Por último, la

presencia de las células en el torrente sanguíneo se demostró observando las células inyectadas en el corazón del feto.

Todos los fetos fueron inyectados con diferentes agujas estériles. El éxito de cada inyección fetal fue confirmado por la observación de un pequeño foco ecogénico en el sitio de la inyección gracias al contraste ecográfico (Figura 9).

De las 15 cerdas implicadas en el estudio, tres se utilizaron como control; inyectándoles a los cuatro fetos de una de ellas únicamente suero fisiológico y a los cuatro fetos de las otras dos solamente contraste ecográfico (Tabla 3).



Figura 9: Inyección celular en el feto. Se aprecia un foco ecogénico (flecha roja).

Tabla 3: Número de fetos inyectados en cada cerda, tipo de células utilizadas y número de células inyectadas.

INYECCIÓN	LINEA GENÉTICA	CÉLULAS	NÚMERO DE CÉLULAS	FETOS INYECTADOS POR CAMADA
1	Du x (LDxLW)	Suero fisiol.	0	4
2	Du x (LDxLW)	SONOVUE®	0	4
3	Du x (LDxLW)	SONOVUE®	0	4
4	Du x (LDxLW)	CD34+	2×10^6	4
5	Du x (LDxLW)	CD34+	2×10^6	4
6	Du x (LDxLW)	MMO	1.5×10^6	2
7	Du x (LDxLW)	MMO	2×10^6	4
8	Du x (LDxLW)	MCU	10.7×10^6	4
9	Du x (LDxLW)	MCU	3.5×10^6	4
10	LD x LD	MMO	10×10^6	3
11	LD x LD	MCU	10×10^6	4
12	LD x LD	MCU	15×10^6	4
13	LD x LD	MCU	15×10^6	4
14	LD x LD	MCU	15×10^6	4
15	LD x LD	MCU	10×10^6	4

Dónde: Du = Duroc, LD = Landrace, LW= Large White, UCMCs = Mononucleares totales de cordón umbilical

3.2. Registro de rendimientos reproductivos

De las 15 cerdas incluidas en el experimento nueve correspondían a la línea genética Du x (LDxLW) y seis a la línea genética LD x LD. Se registraron los partos llevados a cabo y los abortos. En las cerdas que llevaron el parto a término se registraron: lechones nacidos totales (LNT), lechones nacidos vivos (LNV), lechones nacidos muertos (LNM) y lechones momificados (LM). Asimismo, se registró la mortalidad, diferenciando entre mortalidad perinatal (aquellos animales que murieron durante las primeras 24 horas) y

mortalidad no perinatal (aquella que se produjo durante la lactación; 3 semanas post-parto). A efectos de análisis de datos, los animales nacidos muertos se consideraron como mortalidad perinatal.

Todos los lechones nacidos vivos fueron identificados mediante un crotal numérico en la oreja derecha y traspondedor electrónico de 11 × 2,1 mm (Merial, Francia) introducido en la zona subcutánea cervical usando un inyector de un solo uso.

3.3. Detección de lechones quiméricos

3.3.1. Toma de muestras

3.3.1.1- Muestras de Sangre

Una vez se identificó a los lechones mediante lectura del traspondedor, se procedió a la extracción de sangre periférica procediendo a la punción de la vena yugular de todos los animales nacidos, a los 15 días de vida, utilizando agujas Vacutainer 1,2 x 38 mm (Becton-Dickinson, Reino Unido). Las muestras de sangre se obtuvieron en tubos que contenían EDTA K3 (Vacutainer, Reino Unido) y se mantuvieron en condiciones adecuadas hasta ser analizadas por citometría de flujo dentro de las 5 horas inmediatas a la extracción. De las mismas se obtuvo plasma centrifugando a 150 g durante 10 min, que se congeló a -80°C hasta el momento de su análisis. Posteriormente se extrajo sangre periférica con la misma técnica anteriormente descrita de los lechones que dieron resultado positivo a los 15 días de vida en la citometría de flujo.

Como muestras control positivo para las distintas técnicas se tomaron muestras de sangre de humanos donantes sanos voluntarios, tras obtener un consentimiento informado, utilizando tubos similares a los usados en los cerdos.

3.3.1.2.- Muestras de tejidos

Los animales que dieron resultados negativos a la detección de HLA I mediante citometría de flujo (n=58) fueron sacrificados humanitariamente de acuerdo a lo que establecido en la ley de protección de animales de experimentación (RD 5/2015) mediante inyección letal de Tiobarbital[®] (Braun Medical, Alemania), intravenoso a los 80 días de edad. Se tomaron muestras de hígado, riñón, bazo, pulmón, intestino delgado, intestino grueso, estómago, páncreas, timo, adrenales, cerebro, cerebelo, piel, tonsila, testículo, ovario, corazón, aorta, cava y músculo en solución de Bouin para el estudio inmunocitoquímico y en congelación para las pruebas de biología molecular. Los 13 animales positivos a la detección de HLA I en la primera citometría de flujo, se sacrificaron a los 120 días de edad y se recogieron muestras de los mismos tejidos anteriormente citados y de la misma manera que se ha descrito con anterioridad.

Los fetos de cerdas abortadas, fetos momificados y lechones muertos durante la lactación también fueron muestreados de la misma manera descrita, tomando las mismas muestras y con el mismo procedimiento.

Las muestras tomadas en congelación se mantuvieron en todo momento a -80°C hasta el momento de su análisis.

3.3.2. Puesta a punto de una PCR en tiempo real para el gen ALU Yb8

3.3.2.1.- Extracción de ADN

De las muestras de sangre periférica tanto de cerdo como humano se procedió a la extracción de las células mononucleares mediante la utilización de gradientes de Ficoll, como fue descrito anteriormente (Harris y Ukaejiofo, 1969, Ting y Morris, 1971) y usando Lymphopred (Axis-Shield, Noruega).

Una vez realizados los gradientes para la obtención de las células mononucleares se procedió a la extracción de ADN genómico de las mismas utilizando DnaSpin kit (Genedan, España).

Finalmente se midió la cantidad en ng y la pureza del ADN extraído mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Fisher, Reino Unido).

Una vez obtenidas, purificadas y cuantificadas las muestras de ADN se realizaron mezclas de las mismas previas a la amplificación. Las proporciones de dichas mezclas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Mezclas de ADN humano y porcino analizadas por PCR.

Muestra	ADN humano	ADN porcino	Muestra	ADN humano	ADN porcino
Muestra 1	0	1 µg	Muestra10	1 ng	0
Muestra 2	0	10 ng	Muestra 11	100 pg	0
Muestra 3	0	1 ng	Muestra 12	10 pg	0
Muestra 4	0	100 pg	Muestra 13	1 pg	0
Muestra 5	0	10 pg	Muestra 14	1 pg	1 µg
Muestra 6	0	1 pg	Muestra 15	1 ng	1 µg
Muestra 7	1 µg	0	Muestra 16	1 µg	1 pg
Muestra 8	100 ng	0	Muestra 17	1 µg	1 ng
Muestra 9	10 ng	0			

3.3.2.2- Amplificación por PCR para el gen humano Alu Ib8

Para la puesta a punto de la PCR en tiempo real se utilizaron los primers previamente publicados por Walker *et al.* (2003) para los genes de la subfamilia de Alu Yb8.

Los primers utilizados fueron: Alu_Yb8_F: 5'- CGAGGCGGGTGGATCATGAGGT-3' y Alu_Yb8_R: 5'- TCTGTCGCCAGGCCGGACT- 3'. El resultado final en la amplificación era un amplicón de 226 pares de bases.

Estos cebadores han demostrado ser totalmente específicos de ADN humano, dando una pequeña cantidad de amplificación ADN de fondo (por encima de ciclo 30) cuando el ADN de chimpancé estaba presente (Walker et al., 2003).

La reacción de PCR en tiempo real transcurrió en un volumen de reacción de 25µl, que contenían 0,125 µl de cada primers de concentración 50 nM, 12,5 µl de Master mix Power SYBR-Green (Life Technologies, EE.UU.), 2 µl de ADN de las diferentes mezclas mostradas en la Tabla 3 y una cantidad de agua miliQ estéril hasta completar el volumen final de la reacción.

Las condiciones para la PCR a tiempo real fueron las siguientes: el ADN fue amplificado con un ciclo inicial de desnaturalización durante 10 min a 95° C, 40 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 15 segundos y 74° C durante 1 minuto. Por último, se realizó una etapa de disociación con 1 ciclo de desnaturalización a 95° C durante 15 segundos y renaturalización durante 30 segundos a 60° C. Todas las reacciones de amplificación de PCR se llevaron a cabo utilizando un ABI 7300 en tiempo real termociclador (Life Technologies, EE.UU.).

Como control negativo se utilizó ADN de cerdo no modificado y ADN procedente de sangre humana como control positivo, además en cada ensayo se incluyeron también dos controles en blanco sin ADN, que contenían únicamente agua.

Se probaron distintas concentraciones de primers por duplicado en un rango de 50 nM a 300 nM.

Se evaluó la sensibilidad de la PCR a tiempo real mediante la medición de diluciones seriadas en duplicado de ADN genómico partiendo de 1×10^7 hasta 1×10^{-1} copias.

La eficiencia de la PCR se calculó mediante la fórmula $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$, tomando como valores de la pendiente los ofrecidos por el software del sistema ABI 7300.

3.3.2.3- Muestras analizadas

Se analizaron las muestras sanguíneas de todos los animales (toma de los 15 días de edad; n=63), de las 4 cerdas y los tejidos procedentes de los animales muertos al nacimiento, momificados o muertos perinatalmente (N=8), así como el tejido hepático de 59 lechones, cardiaco de 53 lechones, renal de 54 e intestino grueso y delgado de todos los animales.

3.3.2.4-. Secuenciación del producto de PCR

Finalmente, diez productos de la PCR a tiempo real, considerados positivos, se seleccionaron al azar y se secuenciaron por el método de Sanger en un secuenciador automático ABI 3100x de cuatro capilares. La secuencia obtenida se sometió a BLAST usando la colección entera de nucleótidos para las comparaciones. Se realizó una comparación con toda la colección de nucleótidos publicada.

3.3.3. Citometría de Flujo

Se realizó el análisis de presencia de los antígenos HLA I A, B y C mediante citometría de flujo (CF) sobre las subpoblaciones sanguíneas (monocitos, linfocitos y granulocitos) a partir de sangre entera. Se extrajeron las células totales de sangre periférica mediante la lisis de eritrocitos utilizando el reactivo Red Blood Lysis Buffer (Roche Applied Sciences, Alemania). Una vez lisados los eritrocitos, y tras agitación y centrifugación para su eliminación, se lavaron con solución salina.

Se procedió a realizar la mezcla de 100 µl de sangre completa de cada una de las muestras con 5 µl del anticuerpo primario monoclonal anti-HLA humano clase I (Sigma - Aldrich, EE.UU.). Esta mezcla se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente (18° C - 22° C).

Una vez transcurridos los 30 min se añadieron a la mezcla 2 ml de solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (PBS), pH 7,4, que contenía 1 % de BSA + 0,1 % de NaN₃ para la realización del lavado.

A continuación, las muestras se centrifugaron a 500 g durante 10 min. Una vez concluida la centrifugación se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y el

concentrado celular resultante se resuspendió en 100 μ l de anticuerpo secundario ratón anti-IgG fragmento Fab2 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma-Aldrich, EE.UU.). Posteriormente se incubó la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente y protegida de la luz, a partir de este momento todos los pasos siguientes se llevarán a cabo siempre en oscuridad.

Después de la incubación se lavaron de la misma forma que en el paso anterior y el pellet celular resultante se resuspendió en 0,5 ml de paraformaldehído al 2%.

La lectura de fluorescencia se realizó mediante un citómetro FC500 Citómica (Beckman Coulter, EE.UU.). Se contaron aproximadamente 20.000 células por muestra y los resultados obtenidos se analizaron mediante un Software de Análisis (Cytomix RXP).

Además de en las muestras objeto de estudio, el mismo procedimiento se llevó a cabo para la preparación de aquellas muestras utilizadas como control positivo (sangre humana de donante voluntario sano) y control negativo (cerdo no modificado, fenotipo salvaje del mismo genotipo que los modificados). La lectura del control negativo se utilizó para compensar el ruido de fondo de la fluorescencia. Cada muestra se analizó por duplicado.

3.3.4. Inmunocitoquímica

3.3.4.1.- Fijación

Las muestras de tejido se mantuvieron en solución de Bouin durante 24 horas, para su fijación. Posteriormente se lavaron en alcohol de 70°.

3.3.4.2.- Procesado histológico

El procesado de los tejidos para microscopía óptica se realizó mediante su inclusión en parafina sintética con punto de fusión de 56-58° C. A continuación, se realizaron los bloques de tejidos en parafina utilizando una consola *Tissue-Tek*® (dispensador de parafina, consola térmica y crioconsola de *Miles Scientific*®, EE.UU.).

3.3.4.3.- Obtención de cortes

A partir de los bloques de parafina se obtuvieron secciones de tejido de 4 µm de grosor mediante un microtomo de rotación modelo JUNG RM 2155 de (Leica, Alemania) para su posterior tinción.

3.3.4.4.- Técnica Inmunohistoquímica

La técnica inmunohistoquímica empleada fue la del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Hsu et al., 1981), según el protocolo que se describe a continuación.

Los cortes fueron desparafinados con xilol durante 10 min y se rehidrataron de forma secuencial mediante pases de 5-10' por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°), finalmente se lavaron las preparaciones en agua destilada durante 5'.

Para la inhibición de la peroxidasa endógena, las preparaciones se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 1.5% en metanol con agitación durante 30 min.

Posteriormente se realizó el primer lavado, tres veces durante 5 min en TBS (buffer, pH=7,4).

Para el desenmascaramiento antigénico se sometieron las preparaciones a un tratamiento durante 20 min de tampón citrato (pH=9,0) en una olla a presión a 96°C.

Una vez terminado, se realizó el segundo lavado de las muestras durante 5' en TBS y se procedió a la incubación con suero normal de conejo 1:100 a temperatura ambiente durante 30 min.

A continuación, se incubaron con anticuerpo primario toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal primario Anti-HLA Class I ABC ratón-antihumano EMR8-5 (ab70328) y la dilución empleada fue 1:100.

Para eliminar el exceso de anticuerpo se procedió a realizar tres lavados de 5' cada uno en TBS.

Tras el lavado se incubaron las muestras con un anticuerpo secundario marcado con biotina a temperatura ambiente durante 30 min en cámara húmeda, se utilizó un anticuerpo conejo-antirratón (Dako, Dinamarca) a una dilución en TBS 1:200. Se realizó un cuarto lavado igual que el tercero y se procedió a la incubación de las muestras con el complejo avidina biotina-peroxidasa (30 µl de avidina + 30 µl de biotina + 1000 µl de TBS) a temperatura ambiente durante 20 min.

Una vez terminado el tiempo de incubación se realizó otro lavado de las muestras exactamente igual que el anterior, para posteriormente proceder al revelado de las mismas. Para dicho revelado, las preparaciones se sumergieron en una solución cromógena que contenía 25g de 3-3' tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (Sigma Chemical Co., EE.UU.), durante 5 min. Posteriormente se lavaron con agua corriente durante 2 min y se contrastaron con hematoxilina de Harris durante 2 min.

Se procedió a un último lavado con agua corriente durante 4 min antes de la deshidratación y montaje de las muestras.

Para la deshidratación se realizaron pases rápidos (de entre 30 seg y 5 min cada uno) en una serie de alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) y se aclararon en xilol, para terminar, montándolos con el medio DPX (*Surgipath*®; Leica, Alemania) y cubreobjetos. Como control positivo se utilizó una muestra de tejido humano, con reactividad comprobada frente al anticuerpo primario empleado. Como control negativo se utilizaron muestras de tejido de cerdo normal no incluido en el experimento.

3.3.5. ELISA para la detección de albúmina humana

3.3.5.1.- Muestras analizadas

Se analizaron los sueros procedentes de los 13 animales con resultados positivos a la detección de HLA I mediante CF.

3.3.5.2.- Procedimiento

Previamente se calculó el número de pocillos necesarios, teniendo en cuenta que tanto las muestras estándar como los controles se analizaron por duplicado. Inicialmente se preparó una curva estándar con nueve concentraciones distintas conocidas de albúmina humana.

Se adicionó a cada pocillo 100 μ l de antígeno diluido y se incubó a temperatura ambiente (20-25°C) durante 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo, se aspiró la solución de antígeno de cada pocillo y se procedió al lavado de la placa tres veces tal y como indicaba el fabricante.

Posteriormente se añadieron 200 μ l de solución de bloqueo a cada pocillo, se incubó durante 30 min y pasado el tiempo se procedió a retirar la solución de bloqueo y al lavado de la placa de la misma forma que en el paso anterior.

Se adicionaron 100 μ l de anticuerpo primario cabra anti-albúmina humana (A80-129A-10, Bethy Laboratorios, EE.UU.) a cada pocillo, diluido según las recomendaciones del fabricante, se incubó la placa durante 60 min y se procedió a retirar la solución de bloqueo y al lavado de la placa.

A continuación, se diluyó el HRP conjugado detector de anticuerpos de albúmina humana (A80-129P-22) en diluyente a la concentración óptima y se transfirieron 100 μ l en cada pocillo, esta vez el tiempo de incubación fueron 60 min y una vez transcurrido el tiempo, se retiró la solución de conjugado y se procedió a lavar 5 veces.

Finalmente se preparó la solución de sustrato de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, se adicionaron 100 µl de esta solución a cada pocillo, se incubó la placa 30 min y se añadió la solución de frenado.

Posteriormente se procedió a la lectura de la placa a la longitud de onda apropiada para el sustrato (450 nm).

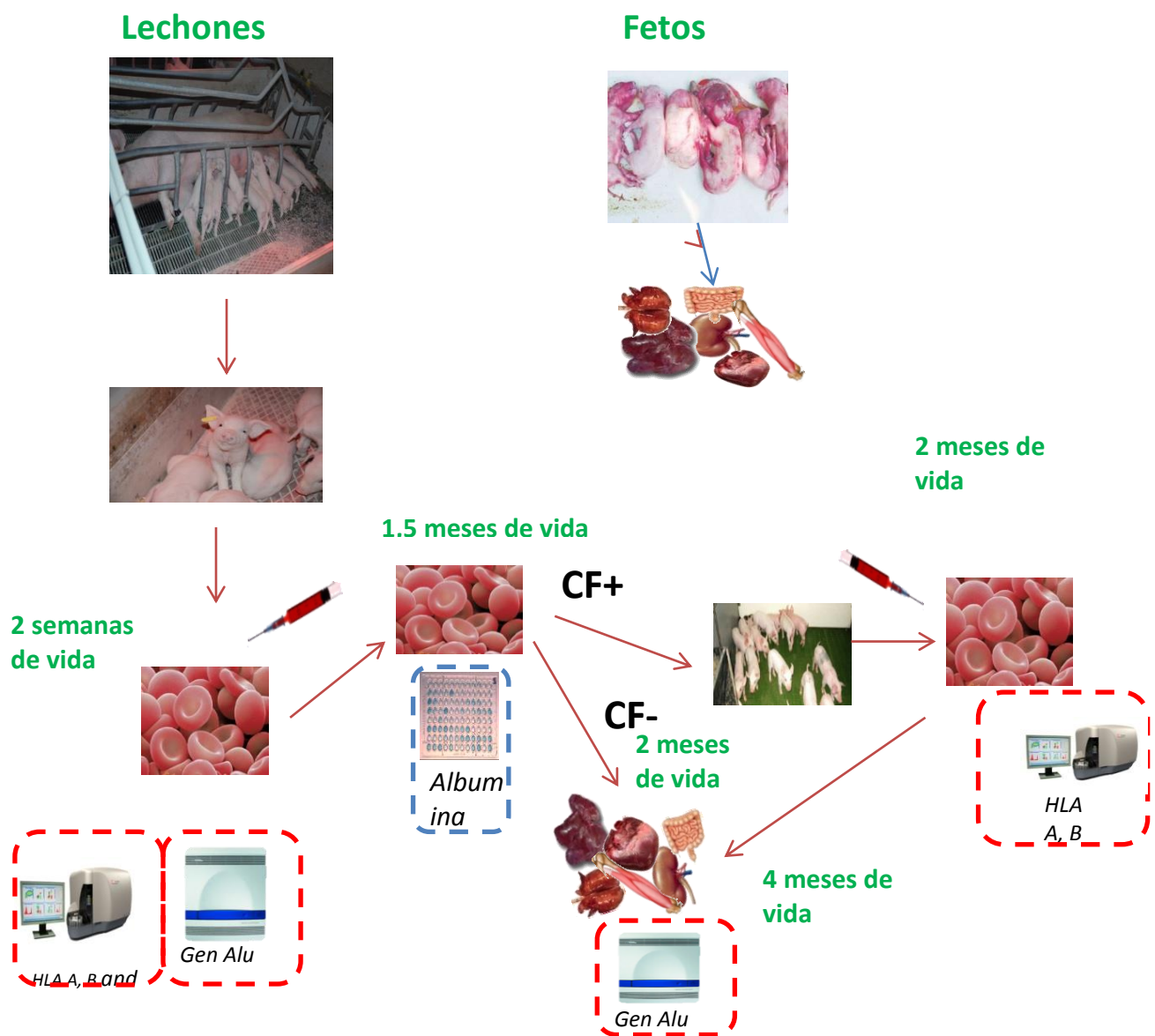


Figura 10. Cronograma de toma de muestras y pruebas realizadas.

3.4. Pruebas de compatibilidad *in vitro*

3.4.1. Toma de muestras

Se utilizaron hematíes procedentes de 11 lechones que mostraron positividad con HLA I humano mediante CF, seis animales negativos a CF y dos cerdos no modificados (WT1 y WT2) como controles negativos.

Una vez obtenidas las muestras mediante venopunción cervical en tubo de EDTA K3 como se describió anteriormente, se procedió a su preservación mediante Cell-Stab (Diamed Ibérica, España). Los tubos se centrifugaron a 150 g durante 10 min y se extrajo el plasma. A continuación, se añadieron 3 ml de Cell-Stab a cada muestra y se centrifugó de nuevo a la misma velocidad y tiempo. Se repitió el procedimiento 3 veces. Finalmente se suspendieron 50 μ l de concentrado de hematíes en 5 ml de Cell-Stab en tubos neutros.

Simultáneamente, se determinó el grupo ABO mediante tarjeta de microtipado. Para ello se hizo una dilución al 5% de hematíes en ID-Diluyente I (Diamed, Suiza) con bromelina y se dejó incubar durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se dispensaron 12 μ l de la dilución en cada pocillo de la tarjeta de microtipado Dia-Clon ABO/D Reverse Grouping (Diamed, Suiza), que utiliza anticuerpos monoclonales para evitar artefactos debido a la presencia de antígenos como el α -gal, como se describió anteriormente (Martínez-Alarcón *et al.*, 2010). Se dejaron incubar durante 10 min en estufa a 37°C y a continuación se centrifugaron en centrífuga de microtarjetas durante otros 10 min a 1.500 g. Se consideró positiva una reacción cuando los

hematíes aglutinaban, se depositaban y formaban una línea roja en la superficie del gel de cada pocillo.

Se obtuvieron sueros de 10 babuinos adultos sanos procedentes de la Unidad de Primatología de la Universidad de Murcia y de cuatro donantes humanos adultos voluntarios sanos tras consentimiento informado. En el caso de los babuinos, el suero se obtuvo mediante venopunción en la femoral, bajo anestesia con ketamina (1 mg/kg), tomando la muestra en tubos Vacutainer secos (Becton-Dickinson, Reino Unido). Se dejó coagular la sangre, se centrifugó a 150 g durante 10 min y se procedió a la congelación del mismo en alícuotas a -80°C hasta su utilización. A todos ellos se les determinó el grupo ABO utilizando las mismas microtarjetas que se han descrito anteriormente para los cerdos.

Las muestras de suero se descongelaron inmediatamente antes de los experimentos para evitar la destrucción del complemento endógeno, además se clarificó mediante centrifugado a 300 g durante 1 minuto antes de añadirlo a la solución de hematíes.

3.4.2. Hemólisis clásica

La realización de pruebas de hemólisis *in vitro* mediada por anticuerpos anti-cerdo (APA) fueron descritas previamente (Cozzi *et al.*, 2000).

3.4.2.1.- APA clásica

De cada uno de los cerdos, se utilizaron soluciones de hematíes al 1% en diluyente para la fijación del complemento (CFD, Oxoid, Reino Unido) y se distribuyeron en una

placa de fondo en U de 96 pocillos. Posteriormente a cada muestra se le añadieron 20 μ l de suero problema y se incubaron durante 1 hora en agitador orbital a 200 g a 37°C. Las muestras se incubaron por duplicado. Una vez finalizada la incubación, a una de las muestras se le añadieron 5 μ l de complemento de conejo (Cedarlane, Canadá) para la realización de la prueba con complemento exógeno. A la otra muestra se le añadieron 5 μ l de CFD para la prueba de complemento endógeno. Se incubó durante una hora en agitador orbital a 200 g y a 37°C.

Tras la última incubación se centrifugó a 4000 g durante 10 min y se transfirieron 100 μ l de sobrenadante a una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se realizó una medición de la colorimetría a 414 nm mediante un fotolorímetro μ Quant (BioTek Instrument Inc, EE.UU.) para determinar el contenido en hemoglobina en cada pocillo. Para el cálculo del porcentaje de hemólisis, se obtuvieron valores de hemólisis total para cada muestra, incubando hematíes con agua bidestilada Braun® (AG & Co., Alemania), y de hemólisis espontánea, incubando hematíes solamente con complemento normal de conejo. El índice de hemólisis se calculó como:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(D.O. \text{ muestra} - D.O. \text{ hemólisis espontánea})}{(D.O. \text{ hemólisis } 100 - D.O. \text{ hemólisis espontánea})} \times 100$$

Para determinar la bondad del ajuste se realizó una curva estándar con uno de los sueros humanos y los hematíes de uno de los cerdos incluidos en el experimento, variando la cantidad de suero adicionada (20 μ l, 10 μ l, 5 μ l y 2,5 μ l).

3.4.2.2.- APA clásica comparando hematíes tomados a los 15 días y a los dos meses de vida

Se realizaron hemólisis clásicas con y sin complemento exógeno añadido. Se compararon los resultados de los hematíes obtenidos a los 15 días de vida con los obtenidos a los dos meses de edad. Estos hematíes se habían preservado en CellStab como ya se ha referido anteriormente.

3.4.3. Hemólisis mediante xCELLigence® RTCA. Validación del sistema

El estudio se ha realizado utilizando el xCELLigence® (Acea, EE.UU.), un analizador celular en tiempo real (RTCA) basado en la evaluación de la variación de la impedancia, para ello utiliza una placa microelectrónica (E-plate) de 96 pocillos que contiene microelectrodos de oro integrados en el fondo de los pocillos. El principio general es que la presencia de células en la parte superior del E-plate, conduce a un aumento de la impedancia. Dicho instrumento ofrece un gráfico en tiempo real donde se dibuja el valor para el índice (IC) celular; un parámetro adimensional derivado de un cambio relativo en la impedancia eléctrica medida. Cuando las células no están presentes o no están adheridas, el IC es cero, por el contrario, cuantas más células hay unidas a los electrodos, más altos son los valores de IC aumentando progresivamente y de manera proporcional. Para comparar distintas muestras y evitar efectos derivados de errores de pipeteo, el sistema del RTCA permite calcular el IC normalizado (NIC), que asume que en un momento temporal concreto el valor del IC para todas las muestras es 1. A partir de ese punto se calcula un incremento o descenso del NIC relativo al valor

existente en el momento de la normalización. Teóricamente este sistema sólo es capaz de calcular IC o NIC para aquellas células que se adhieran al fondeo de la placa e interactúen con los microelectrodos del fondo. Por tanto, como el objetivo era utilizar el sistema xCELLigence para determinar el nivel de hemólisis *in vitro*, se procedió a la validación de este sistema, de forma similar a la que llevaron a cabo Quereda *et al.* (2010) y Ramis *et al.* (2011, 2013) para las pruebas de citotoxicidad basada en fibroblastos de cerdo transgénicos y suero de primate.

3.4.3.1.- Animales

Se utilizaron hematíes procedentes de 7 lechones que mostraron positividad con HLA I humano mediante CF y dos cerdos normales no incluidos en el estudio (WT1 y WT2) como control negativo. Los hematíes utilizados fueron aquellos obtenidos en la segunda extracción (2 meses de edad).

3.4.1.2.- APA mediante RTCA

Validación del método

Se utilizó una placa microelectrónica (E-plate) de 96 pocillos. Previamente se realizó una lectura del background con 100 μ l de CellStab® (Diamed, Suiza). Para la validación del método se utilizó sangre de cerdos de fenotipo salvaje procedentes de la GDV de la Universidad de Murcia y cuyos hematíes se preservaron en CellStab. Se sembraron por quintuplicado muestras conteniendo $1 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^6$ y $8 \cdot 10^6$ hematíes totales por

pocillo en 50 μ l del mismo medio. Se realizaron lecturas del IC cada 5 min durante un total de 50 horas. Se determinó el IC máximo observado durante el experimento (IC_{max}) y el tiempo necesario para alcanzar dicho IC_{max} (TIC_{max}). Se estableció la correlación de Spearman entre el valor IC y la concentración de hematíes sembrados en distintos puntos temporales. El medio conteniendo las células fue retirado a las 20, 40 y 60 horas tras la adición de suero, contándose las células mediante una cámara de Neubauer. Se estableció la correlación entre el conteo y el IC obtenido a las mismas horas en el RTCA mediante el test de Spearman.

A continuación, se realizaron pruebas de hemólisis mediada por Acs y complemento utilizando diluciones seriadas de varios sueros humanos y de babuinos. Para ello se seleccionó la concentración de $2 \cdot 10^6$ hematíes totales en base a los experimentos realizados anteriormente. Los hematíes (de la segunda toma de muestras a los dos meses), se añadieron en un volumen de 50 μ l de medio tras hacer la lectura de background. Se dejó que los hematíes se depositaran en el fondo y que el IC alcanzado estuviera entre 0,3 y 0,5, lo que sucedía a las 6 horas tras la adición de la solución de hematíes. A continuación, se añadieron 40 μ l de suero procedente de un humano voluntario sano, o 40 μ l de diluciones 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16. Se realizó una lectura de la impedancia cada 5 min durante 80 horas post-adición del suero. Se determinó el IC_{min} (IC_{min}) a lo largo del experimento, entendido como el mínimo de IC registrado a lo largo de todo el periodo experimental. Al final de la prueba se calculó el coeficiente de determinación del área bajo la curva y de la IC_{min} frente a concentración mediante el software del sistema xCELLigence v 1.2. De forma paralela se sembraron las mismas

concentraciones de hematíes en placas convencionales con fondo plano y conteniendo CellStab en la misma cantidad que las sembradas en el RTCA.

3.5 Análisis estadístico

Todos los grupos de datos se analizaron para constatar la normalidad utilizando el test de Smirnov-Komogorof.

Las diferencias en la frecuencia de hallazgos positivos en las pruebas de citometría de flujo e inmunocitoquímicas se compararon mediante tablas de contingencia y el test chi cuadrado, utilizando la exacta F de Fisher cuando había una frecuencia menor de 5 en algún grupo.

Los resultados obtenidos en las hemólisis clásicas de animales positivos y negativos a citometría de flujo para HLA I y fenotipo salvaje se compararon utilizando test no paramétricos de comparación de k muestras Kruskal-Wallis y de comparación de muestras dos a dos U de Mann-Whitney, puesto que la distribución de datos no era normal. Los resultados obtenidos en las hemólisis clásicas en las dos tomas de los animales positivos a citometría de flujo se compararon mediante un test de comparación de 2 muestras relacionadas, W de Wilcoxon. Se consideró significativa una $p < 0,05$.

Las comparaciones de IC_{min} se realizaron mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney y la correlación de Spearman para obtener la relación entre la prueba clásica de hemólisis y el IC_{min} alcanzado a las 20 horas post-adición de suero

Para todos los análisis estadísticos se consideró una diferencia significativa cuando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS DE LA INYECCIÓN CELULAR EN ÚTERO

4.1.1. Evaluación del efecto citotóxico del contraste ecográfico SONOVUE® mediante análisis de perfil de impedancia usando un sistema RTCA xCELLigence®

Células STEM mesenquimales humanas

El NIC de los cultivos de hMSCs disminuyó rápidamente a 0 en aquellos cultivos en los que se sustituyeron totalmente los 200 μ L de medio de cultivo por SONOVUE® (Figura 11A; línea roja). Del mismo modo, los cultivos en los que se sustituyeron 150 μ L de medio por SONOVUE®, muestran una caída en el IC, pero en este caso la caída del IC se retrasa hasta las 70 horas post-sustitución y no es tan brusca como en el anterior (Figura 11A; línea verde). Cuando se sustituyeron distintas cantidades de medio (150, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2,5 o 1 μ L, correspondientes a concentraciones entre 42 mM y 0,2 mM), los valores del NIC disminuyeron inmediatamente después de la adición del contraste para estabilizarse posteriormente en un breve periodo de tiempo. Sólo el cultivo donde se sustituyó 1 μ L de medio recuperó un NIC igual o superior a 1, valor en el momento de la normalización.

El perfil de impedancia tuvo un decremento de entre el 13,73% ($TCl_{min} = 17$ h después del desafío) al 45,5% ($TCl_{min} = 50$ h después del desafío), correspondiendo a las sustituciones de 1 μ L y 150 μ L de medio, respectivamente (Tabla 5). La disminución en el NIC mostró una correlación con la cantidad de contraste añadido de $r=0,8312$ ($p<0,001$) (Figura 11).

Los perfiles de impedancia obtenidos aparecen en la Figura 11.

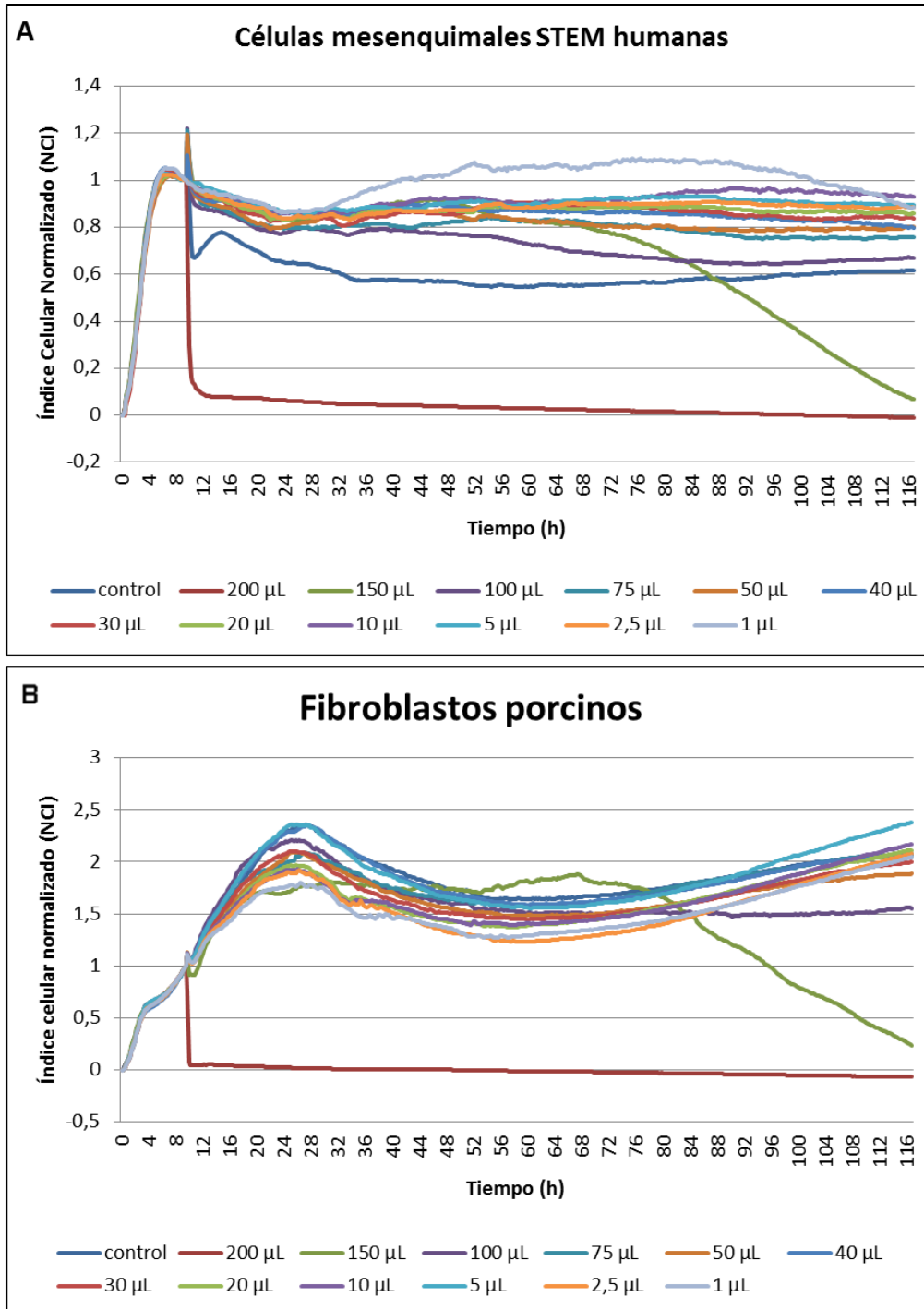


Figura 11. Perfil de impedancia RTCA para (A) células mesenquimales humanas y (B) fibroblastos porcinos.

Tabla 5: Disminución del NIC para las células mesenquimales humanas, expresado como porcentaje de reducción con respecto al control para cada concentración de SONOVUE®.

μL SONOVUE® por pocillo	Ratio células/ μL SONOVUE®	Disminución del NCI (%)
150	50	45,55
100	75	35,77
75	100	25,13
50	150	21,76
45	167	20,09
30	250	19,3
20	375	16,68
10	750	14,48
5	1500	14,58
2,5	3000	16,62
1	7500	13,73

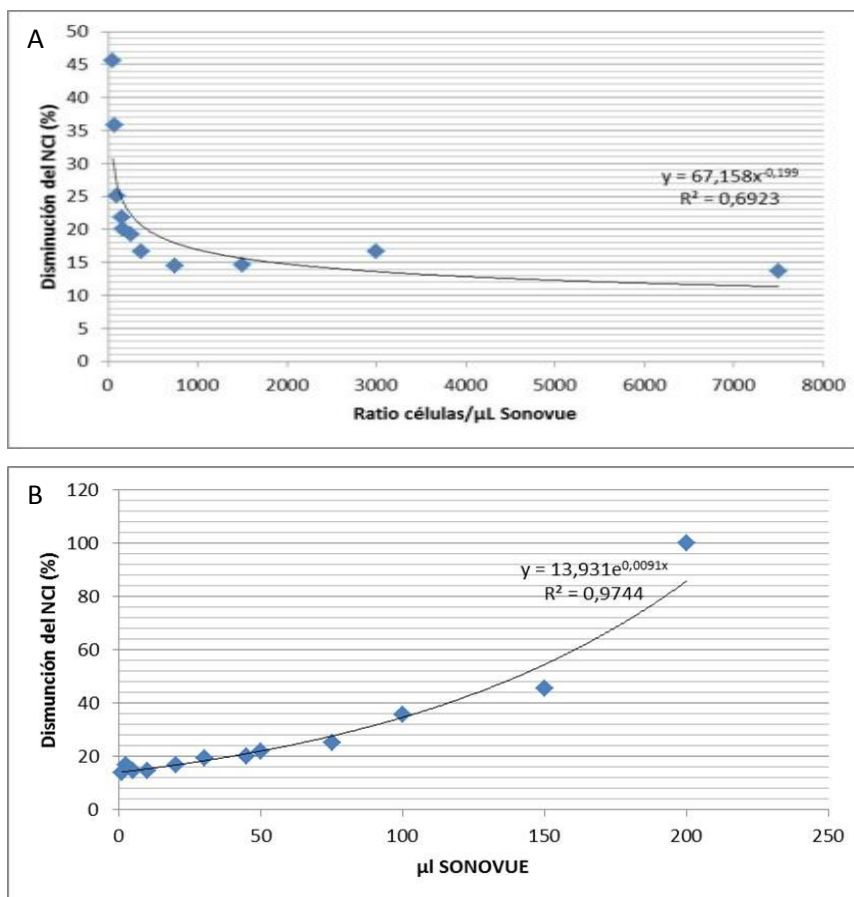


Figura 12. Análisis de regresión de la disminución del NIC frente a A) la ratio células/μl de contraste y B) la cantidad de contraste añadido.

Las células expuestas a SONOVUE® mostraron una disminución del NIC de manera dosis-dependiente (Figuras 12). La IC_{min} frente a concentración tuvo una correlación entre $r^2 = 0,861$ y $r^2 = 0,911$ ($p < 0,001$) correspondientes a las obtenidas respectivamente a las 20 y 10 h tras la adición, (Figura 13A). Igualmente, el Área bajo la Curva (AUC) tuvo una correlación de entre $r^2 = 0,828$ y $r^2 = 0,844$ correspondiente a las 50 y 10 h post-desafío, respectivamente (Figura 13B).

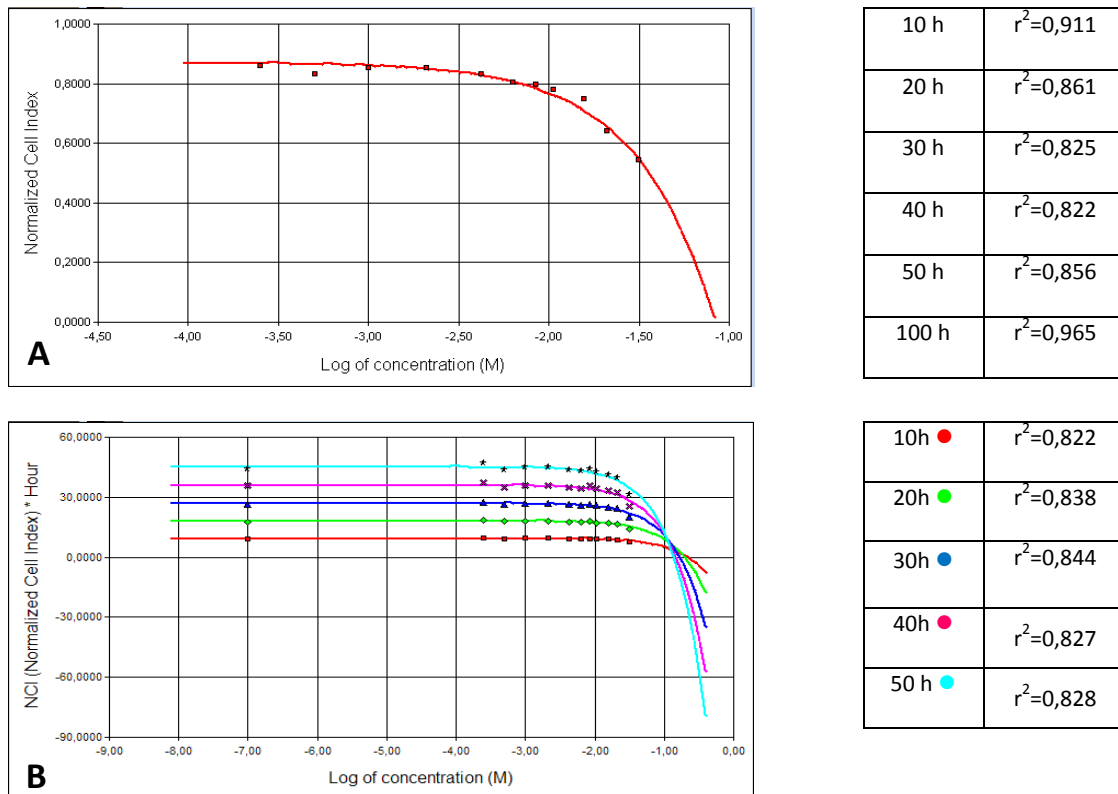


Figura 13. Monitorización dinámica de los cultivos de células msenquimales humanas expuestas a SONOVUE®. (A) Cálculo del IC₅₀ (NIC frente al logaritmo de la concentración de SONOVUE® a las 20 horas post-desafío. (B) Área bajo la curva frente al logaritmo de la concentración a las 10 (línea roja), 20 (línea verde), 30 (línea azul oscuro), 40 (línea rosa) y 50 (línea celeste) horas tras el desafío.

Esta prueba mostró un valor para el IC₅₀ de 25 M ($r^2 = 0,869$, $p < 0,0001$) a las 20 horas post-desafío. Esto significa que habría que usar una concentración 300 veces superior a la que se utilizó en los procedimientos experimentales de inyección de células *in utero* para producir una reducción en el 50% de las células.

Fibroblastos fetales porcinos

Al igual que con las células humanas, el NIC de los fibroblastos fetales porcinos cayó a 0 cuando se cambió el total del medio por contraste sonográfico (Figura 14B, línea roja). Del mismo modo, el cambio de 150 μ L de SONOVUE[®] produjo una reducción del NIC alrededor de las 80 horas post-desafío (Figura 14B, línea verde). Para los otros volúmenes de intercambio, se produjo un perfil bifásico, con una disminución inicial del NIC y posterior incremento similar a la descrita anteriormente en otros ensayos de citotoxicidad RTCA usando fibroblastos porcinos y suero de primates con o sin complemento exógeno añadido (Quereda *et al.*, 2010; Atienzar *et al.*, 2011; Ramis *et al.*, 2013). Estos cultivos mostraron un rápido aumento en el NCI tras la siembra de las células, que corresponde al periodo de adhesión, una fase de disminución del NIC correspondiente al periodo de adaptación del cultivo y un posterior incremento final del NIC correspondiente al crecimiento celular. El número de fibroblastos no disminuyó tras el intercambio de medio por SONOVUE[®] puesto que el NIC nunca estuvo por debajo de 1 (NIC en el momento de la adición del compuesto) (Figura 11B). La reducción del NIC observada en los cultivos en los que se intercambiaron 150 μ l de medio por SONOVUE[®] comenzó a las 80 h lo que significaría que ocurrió por

agotamiento de los recursos puesto que 2/3 del medio fueron cambiados por contraste.

No se observó una correlación significativa entre la IC_{min} frente a concentración ($r^2 = 0,55$; $p=0,130$) ni en el Área bajo la curva vs. Concentración ($r^2 = 0,293$), en ningún momento del experimento (Figura 14).

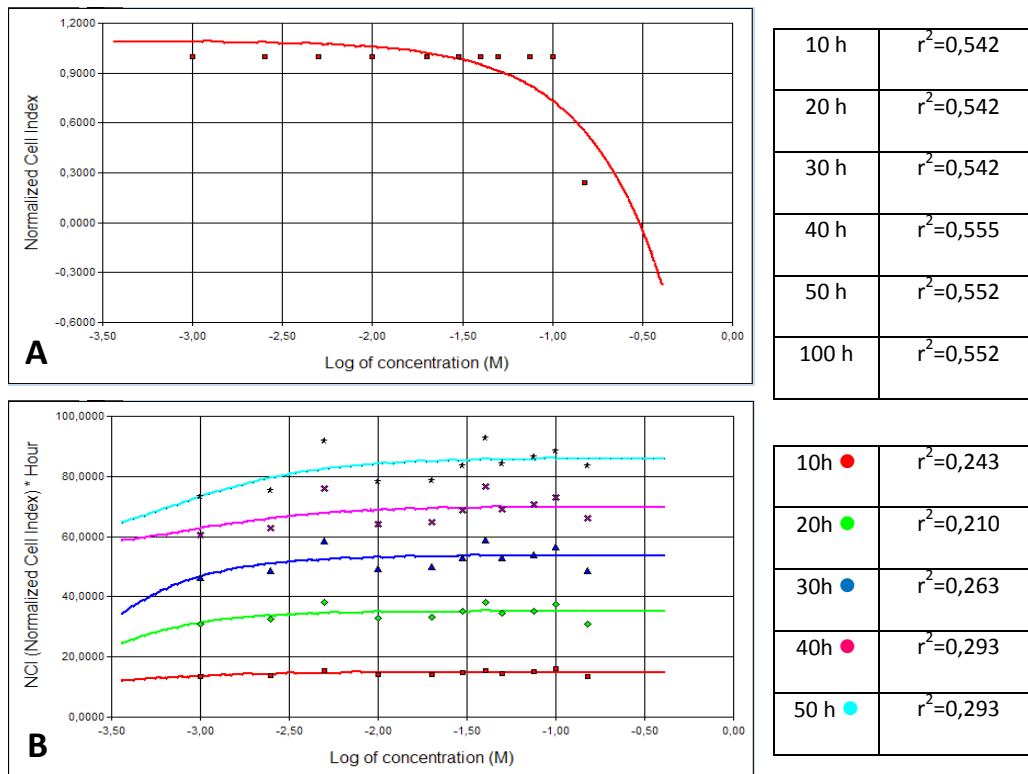


Figura 14. Monitorización dinámica de los cultivos de fibroblastos fetales porcinos tratados con SONOVUE®, usando el sistema xCELLigence. (A) Cálculo del IC_{50} (NIC frente al logaritmo de la concentración de SONOVUE® a las 20 horas post-desafío. (B) Área bajo la curva frente al logaritmo de la concentración a las 10 (línea roja), 20 (línea verde), 30 (línea azul oscuro), 40 (línea rosa) y 50 (línea celeste) horas tras el desafío.

En cuanto a la citotoxicidad, no se pudo calcular el IC₅₀ puesto que no se produjo disminución en el NIC para ninguna de las muestras, excepto en las que se sustituyó todo el medio y 150 µl (Figura 14).

Para interpretar adecuadamente los resultados de esta validación, tanto en células mesenquimales humanas como en fibroblastos fetales porcinos, hay que tener en cuenta que en este experimento de citotoxicidad y viabilidad no se aplicaron ultrasonidos a las muestras. Se han descrito daños celulares en tejidos que estaban en contacto con SONOVUE® y se les aplicó ultrasonido. Las microburbujas que hay en el contraste contienen gas y son altamente compresibles, y cuando se someten a un campo de ultrasonido las variaciones de presión hacen que se expandan y contraigan. De hecho, algo que ya se ha descrito en la literatura es la sonicación mediante microburbujas de vasos en tumores para mejorar la liberación y biodisponibilidad de determinados fármacos (Li *et al.*, 2008, Lin *et al.*, 2012). También se ha propuesto la utilización de ultrasonidos de alta intensidad como posible protocolo en el tratamiento de fibroides uterinos (Peng *et al.*, 2012). Sin embargo, en este trabajo, dado el tipo de análisis realizado y la imposibilidad de someter las muestras a ultrasonido sin producir efectos indeseables en las placas microelectrónicas, los efectos sobre la IC no se derivan de la sonicación con ultrasonidos. Esto nos indica que los efectos *in vivo* podrían haber sido más intensos que los observados en este experimento.

De cualquier manera, este ensayo nos permite recalcular el número de células inyectadas (Tabla 6), aplicando la reducción del IC encontrada en la concentración equivalente a la utilizada en la inyección *in vivo*. De hecho, se utilizó la fórmula que

aparece en la curva de regresión de la Figura 12 para recalcular el número final de células que se inyectaron en cada caso.

Tabla 6: Cálculo del número final de células inyectadas.

INYECCIÓN	CÉLULAS	NÚMERO DE CÉLULAS	Ratio células/ μ l SONOVUE®	Disminución esperada (%)	Número final de células inyectadas
4	CD34+	2×10^6	4000	12,89	1999484
5	CD34+	2×10^6	4000	12,89	1999484
6	MMO	$1,5 \times 10^6$	3000	13,65	1499590
7	MMO	2×10^6	4000	12,89	1999484
8	MCU	$10,7 \times 10^6$	21400	9,23	10698024
9	MCU	$3,5 \times 10^6$	7000	11,53	3499193
10	MCU	10×10^6	20000	9,36	9998128
11	MCU	10×10^6	20000	9,36	9998128
12	MCU	15×10^6	30000	8,63	14997410
13	MCU	15×10^6	30000	8,63	14997410
14	MCU	15×10^6	30000	8,63	14997410
15	MCU	10×10^6	20000	9,36	9998128

Se observa como la reducción en el número de células inyectadas en ningún caso supera el 14%.

La evaluación de este agente de contraste se hacía necesaria en el entorno de este experimento puesto que no se encontró en la bibliografía ninguna referencia al riesgo potencial que supone este elemento en contacto con células como las mesenquimales humanas cultivadas o los tejidos de un feto de cerdo de menos de 50 días. Sin embargo, ya que la inyección de este tipo de agentes de contraste en humanos se usa

muy frecuentemente en la práctica clínica para mejorar la visualización sonográfica, sí existen diversos estudios sobre los posibles efectos colaterales de estos agentes (De Marchi *et al.* 2011; Li *et al.* 2011). Aunque algunos estudios han demostrado que ni SONOVUE® ni los ultrasonidos causan lesiones significativas en las células endoteliales de la vena umbilical humana (Dayton *et al.* 2006; Wang *et al.* 2010), no se ha realizado ningún estudio en las células implicadas en este experimento.

Este estudio demuestra una ausencia de efectos sobre el crecimiento de fibroblastos fetales porcinos, lo que sugiere que se puede utilizar el agente de contraste sin ningún riesgo para los fetos. De hecho, los resultados reproductivos obtenidos de las camadas que terminaron en parto (descritos en apartados posteriores de este trabajo), corroboran la ausencia de peligro potencial para los fetos inyectados. Por otra parte, sí se ha observado una disminución el NIC de los cultivos de células mesenquimales humanas, aunque esta disminución alcanza su mayor dimensión a las 50-80 h tras la sustitución del medio de cultivo por el contraste sonográfico. No es de esperar que las células inyectadas *in vivo* estén durante tanto tiempo con el agente, por lo que no se espera tampoco un efecto adverso. Además, la cuantía de la disminución en el número de células es relativamente baja con respecto al número de células inyectadas. Por otra parte, el efecto podría deberse a una mayor sensibilidad de esta línea celular a la disminución de recursos en el cultivo. En cualquier caso, las diferencias observadas entre los fibroblastos y las mesenquimales indican que cualquier célula que vaya a estar en contacto con el agente en procedimientos clínicos o experimentales debería ser testada con respecto a la sensibilidad al mismo.

El uso del sistema xCELLigence supone una novedad en este tipo de evaluaciones farmacológicas. Los métodos más comunes para evaluar la citotoxicidad son los ensayos de liberación, basados en la pérdida de integridad de la membrana celular (Brunner *et al.* 1968; Denizot y Land 1983; Ishiyama *et al.* 1995), así, dentro de las 4 horas posteriores el efecto de una sustancia sobre un cultivo que provoque la lisis celular, se mide la liberación de las células premarcadas, tanto elementos radioactivos como Cromo [^{51}Cr] o Indio [^{111}In] así como otras sustancias relacionadas con el metabolismo celular como la lactato deshidrogenasa (LDH). La cantidad liberada de estas sustancias sirve para interpolar la cantidad de células que han resultado dañadas como resultado de la exposición de cultivo a la sustancia (Brunner *et al.*, 1968). Hay otros métodos alternativos como la citometría de flujo, la medición de granzima mediante ELISA o los análisis morfométricos usando microscopía (De Meyer *et al.* 2003). Sin embargo, todas estas técnicas son complejas, laboriosas y proporcionan una medición a punto final dentro de un periodo de tiempo determinado. Además, el uso de elementos radioactivos o químicos genera residuos difíciles de manejar y pueden alterar *per se* los cultivos celulares. Por el contrario, el sistema xCELLigence usado en este experimento permite un estudio dinámico, en tiempo real, sin necesidad de marcaje y que, por tanto, evita los efectos del mismo y la generación de residuo indeseables.

Además, este experimento nos permitiría calcular el número exacto de células que se inyecten en cualquier procedimiento clínico o experimental si fuera necesario, utilizando la disminución del NIC del cultivo sometido a la concentración de SONOVUE® a utilizar con respecto a un cultivo control.

Todos los resultados obtenidos indican que el uso de SONOVUE® en este procedimiento no supone ningún riesgo para los fetos de cerdo ni para las células mesenquimales humanas utilizadas.

4.1.2. Resultados ecográficos

Los fetos se localizaron fácilmente tanto en proyección longitudinal como en proyección transversal. El acceso a los fetos mediante aguja de 25g fue relativamente fácil.

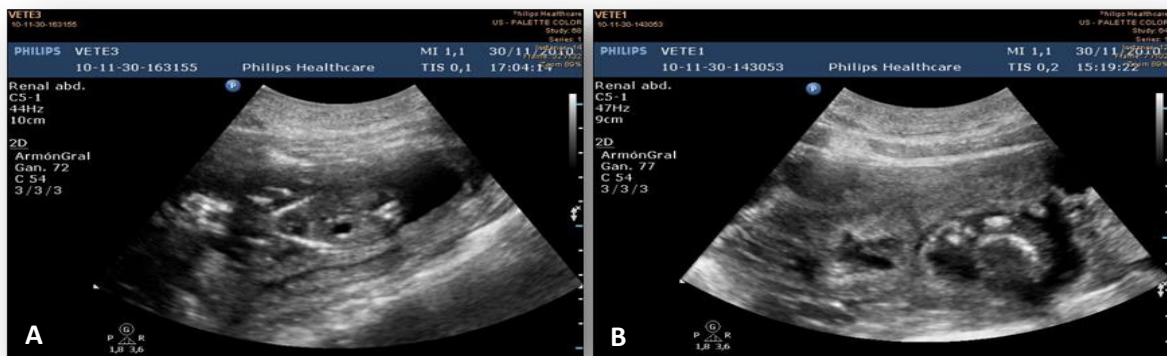


Figura 15. Imagen ecográfica de fetos de cerdo de aproximadamente 50 días de gestación en proyecciones A) Longitudinal y B) Transversal.

4.1.2.1.- Inyecciones negativas

En algunas inyecciones se observó como el material ecoico se movía de forma retrógrada a través de los vasos umbilicales hacia la placenta, tal y como se aprecia en la figura 16 (Flecha roja).

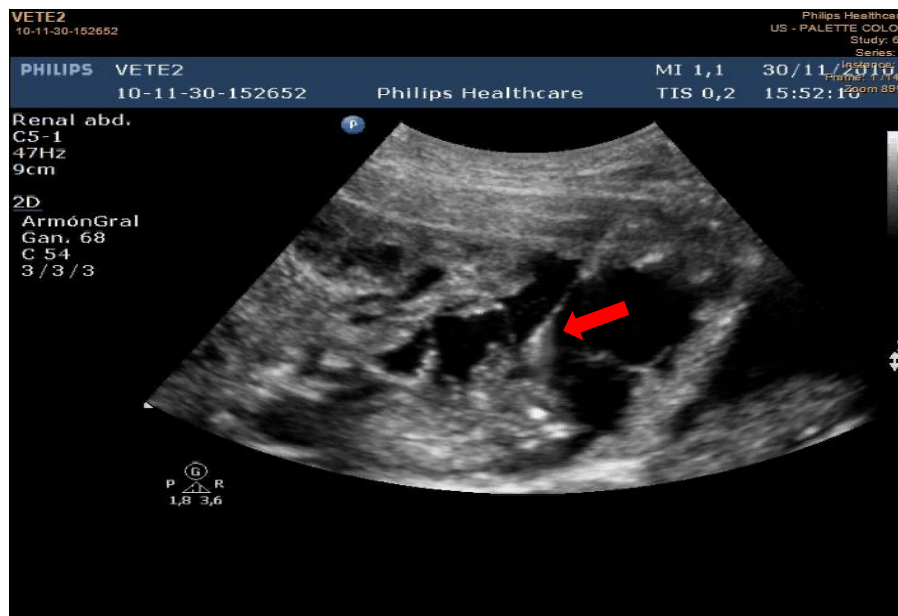


Figura 16. Imagen ecográfica correspondiente a una inyección negativa. Se aprecia como el líquido ecogénico sale del feto a través del cordón umbilical (flecha roja).

En otras inyecciones se observó como el material escapaba al espacio amniótico produciendo una nube ecogénica (Figura 17, flecha roja).



Figura 17. Imagen ecográfica correspondiente a una inyección negativa. Se aprecia como el líquido ecogénico sale al espacio amniótico (flecha roja)

Se consideraron **negativas** un 14% (8/57) de las inyecciones realizadas

4.1.2.2.- Inyecciones positivas

Se consideraron **positivas** el 86% (49/57) de las inyecciones. En todas se apreció como se producía una mancha ecogénica en la cavidad peritoneal de los fetos. En aproximadamente la mitad de las inyecciones (24/49), además se observó como el material ecogénico se distribuía por el cuerpo del feto a través de circulación aórtica (Figura 18). En las demás, el material ecogénico se quedó en el área de inyección, dentro de la cavidad peritoneal.



Figura 18. Secuencia de una inyección positiva con distribución del material ecogénico.

A. Se aprecia como el material comienza a entrar en la cavidad peritoneal del feto (Flecha roja).

B. Este material alcanza la cavidad cardiaca del feto (flecha roja).

C. Se distribuye por todo el cuerpo del feto a través de la circulación aórtica.



La inyección en cavidad peritoneal de los fetos ha demostrado ser eficaz y fiable, con un alto porcentaje de éxito. Sin embargo, algunos autores como Rubin *et al.* (2001) afirman que este tipo de inyecciones supone una desventaja puesto que las células inyectadas deben migrar posteriormente al tejido linfoide. Estos autores proponen la inyección intraportal, que permitiría un asentamiento rápido de las células en los órganos hematopoyéticos. Pese a que en los experimentos en los que se hacen inyecciones intraportales con la introducción de suero salino sí tienen éxito, cuando se inyectan células, la tasa de éxito se reduce, obteniéndose además un número de lechones con quimerismo muy bajo.

4.1.3. Resultados reproductivos

De las 15 cerdas incluidas en el experimento, siete de la línea genética Du x (LDxLW) llevaron a término la gestación produciéndose el parto, con un total de 93 lechones nacidos vivos y 11 lechones nacidos muertos. Las ocho cerdas restantes, de las cuales dos pertenecían a la línea genética Du x (LDxLW) y seis a la línea genética LD x LD, abortaron pasados pocos días de la inyección celular en útero. De estas seis últimas cerdas, dos mostraron secreción purulenta vía vaginal previamente al aborto, lo que podría indicar una causa infecciosa para dichos abortos.

El número de lechones nacidos vivos (LNV) y nacidos muertos (LNM) según la línea genética de cerdas utilizada, así como el número y el tipo de células inyectadas en cada caso, aparecen en la Tabla 7.

La tasa de partos total fue de un 46,7%. De las nueve cerdas pertenecientes a la línea genética Du x (LDxLW) sólo dos abortaron siendo la tasa de partos de un 77,77% y de las seis cerdas pertenecientes a línea genética LD x LD ninguna llevo la gestación a término por lo que la tasa de partos fue de un 0%.

Tabla 7: Resultados reproductivos, lechones nacidos vivos y muertos según línea genética de las cerdas inyectadas, número y tipo de células inyectadas.

Inyección	Línea genética	Células	Número de células	LIC	Resultado reproductivo	LNV	LNM
1	Du x (LDxLW)	Solución salina	0	4	Aborto	0	0
2	Du x (LDxLW)	SONOVUE®	0	4	Parto	10	0
3	Du x (LDxLW)	SONOVUE®	0	4	Parto	11	3
4	Du x (LDxLW)	CD34+	2×10^6	4	Parto	8	5
5	Du x (LDxLW)	CD34+	2×10^6	4	Aborto	0	12
6	Du x (LDxLW)	Mesenquimales	$1,5 \times 10^6$	2	Parto	20	0
7	Du x (LDxLW)	Mesenquimales	2×10^6	4	Parto	15	0
8	Du x (LDxLW)	UCMCs	$10,7 \times 10^6$	4	Parto	15	1
9	Du x (LDxLW)	UCMCs	$3,5 \times 10^6$	4	Parto	14	0
10	LD x LD	Mesenquimales	10×10^6	3	Aborto	0	0
11	LD x LD	UCMCs	10×10^6	4	Aborto	0	0
12	LD x LD	UCMCs	15×10^6	4	Aborto	0	0
13	LD x LD	UCMCs	15×10^6	4	Aborto	0	0
14	LD x LD	UCMCs	15×10^6	4	Aborto	0	0
15	LD x LD	UCMCs	10×10^6	4	Aborto	0	0

Donde: LIC = Lechones Inyectados por Camada; LNV = Lechones nacidos vivos; LNM = Lechones nacidos muertos

El número de LNT, LNV, LNM y LM en cada caso fue el que aparece en la Tabla 8.

Tabla 8: Resultados reproductivos en los partos que llegaron a término.

Inyección	Línea genética	Células	Número de células	LIC	LNT	LNV	LNM	LM
2	Du x (LDxLW)	SONOVUE®	0	4	10	10	0	0
3	Du x (LDxLW)	SONOVUE®	0	4	14	11	3	0
4	Du x (LDxLW)	CD34+	2 x 10 ⁶	4	13	8	5	0
6	Du x (LDxLW)	Mesenquimales	1,5 x 10 ⁶	2	20	20	0	0
7	Du x (LDxLW)	Mesenquimales	2 x 10 ⁶	4	15	15	0	0
8	Du x (LDxLW)	UCMCs	10,7 x 10 ⁶	4	18	15	1	2
9	Du x (LDxLW)	UCMCs	3,5 x 10 ⁶	4	14	14	0	0

Dónde: LIC = Lechones Inyectados por Camada; LNT = Lechones Nacidos totales por camada; LNV = Lechones nacidos vivos; LNM = Lechones nacidos muertos; LM= Lechones momificados

Varios estudios anteriores tanto en modelos de pequeños como grandes animales realizaron una inyección celular en útero con el objetivo de crear quimerismo (Qian *et al.*, 2006; Rubin *et al.*, 2001). La mayoría de estos experimentos fueron realizados con un acceso al útero mediante una laparotomía media para identificar fácilmente los fetos por medio de una ecografía apoyando directamente la sonda ecográfica en la serosa del útero. Sin embargo, este procedimiento supone una técnica quirúrgica traumática que se ha visto que da lugar a un alto porcentaje de pérdida fetal, llegando incluso al 50% (Rubin *et al.*, 2001), debido a abortos y fetos reabsorbidos, reduciendo así el número posible de obtención de cerdos quiméricos.

Para evitar las desventajas de una laparotomía media, en este trabajo se ha descrito una técnica alternativa mediante inyección celular en útero transcutánea ecoguiada sin necesidad de laparotomía ni histerectomía. Tan solo hay una descripción previa de

una técnica similar en ovejas con el objetivo de disminuir la pérdida fetal descrita anteriormente por otros estudios (Young *et al.*, 2003).

La tasa de partos del 77,77% en la línea genética Du x (LDxLW) estuvo en consonancia con el estudio publicado por Rubin *et al.* (2001) que, utilizando la misma especie como animal receptor, tuvieron una tasa de partos del 75%, aunque estos investigadores inyectaron la totalidad de los fetos de cada camada. Fujiki *et al.* (2003), usando una técnica de laparotomía e inyección transmural uterina, documentan una tasa de partos del 28%, mientras que con una técnica transcutánea obtuvieron una tasa de partos del 73%, muy similar a la obtenida en este experimento. En este último procedimiento los autores inyectaron un número similar de lechones al que se ha inyectado en el presente estudio (2-4 por camada).

El hecho de que las cerdas Landrace puras hayan tenido una tasa de partos del 0% podría explicarse por una mayor sensibilidad de los genotipos puros comparados con los cruces. De hecho, en la GDV, utilizando el genotipo Landrace para otros procedimientos como la transferencia de embriones, también se produjeron pérdidas de todas las gestaciones (Profesor E. Martínez, grupo de Reproducción Animal de la Universidad de Murcia, comunicación personal). Una explicación podría ser que las razas puras se han fijado mediante reproducción en consanguinidad lo que lleva aparejado una disminución de la heterosis y consecuentemente un aumento de la homocigosidad. En porcino, los efectos directos de este fenómeno, denominado depresión por consanguinidad, son más evidentes en los caracteres con menor heredabilidad entre los que se encuentran los caracteres reproductivos (Rothschild, 1996). Las líneas más consanguíneas tienen una fertilidad mucho menor y la tasa de

supervivencia de los lechones está reducida (Johnson, 1990). Por tanto, no es extraño que el impacto de los procedimientos de inyección intrauterina sea mucho mayor en las cerdas de raza pura cubiertas con verracos de la misma raza en comparación con los animales donde se cruzaron tres razas y que, por tanto, tienen un vigor híbrido muy superior. Por otra parte, según Fujiki *et al.* (2003) en una serie de implantes usando células CD34+, mononucleares libres de linfocitos o mononucleares totales, encontraron más mortalidad embrionaria y abortos en aquellas gestaciones donde se inyectaron mononucleares totales. Esto sugiere que también podría haber algún tipo de rechazo injerto frente a huésped, aunque los autores no pueden establecer una relación negativa entre la dosis de linfocitos T introducida y la mortalidad fetal. En nuestro experimento, en todos los casos que acabaron en aborto de las cerdas Landrace se habían inyectado entre 10 y $15 \cdot 10^6$ células mononucleares totales de cordón umbilical. Sin embargo, también se produjo un aborto en una cerda con número bajo de células CD34+ inyectadas (sin linfocitos) y la inyección nº 8, con $10,75 \cdot 10^6$ células, terminó en parto normal con un alto número de lechones nacidos. No obstante, el número de células inyectadas por estos autores es dos exponenciales superiores a la que hemos utilizado en este experimento.

Además, tampoco sería descartable una mayor susceptibilidad a los patógenos infecciosos que potencialmente puedan ser introducidos durante el procedimiento de inyección celular intrauterina. De hecho, dos de las cerdas Landrace puras mostraron secreciones purulentas lo que es característico de abortos infecciosos. Las causas más probables son infecciones intrauterinas por diversas bacterias como *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella* sp., *Eryshipelotreib rhusiopathiae*, *Pseudomona areuginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus*

equisimilis, *Bacillus* sp. o *Salmonella* sp. (Straw *et al.*, 2009). Menos probable serían infecciones sistémicas por *Brucella* sp.

4.1.3.1.- Datos productivos

La tasa de partos en las cerdas sometidas a tratamiento fue alta y la prolificidad fue muy elevada en todos los casos, con una media de 14,85 LNT y 13,28 LNV por cerda. Los datos productivos se encontraban dentro de la normalidad (Tabla 9) del tipo de cerda utilizada e incluso algo superiores a las medias registradas en la GDV.

Tabla 9: Datos productivos.

LNT	LNT/parto	LNV	LNV/parto	LNV/camadas inyectadas	LM	LM/parto
104	14,85	93	13,28	72	11	1,7

Dónde: LNT = Lechones Nacidos totales; LNV = Lechones nacidos vivos; LNM = Lechones nacidos muertos; LM= Lechones momificados

Los datos publicados para Dinamarca, país en el que más del 90% de las cerdas utilizadas corresponden al genotipo usado en este experimento para el año 2010 fue de 14,5 LNV (Bpex, 2012), por lo que los lechones obtenidos en este protocolo experimental estuvieron dentro de los parámetros normales para el genotipo de cerdas usadas.

Estos datos indican que la inyección transcutánea ecoguiada *in utero* de células no alteró la gestación de los animales y las cerdas no mostraron ningún problema sanitario relacionado con el proceso de la inyección celular.

En cuanto a la presencia de lechones momificados, es un evento común en granjas porcinas, por lo que el hallazgo de dos lechones momificados en la inyección 8 sería normal, puesto que en las inyecciones restantes no se encontró ninguno.

La mayoría de animales registrados como *muerte perinatal* correspondieron a lechones con menos de 800 gr de peso al nacimiento que, en general, tienen menor viabilidad que los lechones que nacen con un peso superior y tienen mayor probabilidad de sufrir aplastamiento por parte de su madre, como así ocurrió.

4.2. DETECCIÓN DE LECHONES QUIMÉRICOS

4.2.1. Citometría de flujo para identificación de células HLA I A, B o C.

4.2.1.1.- Citometría de flujo para identificación de células HLA I A, B o C a los lechones nacidos vivos a los 15 días de edad

Se testaron 58 animales de los cuales 13 (22,41%) resultaron positivos para la presencia de células HLA I. El rango de células quiméricas estuvo entre el 0,3 y el 2,4%, tomando todas las células analizadas. Sin embargo, el mayor porcentaje de células positivas correspondió en todos los casos a monocitos, donde el rango de células positivas estuvo entre el 2,4 y el 10%. Este porcentaje fue muy inferior en las subpoblaciones de linfocitos estando entre el 0,1 y el 2,7% (Tabla 10). El control positivo humano mostró un 99,6% para monocitos y un 10,5% para linfocitos por cada 20.000 células contadas. El control negativo tuvo un resultado medio de 0,1% para ambos tipos de células. Aunque las muestras de sangre contenían los tres grupos celulares principales: linfocitos, monocitos y granulocitos, sin embargo, la región correspondiente a éstas últimas células no estaba presente posteriormente al análisis,

posiblemente porque se produjo la pérdida de los mismos durante el procedimiento de aislamiento de PBMC como ya ha sido documentado previamente (Metes *et al.*, 2003).

Los 13 animales resultantes positivos (18,05% de los animales nacidos de las camadas inyectadas) pertenecieron únicamente a la inyección 7 (cuatro animales positivos) y a la inyección 9 (nueve animales positivos). Cabe destacar que en la inyección 9 sólo se inyectaron cuatro lechones, por lo que la detección de células positivas en nueve lechones indica que hubo tránsito de dichas células entre hermanos de camada.

Tabla 10: Resultados medios de la citometría de flujo para detectar células con HLA I humano en las muestras tomadas a los 15 días de vida.

animal	Inyección	cerda	SEXO	CF_linf	CF_mono	CF_total
47674	7	1104	H	3	1,3	9,4
50156	7	1104	H	1,7	8,3	2,8
50613	9	1105	H	1,1	5,2	1,4
52223	9	1105	H	0,9	9,5	1,9
52317	9	1105	H	2,7	18	4,2
54732	9	1105	M	1,4	10	2,8
56075	9	1105	H	0,6	8,5	2,5
56863	9	1105	M	0,8	14,2	4,1
60354	7	1104	M	4,6	11,2	6,1
63298	9	1105	H	3,7	11,9	5
66510	9	1105	M	1,3	8,3	1,9
67023	9	1105	M	3,7	9	5,1
71976	7	1104	H	8,8	15,5	10,6

Del total de los animales a los que se les detectaron células con HLA I humano, ocho fueron hembras (61,5%) y cinco machos (38,5%). No hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros dependiendo del sexo. Las Figuras 19 y 20 muestran los gráficos ofrecidos por el programa del citómetro (Cytomix system) para la cantidad de monocitos y linfocitos detectados por 20.000 células, respectivamente.

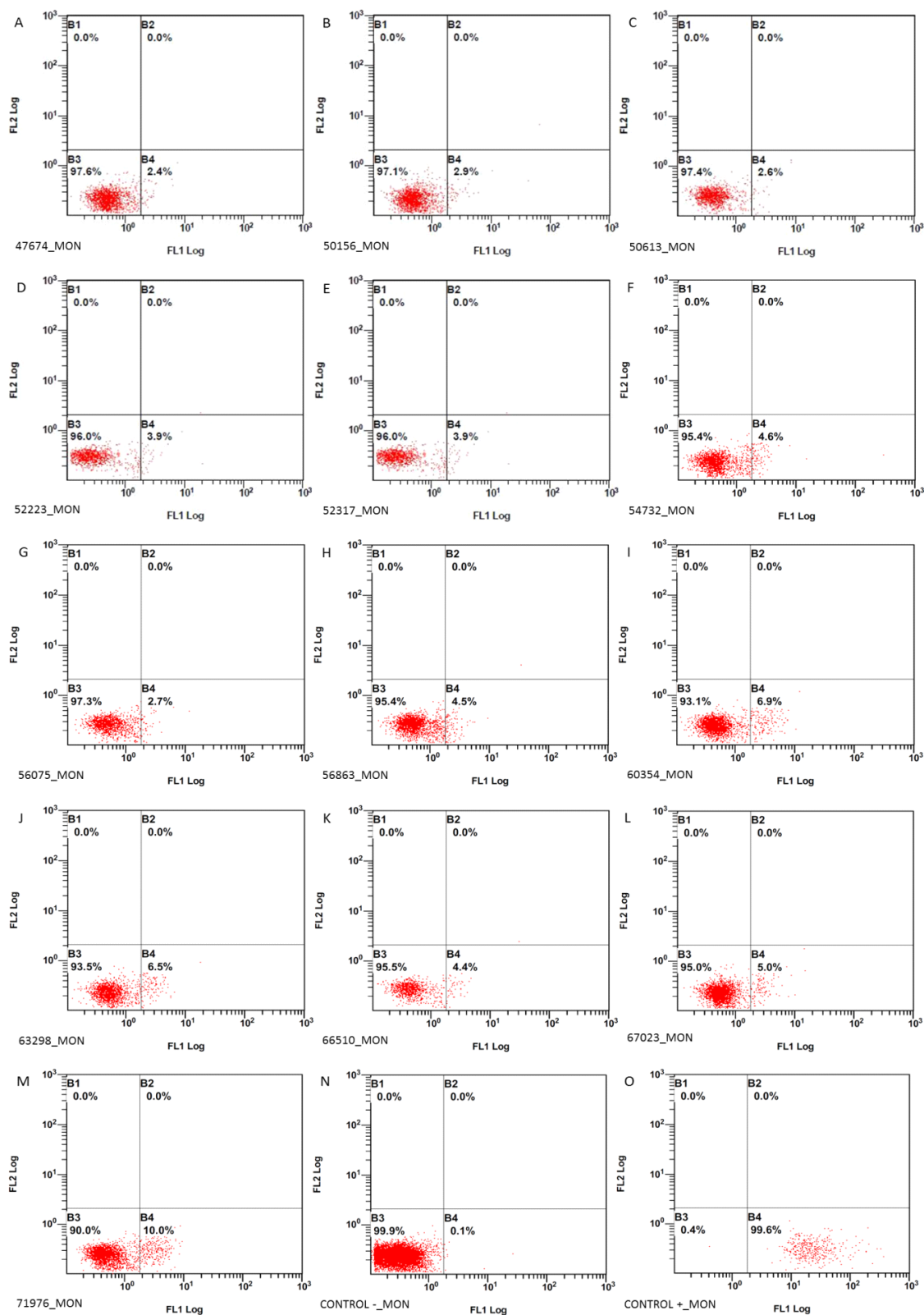


Figura 19: Citometría de flujo correspondiente a la subpoblación de monocitos en la primera toma de muestras para los animales A) 47674; b) 50156; C) 50613; D) 52223; E) 52317; F) 54732; G) 56075; H) 56863; I) 60354; J) 63298; K) 66510; L) 67023; M) 71976; N) Control negativo (cerdo normal) y O) Control positivo (humano).

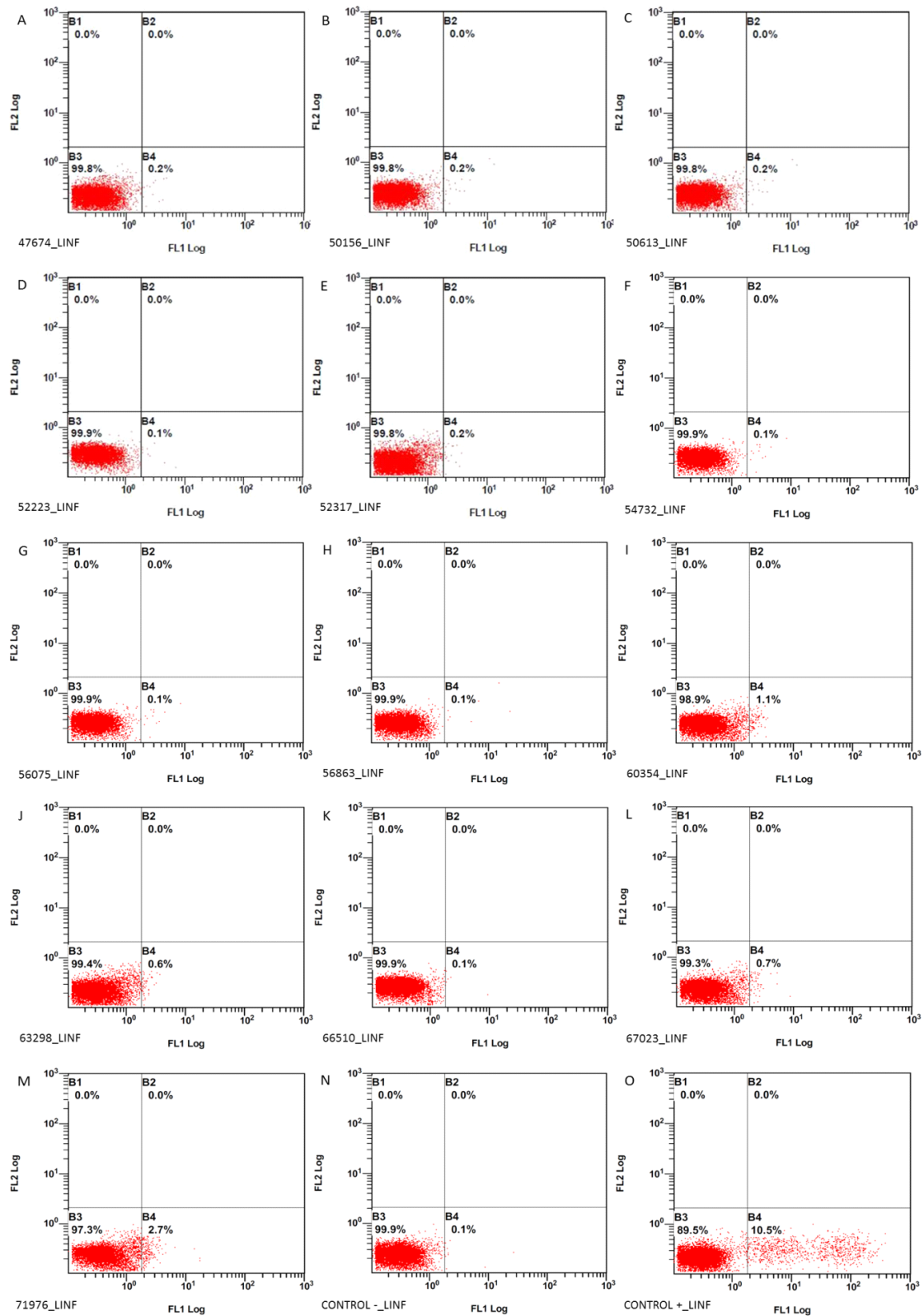


Figura 20: Citometría de flujo correspondiente a la subpoblación de linfocitos en los animales A) 47674; B) 50156; C) 50613; D) 52223; E) 52317; F) 54732; G) 56075; H) 56863; I) 60354; J) 63298; K) 66510; L) 67023; M) 71976; N) Control negativo (cerdo normal) y O) Control positivo (humano).

Los niveles de quimerismo fueron similares o incluso superiores a los estudios anteriormente realizados en la misma especie porcina utilizando técnicas de inyección celular más traumáticas (Mathes *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 2001), aunque comparado con otros estudios, nuestros niveles de quimerismo fueron menores (McConico *et al.*, 2011). Un factor a tener en cuenta es el número de células inyectado, ya que el propósito de este trabajo era utilizar un número bajo de células. Así, casi todos los trabajos publicados utilizan un número mayor de células: $5 \cdot 10^8$ en el experimento de Mathes *et al.* (2001), entre $3,9 \cdot 10^5$ y $2,4 \cdot 10^8$ en el caso de Fujiki *et al.* (2003) o $1,5 \cdot 10^8$ a $1,5 \cdot 10^9$ en el estudio de Rubin *et al.* (2011). Sin embargo, ninguno de los autores documenta tasas de quimerismo superiores a la de este experimento. De hecho, Rubin *et al.* (2011) encontraron quimerismo en PBMCs en un solo animal de ocho inyectados, con un nivel de quimerismo de 0,95% células positivas. Los demás animales seguían reactivos en pruebas de microlinfocitotoxicidad. Mathes *et al.* (2001) encontraron un porcentaje de células quiméricas de entre el 0,17 y el 1% en el 64% de los lechones inyectados.

En cualquier caso, el nivel de quimerismo descrito por McConico *et al.* (2011) está entre el 0,1 y el 0,001% de las células incluidas en los cortes histológicos, aunque obtienen quimerismo sanguíneo en todos los animales inyectados y en el 78% de los no inyectados.

4.2.1.2. Citometría de flujo para identificación de células HLA I A, B o C a los dos meses de edad.

De los 13 animales positivos a la citometría de flujo realizada a los 15 días de edad, ninguno resultó positivo a la citometría realizada a los dos meses de edad (Tabla 11).

Tabla 11: Resultados medios de la citometría de flujo para detectar células con HLA I humano en las muestras tomadas a los dos meses de vida.

animal	Inyección	cerda	SEXO	CF_linf	CF_mono	CF_total
47674	7	1104	H	0	1	0,1
50156	7	1104	H	0,1	1,5	0,2
50613	9	1105	H	0	1	0,3
52223	9	1105	H	0,1	3	0,2
52317	9	1105	H	0,1	1,4	0,3
54732	9	1105	M	0	1	0,2
56075	9	1105	H	0,1	0,5	0,1
56863	9	1105	M	0	0,4	0,1
60354	7	1104	M	0,3	0,8	0,7
63298	9	1105	H	0,1	0,9	0,2
66510	9	1105	M	0,1	0,6	0,1
67023	9	1105	M	0,1	0,8	0,2
71976	7	1104	H	0,1	0,3	0,1

En este caso el control negativo fue positivo para el 3,7 y el 0,5% de los monocitos y linfocitos, respectivamente. Esto evidencia que ninguna de las muestras fue positiva y que, por tanto, no se encontró ninguna célula con HLA I humano en superficie por cada 20.000 células contadas. Las Figuras 21 y 22 muestran los gráficos ofrecidos por el programa del citómetro (Cytomix system) para la cantidad de monocitos y linfocitos detectados por 20.000 células, respectivamente.

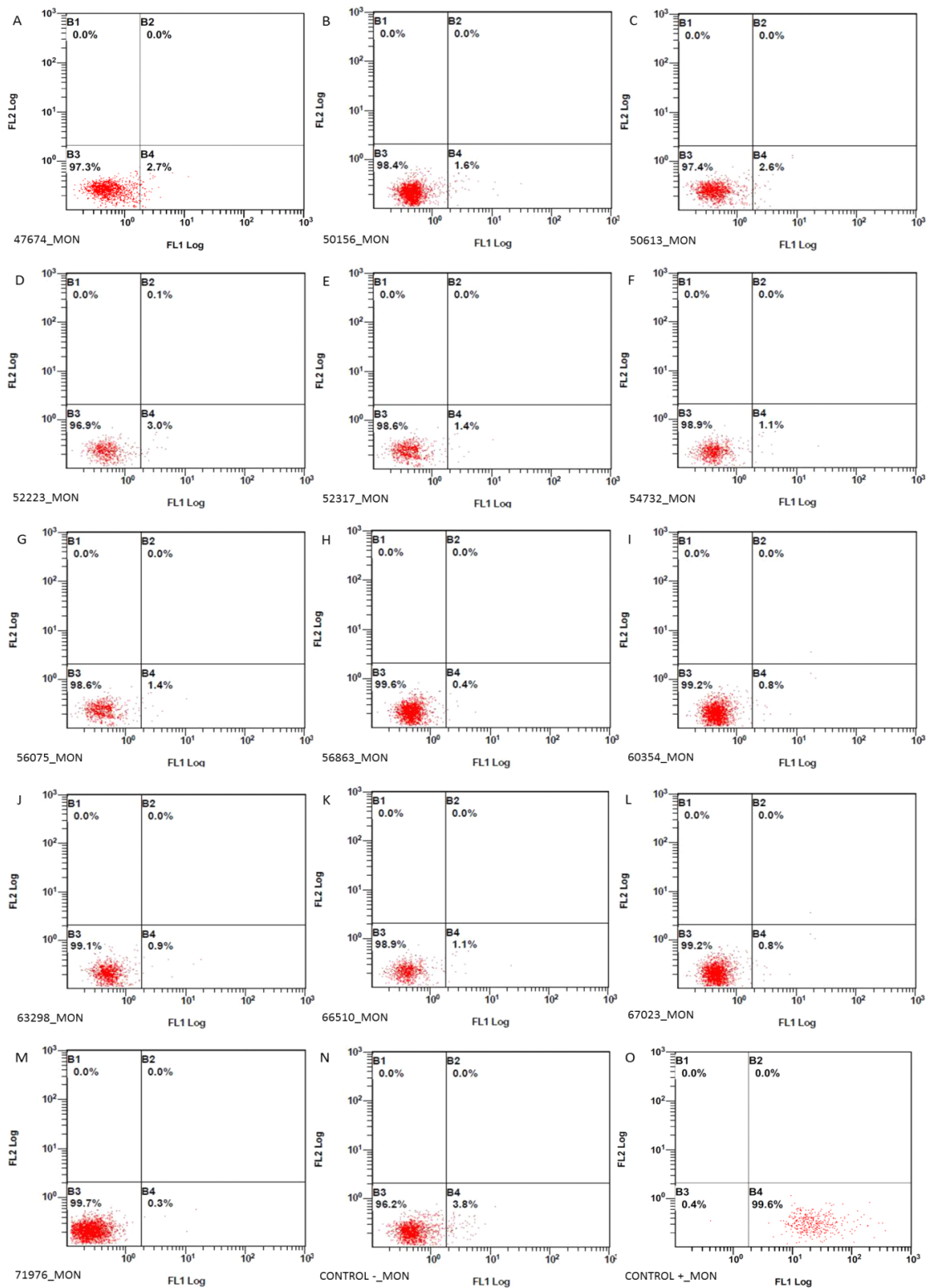


Figura 21: Citometría de flujo correspondiente a la subpoblación de monocitos en la segunda toma de muestras para los animales A) 47674; b) 50156; C) 50613; D) 52223; E) 52317; F) 54732; G) 56075; H) 56863; I) 60354; J) 63298; K) 66510; L) 67023; M) 71976; N) Control negativo (cerdo normal) y O) Control positivo (humano).

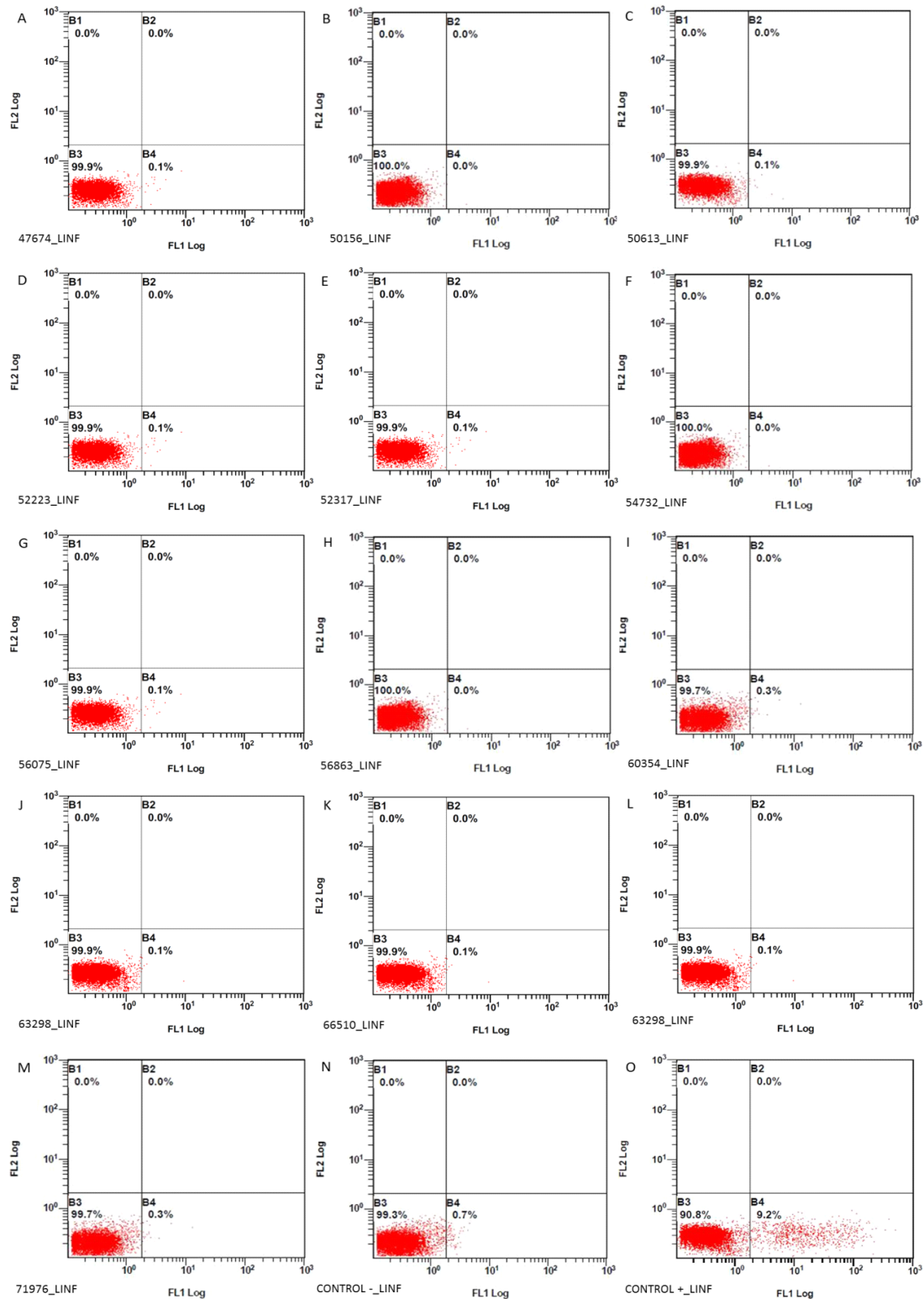


Figura 22: Citometría de flujo correspondiente a la subpoblación de linfocitos en la segunda toma de muestras para los animales A) 47674; b) 50156; C) 50613; D) 52223; E) 52317; F) 54732; G) 56075; H) 56863; I) 60354; J) 63298; K) 66510; L) 67023; M) 71976; N) Control negativo (cerdo normal) y O) Control positivo (humano).

La ausencia de células positivas frente a HLA I A, B o C mediante citometría de flujo en el análisis realizado a los dos meses posteriores al nacimiento demostraría la desaparición de las células quiméricas o humanas con el paso del tiempo. Estudios anteriores realizados en ratas y en humanos observaron que el quimerismo temprano disminuía con el tiempo y se convertía en indetectable a los seis meses en la mayoría de los receptores de órganos (Murase *et al.*, 1993; Schlitt *et al.*, 1994; Metes *et al.*, 2003). El hecho de que, en el presente trabajo, además, la mayor cantidad de células humanas detectadas eran monocitos, podría explicar la pérdida más rápida de quimerismo comparado con otros trabajos, debido a que estos tienen una vida media más corta que los linfocitos. Así, un estudio realizado por McConico *et al.* (2011), documenta una duración del microquimerismo inducido por la inyección de células STEM *in utero* en cerdos, de hasta 2 años después del nacimiento en el 100% de los lechones inyectados, mientras que en los lechones no inyectados encuentran quimerismo en el 78% al nacimiento y el 64% al sacrificio. Esto podría ser debido a que los autores cocultivan las PBMC aisladas de los cerdos con Virus Epstein-Barr (EBV), un herpesvirus oncogénico que produce una proliferación de los monocitos presentes en las PBMCs procedentes de los lechones, tal como habían descrito anteriormente Davies *et al.*, (2010). Este virus producirá proliferación de las células humanas de forma específica sin que lleguen a aumentar las células de cerdo (Ogle *et al.*, 2004), facilitando así la detección de células, aun así, encontraron el mayor nivel de quimerismo a las dos semanas del nacimiento produciéndose una disminución exponencial de este. Este método no proporciona una idea realista de la proporción de células quiméricas presentes, además de no reflejar la realidad del estado fisiológico del microquimerismo, ya que se produjo un agotamiento de las células T,

como describió previamente Ogle *et al.* (2004). El uso de esta técnica podría mejorar el rendimiento de las técnicas de detección, pero no permitiría evaluar la bondad de los lechones como donantes en ningún caso. Fujiki *et al.* (2003) detectaron quimerismo tras la inyección de células CD34+ entre 32 y 315 días post-implantación en los fetos utilizando una PCR clásica para el gen *Alu* humano, con una media de 100 ± 59 días post-inyección. Sin embargo, estos autores también refieren una presencia muy baja de células humanas, a pesar de haber inyectado citocinas humanas junto con las células para mejorar el ambiente de las células en el interior de los fetos. Otros estudios realizados en ratas y en humanos observaron que el quimerismo temprano disminuía con el tiempo y se convertía en indetectable a los seis meses en la mayoría de los receptores de órganos (Murase *et al.*, 1993; Schlitt *et al.*, 1994; Metes *et al.*, 2003).

4.2.2. Determinación de la presencia del gen Alu-Yb8 humano

4.2.2.1.- Evaluación de la PCR cuantitativa para el gen Alu-Yb8 humano

Se registraron diferentes valores de Ct para diferentes concentraciones de pares de primers. De hecho, hubo una diferencia de más de tres exponenciales entre los valores de Ct para las diferentes concentraciones (Tabla 12).

Por otro lado, existía una correlación entre las Ct para cada concentración de primers y para cada número de copias de ADN, lo que significaba que la Ct aumentaba linealmente en función de la concentración de cebador o primers.

Después de probar diferentes concentraciones de primers, se llegó a la conclusión que la mayor correlación para la curva estándar se producía cuando se utilizaba la concentración de primers 100/100 nM ($r^2=0,899$; $P=0,001$); Por lo tanto, esta concentración fue la utilizada en todas las reacciones de amplificación.

Con la concentración de primer 100/100 nM se consiguieron detectar 10 copias de ADN humano, mientras que con el uso de otras concentraciones de primers (50/50 nM, 150/150 nM y 300/300 nM) la concentración mínima de ADN humano detectada estaba en el rango de 10 a 100 copias.

Tabla 12: Valores promedio y desviación estándar (DS) de las Ct para diferentes concentraciones de primers y copias de ADN.

CONCENTRACIÓN	50/50		100/100		150/150		300/300	
COPIAS ADN	PROMEDIO Ct	DS Ct	PROMEDIO Ct	DS Ct	PROMEDIO Ct	DS Ct	PROMEDIO Ct	DS Ct
10000000	26,99	1,47	19,12	0,001	17,13	0,102	15,44	0,026
1000000	31,27	1,42	22,02	0,099	20,13	0,511	18,21	0,043
100000	37,44	1,77	27,12	0,254	24,64	0,041	22,45	0,011
10000	39,52	1,9	30,36	0,383	28,15	0,655	25,83	0,11
1000	>40		33,43	0,199	29,51	0,153	27,25	0,09
100	>40		33,65	0,595	30,13	0,438	28,06	0,085
10	>40		34,47	0,143	30,29	0,199	28,14	0,043
r²	0,737		0,899		0,857		0,868	
P	0,013		0,001		0,003		0,002	

Los valores de eficiencia para la qPCR variaron de 1,87 a 2,04 para las nueve amplificaciones.

Los resultados para las mezclas de ADN humano y porcino aparecen en la Tabla 13. Se observó que las concentraciones más altas de ADN porcino produjeron amplificaciones inespecíficas obteniendo un valor promedio para Ct de $37,12 \pm 1,18$ ciclos.

Por otro lado, una disminución en el contenido de ADN porcino se asoció a un aumento en el valor de la Ct, por lo que pequeñas cantidades de ADN porcino no se pudieron detectar (muestras 5 y 6).

En las muestras que contenían ADN humano (muestras 7 al 12) o una mezcla de ADN humano y porcino (muestras 13 al 16), la aparición de un aumento de Ct se asoció con una disminución en el contenido de ADN, que apuntaba a una fuerte relación lineal entre la fluorescencia emitida y el número de copias de ADN.

Además, si se comparan las muestras que contenían 1 μg , 1 ng, y 1 pg de ADN humano, o una mezcla de ADN humano y porcino, se observa cómo se producía una desviación en el valor del Ct obtenido, a excepción de las muestras que contenían 1 μg de ADN.

La disminución de Ct fue exponencial para 1 ng y 1 pg de ADN humano cuando se mezcló con ADN de cerdo. Cuando la cantidad de ADN humano en las muestras mixtas era alto no había disminución para el valor de Ct.

Tabla 13: Resultados para diferentes mezclas de ADN porcino y ADN humano.

MUESTRA	ADN HUMANO	ADN PORCINO	Ct	SD Ct	Mean Qty	Tm
MUESTRA 1	0	1 µg	37,113	0,98	57,99	87,2
MUESTRA 2	0	10 ng	37,25	1,24	50,123	87,2
MUESTRA 3	0	1 ng	37,55	1,31	46,3	87,2
MUESTRA 4	0	100 pg	39,19	1,18	12,78	87,2
MUESTRA 5	0	10 pg	Negativo			70,5
MUESTRA 6	0	1 pg	Negativo			70,5
MUESTRA 7	1 µg	0	16,6669	0,315	2,04E+09	86,6
MUESTRA 8	100 ng	0	18,9276	1,1	1,42E+08	86,6
MUESTRA 9	10 ng	0	21,4026	0,866	1,79E+07	86,6
MUESTRA 10	1 ng	0	21,5217	0,578	1,32E+07	87,2
MUESTRA 11	100 pg	0	24,4987	0,0644	9,92E+05	87,2
MUESTRA 12	10 pg	0	28,2821	0,319	6,47E+04	87,2
MUESTRA 13	1 pg	0	32,7699	0,782	2,93E+03	87,6
MUESTRA 14	1 pg	1 µg	35,9129	0,169	147.587	87,6
MUESTRA 15	1 ng	1 µg	25,8242	0,608	2,65E+05	87,6
MUESTRA 16	1 µg	1 pg	16,3228	0,0462	4,72E+08	87,2
MUESTRA 17	1 µg	1 ng	16,3581	0,0763	4,91E+08	87,2

Las curvas de disociación mostraron una forma bimodal, con un doble pico (Figura 23).

El primer pico se encontraba en $84,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ y el segundo a $89,6 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$.

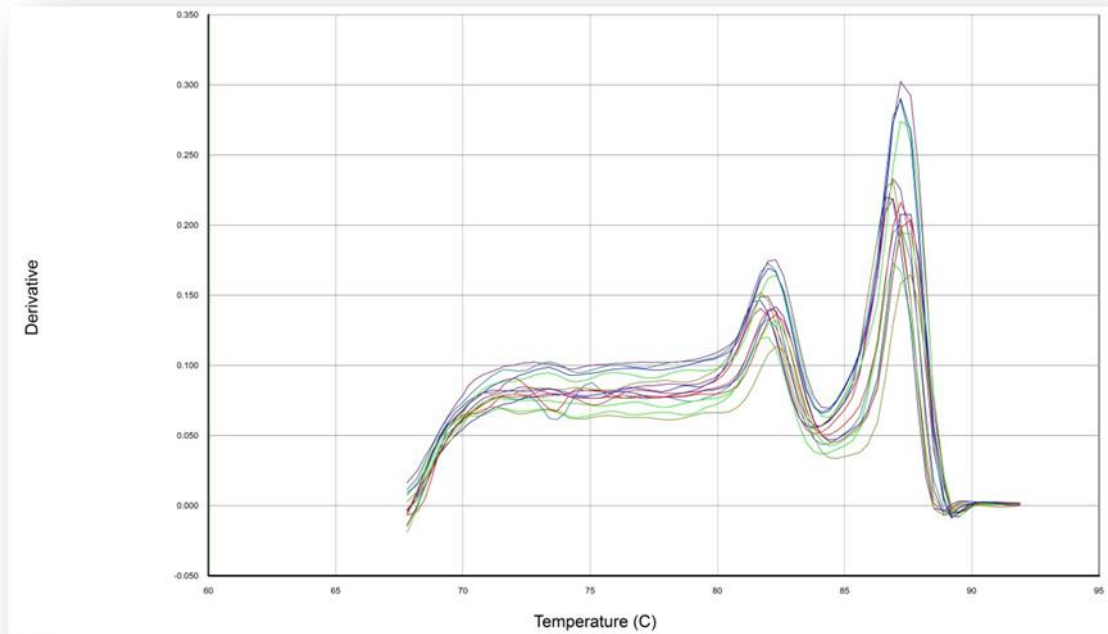


Figura 23: Curva de disociación bimodal obtenida para la q-PCR de Alu-Y8.

Para descartar amplificaciones inespecíficas o dímeros de primers, se trató de optimizar las condiciones de PCR aumentando y disminuyendo las concentraciones de primers, sin embargo, tras este intento, ninguno de los dos picos desapareció.

No obstante, en la evaluación de los productos de la PCR por medio de electroforesis en gel, aparece sólo una banda de 226 pb, siendo este el tamaño del amplicón esperado (Figura 24).

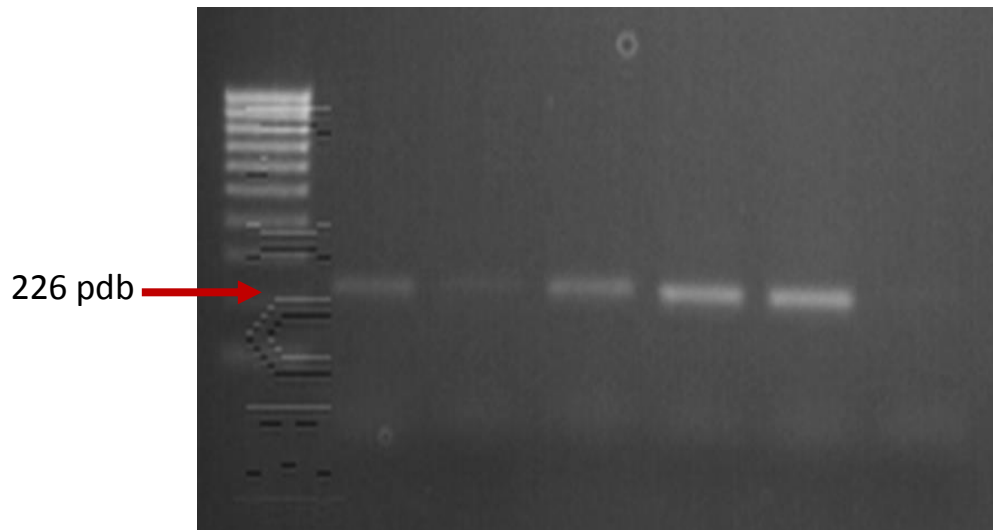


Figura 24. Gel de electroforesis de los productos de PCR en tiempo real. El tamaño esperado era de **226 pares de bases.**

En cuanto a la secuenciación de los amplicones, ninguna de las secuencias coincidía con una secuencia porcina, pero todas ellas estaban emparejadas con secuencias humanas o de primates. Además, hubo una completa alineación con las secuencias de repetición de Alu humano (con un valor E promedio de $3E-85$ y un promedio de identidad del 97%; Tabla 14).

Se tomaron aleatoriamente cuatro muestras que resultaron positivas y se secuenció el amplicón para asegurar que el obtenido era el esperado y que no correspondía con ninguna secuencia descrita para el cerdo, utilizando la herramienta de alineamiento BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabla 14: Secuenciación de amplicones de gen *Alu* humano.

ID	Secuencia	Max identificación con <i>H. sapiens</i>
Secuencia 1	NNNNNNNNNNNNNNNNNTCTCNGNNNNNGCANGCTCCGCTTCNNNNNNNNNNNNCCNTTC TCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACNACAGGCGCCCGCCACCGCGCCCGGCTAATTTTT GTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCTTGTTAGCCAGGATGGTCTCNATCTCCTGACCTCATGA TCCACCCGCCTCG	99-100%
Secuencia 2	CNNNNNNNTGGCGCANTCTCGGCNNNNNCANGCTCCGCTTCCCGGNNNNNCCATTCTCCT GCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCCGCCACCGCGCCCGGCTAATTTTTGTAT TTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCTTGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTCATGATCCA CCCGCTCN	96-100%
Secuencia 3	NNNNNNNTGGNNNNNTCTCGNNNNNNCANGCTCCGCTTCCCGGTTNNNNNCCATTCTCCTG CCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCCGCCACCGCGCCCGGCTAATTTTTGTATTT TTAGTAGAGACGGGGTTTCACCTTGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTCATGATCCACC CGCCTCN	97-100%
Secuencia 4	CNNNNNNNNNGCNNNNNCNCGNNNNNNCANGCTCCGCTTCCCGGNNNNNCCNTTCTCC TGCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACNACAGGCGCCCGCCACCGCGCCCGGCTAATTTTTGTAT TTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCTTGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTCATGATCC ACCGCCTCGA	95-100%

En los cuatro casos, la secuencia correspondió a genes descritos para el humano y no se encontró ninguna homología con las secuencias descritas para el cerdo en GenBank. Se observó cómo al obtener el árbol filogenético, las secuencias enclustaban perfectamente con las secuencias descritas para el fragmento de *Alu* humano (Figura 25).

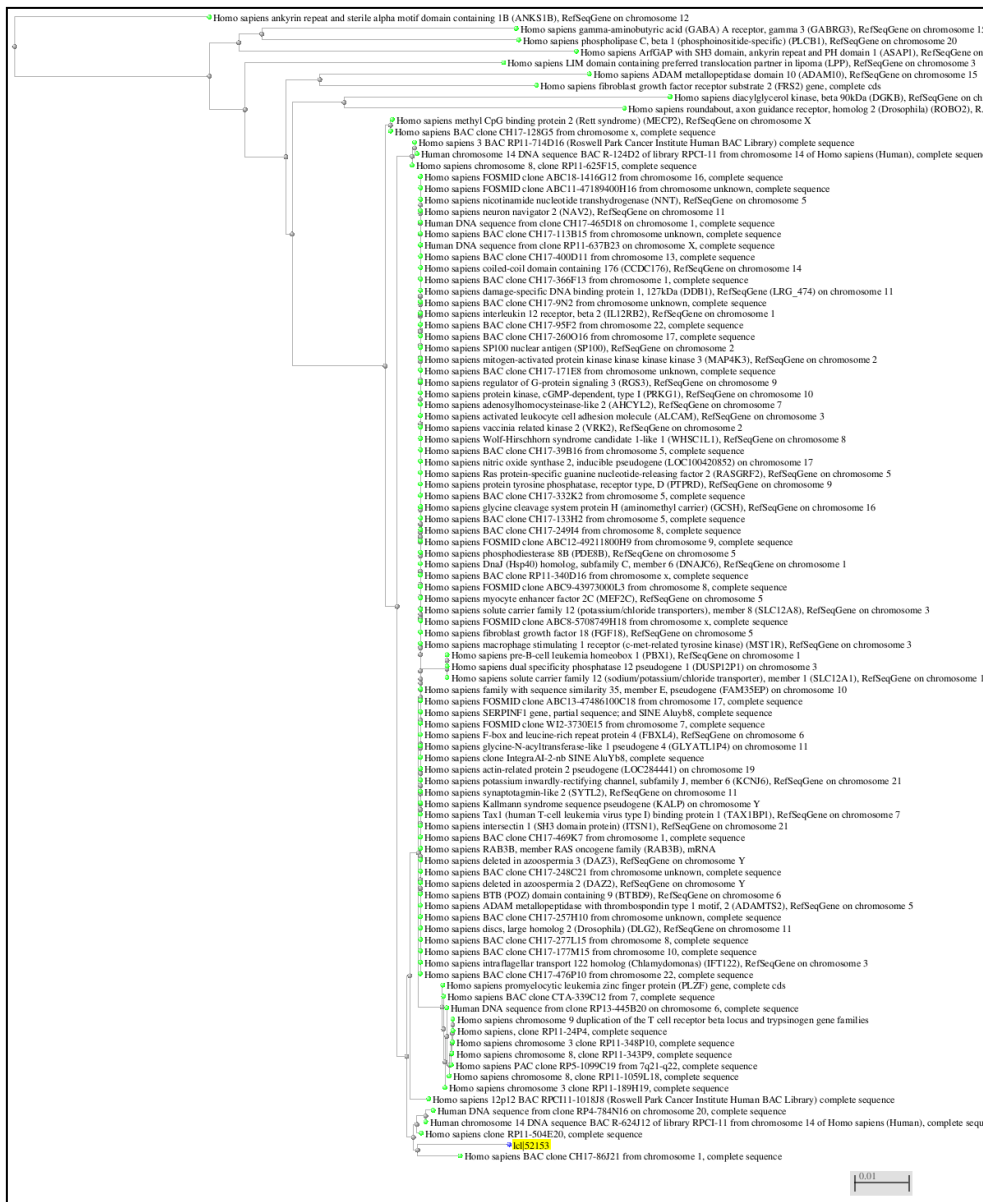


Figura 25. Árbol filogenético obtenido de BLAST donde se encuadra las secuencias del amplicón con las secuencias humanas.

Estudios anteriores ya sugerían que métodos basados en PCR a tiempo real podían facilitar la detección y cuantificación de pequeñas cantidades de células donantes humanas en tejidos de ratones receptores (Song *et al.*, 2012). Sin embargo, otros experimentos previos basados en esta técnica mostraban limitaciones de

consideración debido a las variaciones técnicas entre laboratorios y la baja reproducibilidad demostrada (Nitsche *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2002). Además, otro factor a tener en cuenta es la ubicuidad de genes relacionados con la familia *Alu* y, por tanto, la posibilidad de obtener amplificaciones inespecíficas o interferencias en la cuantificación de dicho gen por la presencia de otro ADN no humano.

En el presente trabajo, los primers diseñados por Walker *et al.* (2003) han demostrado su capacidad para detectar cantidades tan pequeñas como 1 pg de ADN genómico humano en una mezcla que contenía hasta 1 mg de ADN porcino, lo que demuestra una alta sensibilidad de la técnica. La amplificación inespecífica de ADN porcino mostró una Ct superior a la previamente reportada por los autores, ya que en este trabajo el ADN porcino en ausencia de ADN humano amplificó entre el ciclo 37 y el 39, mientras que Walker *et al.* (2003) documentaron una amplificación inespecífica en 25 ciclos. El cálculo de este valor de Ct nos permitió seleccionar un valor de corte subjetivo para los ensayos de amplificación a tiempo real. Generalmente, cuando se obtiene un valor para la Ct, el resultado de la prueba debería considerarse positivo. Sin embargo, existe una tendencia creciente entre laboratorios en considerar que es negativo (es decir, *falsos positivos*) cualquiera de los valores de Ct por encima de un valor de corte arbitrario para la misma (Caraguel *et al.*, 2011), asumiendo que el valor de la Ct se genera debido a las amplificaciones inespecíficas causadas por el ruido de fondo de los ácidos nucleicos. En este caso, se fijó como punto de corte para el valor de Ct en 36 ciclos, considerando todas las muestras amplificadas por encima de este valor como *falsos positivos*, aunque en todos los casos se introdujo una muestra sólo con ADN de porcino para que indicara en cada prueba concreta un punto de corte.

En el presente ensayo, los análisis de las curvas de disociación mostraron dos picos separados, lo que podría ser explicado por las amplificaciones inespecíficas y, por tanto, la generación de varios amplicones de distintos tamaños. Este punto quedó descartado al realizar electroforesis y comprobar que sólo había una banda en los geles de migración. Sin embargo, puede haber otros motivos para la aparición de una curva de disociación bimodal. Uno de ellos es que los fragmentos de ADN bicatenario grandes (> 200 pdb) pueden contener varios puntos de fusión (Dorak *et al.*, 2006). Sin embargo, otros autores han encontrado dos picos en la curva de disociación de un solo producto de PCR menor de 200 pdb (Abtahi *et al.*, 2011). La explicación puede estar en las diferencias internas de las secuencias (alto contenido en G:C de una mitad del amplicón frente a la otra) que dan lugar a diferencias en la fusión. En este trabajo, un análisis de la secuencia por medio del software Oligocalc (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html) reveló un desequilibrio en el contenido en G:C comparando la primera mitad del amplicón (53% de contenido en G:C) con la segunda mitad (63%), lo que resultó una diferencia de 5° C en la curva de disociación. Además, puesto que la aparición de esta curva bimodal fue constante en todos los experimentos, se consideró como específica para el fragmento *Alu* amplificado en este ensayo. De hecho, la T_m más alta coincide con la descrita por Walker *et al.* (2003).

En cuanto a las posibles alteraciones en la cuantificación de *Alu* humano derivado de la presencia de ADN humano, el presente trabajo demuestra que hay una subcuantificación (hasta 1 exponencial inferior) en presencia de altas cantidades de ADN porcino. Comparando los resultados obtenidos para las muestras que sólo contenían ADN humano y las muestras con la misma cantidad de ADN humano

mezclado con ADN porcino, se construyó una fórmula de regresión para corregir la subcuantificación.

4.2.2.2.- Determinación del gen *Alu Yb8* humano en tejido de animales muertos perinatalmente y en lactación

Respecto a los tejidos de las muestras procedentes de los lechones nacidos muertos, de los lechones momificados y de los muertos perinatales, los resultados aparecen en la Tabla 15. Destacar que las placentas de ambos lechones momificados fueron positivas, con 1761,03 y 965 copias del gen, respectivamente. Del mismo modo, ambos cordones umbilicales fueron positivos con 83,33 y 10472,20 copias, respectivamente. La presencia de ADN humano en la placenta estaría relacionada con el tráfico de células entre los fetos inyectados y las cerdas y explicaría la presencia de ADN humano en la circulación de las mismas.

De los ocho animales testados, dos tuvieron resultados positivos en adrenales, uno en aorta, uno en cerebro y cerebelo, uno en corazón, uno en estómago, uno en nódulo linfático inguinal y mesentérico, uno en nódulo linfático mesentérico, mediastínico y gastrohepático, uno en intestino delgado, tres en intestino grueso, uno en médula ósea, dos en músculo, cuatro en páncreas, dos en piel, tres en pulmón, uno en riñón, uno en timo y dos en tonsila (Tabla 15). El animal que mayor número de tejidos positivos mostró correspondía al cerdo nacido muerto de la inyección nº 8 (13 tejidos positivos).

Tabla 15: Cuantificación de Alu humano en tejidos de animales mortinatos o muertos perinatalmente.

CAMADA	INYECCIÓN Nº 6	INYECCIÓN Nº 6	INYECCIÓN Nº 6	INYECCIÓN Nº 8	INYECCIÓN Nº 8	INYECCIÓN Nº 8	INYECCIÓN Nº 8	INYECCIÓN Nº 9
MORTALIDAD	NO PERINATAL	NO PERINATAL	NO PERINATAL	PERINATAL	PERINATAL	PERINATAL	PERINATAL	PERINATAL
Estado	muerto	muerto 25/2/2011	muerto	NACIDO MUERTO	MOMIFICADO	MOMIFICADO	APLASTADO	APLASTADO
ADRENAL	1,78	0	0	113,22	0	0	0	0
AORTA	0	0	0	0	0	0	0	35,57
BAZO	0	0	0	0	0	0	0	0
CEREBELO	0	0	0	1918,95	0	0	0	0
CEREBRO	0	0	0	222,27	0	0	0	113,70
CORAZON	0	0	0	0	0	0	0	29,23
ESTOMAGO	0	0	0	0	0	0	0	63,47
N.INGUINAL	0	0	0	6097,09	0	0	0	0
N.MESEN	0	0	0	958,71	0	0	993,02	0
N. MEDIASTÍNICO	0	0	0	0	0	0	928,70	0
N. GASTROHEPÁTICO	0	0	0	0	0	0	993,02	0
HIGADO	5,80	0	0	116,43	94,37	0	0	0
I.DELGADO	0	0	0	91,88	0	0	0	0
I.GRUESO	0	0	0	0	318,27	53,14	0	246,43
LIG.REDON	0	0	0	0	0	0	0	0
MEDULA	0	0	0	580,76	0	0	0	0
MUSCULO	0	0	0	1052,97	0	0	0	91,69
PANCREAS	17,97	0	658,40	0	0	0	60,73	2047,98
PIEL	0	0	0	0	0	0	683,59	144,86
PULMON	0	0	0	398,07	1194,14	3722,79	0	0
RINON	0	0	0	161,47	0	0	0	0
TIMO	0	0	0	40,24	0	0	0	0
TONSILA	0	0	0	41,92	0	0	0	56,31
CORDÓN					83,33	10472,20		
PLACENTA					1761,03	965,16		

Los animales nacidos de la inyección nº 6 presentaron un 7,2% de las muestras positivas (4/69), los procedentes de la inyección nº 8 mostraron un 8,28% de muestras positivas (27/326 muestras analizadas) y el animal procedente de la inyección nº 9 tuvo un 30,13% de muestras positivas (9/23).

Si comparamos los resultados, agrupándolos por animales muertos perinatalmente (primeras 24 horas de vida) frente a animales no muertos perinatalmente (durante la lactación; menores de tres semanas de vida), observamos que hay diferencias significativas en la frecuencia de positivos ($p < 0,001$) siendo mucho mayor en los animales muertos perinatalmente. Para analizar adecuadamente estos resultados hay que tener en cuenta que todos los animales muertos no perinatalmente procedían de la inyección nº 6. Por tanto, podría ser que la presencia de células humanas se haya reducido con el paso del tiempo o bien, al tratarse de la inyección en la que menor número de células se introdujo ($1,5 \cdot 10^6$ células mesenquimales) el nivel de quimerismo conseguido hubiera sido muy bajo.

Los tejidos que más porcentaje de positividad presentaban al gen *Alu* en los animales momificados, muertos perinatalmente o nacidos muertos fueron el páncreas (57,14%) seguido del intestino grueso (42,86%), hígado y pulmón (37,50%). El nódulo linfático mesentérico y el cerebro presentaron el mismo porcentaje de positividad (33,33%).

En estudios anteriores no hay referencias con respecto al porcentaje de células humanas en tejidos de los animales momificados, muertos perinatalmente o nacidos muertos, ya que, según sus autores, estos partos se produjeron de noche y el estado de los fetos no hacía viable su análisis (Fujiki *et al.*, 2003). En nuestro caso, los partos fueron diurnos y siempre con la asistencia de un veterinario.

Si atendemos a los resultados obtenidos por McConico *et al.* (2011) con respecto a la aparición de células humanas en el riñón, la mayor probabilidad de ser un animal que recibió una inyección de células la tiene el animal muerto perinatalmente 1 de la inyección nº 8, que presentó células en dicho órgano.

4.2.2.3.- Determinación de la presencia del gen *Alu Yb8* humano en tejidos y sangre

Fueron positivas a la presencia de *Alu* las muestras sanguíneas de 34/63 lechones (53,98% del total de analizados; Tabla 16). La densidad varió entre 5,6 y $9,53 \cdot 10^4$ copias del gen (Tabla 16). Todos los animales positivos pertenecían a las inyecciones nº 7 y nº 9. Cabe destacar que en ambas cerdas se inyectaron cuatro lechones y se han encontrado 11 y 13, respectivamente. En cuanto a las cerdas, fueron positivas a *Alu* todas excepto la implicada en la inyección nº 6. Por un lado, esto indica presencia de células humanas (o al menos restos de ADN humano) en la circulación de los animales, presentando cargas entre 23.900 y 95.300 copias/ μ l de muestra (Tabla 17). Resulta interesante observar como la cerda en la que se inyectó un menor número de células ($1,5 \cdot 10^6$ células totales) no presentaba ADN humano en su circulación. Esto podría indicar que con la inyección llegó un número menor de células que en las otras cerdas y al analizarlas ya no quedaban, o bien que el bajo número de células inyectadas no permitió que llegaran en número suficiente a la circulación maternal.

Tabla 16: Hallazgo de gen *Alu* humano en PBMCs, corazón, riñón e hígado.

Grupo	Tipo células	Concentración	Nº Lech. inyectados	CF HLA I + (n= 63)	<i>Alu</i> PMBCs (n= 63)	<i>Alu</i> Corazón (n = 53)	<i>Alu</i> Hígado (n = 59)	<i>Alu</i> Riñón (n= 54)	<i>Alu</i> Int. delg (n= 63)	<i>Alu</i> Int. Gru. (n= 63)
Inyección nº6	MES	$1,5 \cdot 10^6$ células	2	0	6	4	12	3	0	0
Inyección nº7	MES	$2 \cdot 10^6$ células	4	4	13	4	6	1	0	0
Inyección nº8	MCU	$10,75 \cdot 10^6$ células	4	0	3	3	7	2	0	0
Inyección nº9	MCU	$3,5 \cdot 10^6$ células	4	9	12	9	7	3	0	0
TOTAL				13	34	20	32	9	0	0

Se determinó la presencia de *Alu* humano en el 37,74% de las muestras cardíacas, el 54,2% de las muestras hepáticas y el 16,7% de las muestras renales.

Un animal fue positivo para *Alu* en todas las muestras testadas (excepto los dos tramos de intestino), dos animales fueron positivos para PBMCs, corazón e hígado simultáneamente, 13 para PBMCs y corazón y siete para PBMCs e hígado. En todos los casos estos animales fueron procedentes de las inyecciones nº 7 y nº 9. Ningún animal tenía células humanas en intestino en el momento del sacrificio.

No se pudo determinar la presencia de células humanas en ninguna muestra de intestino delgado o grueso, en contraste con el 12,5% (1/8) y el 37,5% (3/8) de muestras positivas de intestino delgado y grueso, respectivamente, encontrado en los animales muertos perinatalmente. Esto podría indicar que las células humanas se destruyen muy rápidamente en el intestino o bien que son células circulantes que migran del órgano en un momento dado.

Tabla 17. Cuantificación de copias de *Alu-Yb8* en lechones.

ANIMAL	Inyección	TRASPONDEDOR	SEXO	Alu sangre	Alu tejidos				
					CORAZÓN	HÍGADO	I.D	I.G	RIÑÓN
CERDA 1109	6	-	H	0	-	-	-	-	-
1109-1	6	48264	M	0	ND	26,005	0	0	ND
1109-2	6	50581	H	0	0	0	0	0	796,58
1109-3	6	52253	M	0	165,63	0	0	0	0
1109-4	6	50721	H	0	117,7	2,55055	0	0	0
1109-5	6	63218	H	2,04E+07	2055,29	134,382	0	0	0
1109-6	6	45044	M	0	0	0	0	0	0
1109-7	6	65675	H	0	ND	0	0	0	ND
1109-8	6	50237	M	245,82	0	223,03	0	0	0
1109-9	6	59847	H	801,29	0	46,811	0	0	0
1109-10	6	74461	H	0	0	6,878	0	0	0
1109-11	6	63973	M	0	134,72	0	0	0	2834,9
1109-13	6	65386	M	0	ND	202409,769	0	0	0
1109-14	6	54991	H	0	ND	100,772	0	0	0
1109-15	6	52170	M	131,24	0	9,30142	0	0	48753,7
1109-16	6	46721	H	84,61	0	231,59	0	0	0
1109-18	6	55444	H	0	0	0	0	0	0
1109-19	6	49034	M	0	0	0	0	0	0

1109-20	6	71168	M	447,872	0	0	0	0	0
CERDA 1104	7	-	H	2,39E+04	-	-	-	-	-
1104-1	7	45961	H	57,5255	0	ND	0	0	0
1104-2	7	62397	H	1,63E+03	ND	ND	0	0	ND
1104-3	7	72164	M	288,19	ND	0	0	0	0
1104-4	7	45816	H	257,384	778,57	0	0	0	0
1104-5	7	73513	H	137,89	ND	0	0	0	0
1104-6	7	70271	M	1,01E+03	0	21,5814	0	0	0
1104-7	7	47268	M	161,24	0	606,69	0	0	0
1104-8	7	55104	M	129,28	ND	0	0	0	0
1104-9	7	71976	H	60,025	112,369	0	0	0	0
1104-10	7	50156	H	1,37E+03	86,61	0	0	0	0
1104-11	7	47674	H	5,86E+03	0	0	0	0	0
1104-12	7	66628	M	0	ND	ND	0	0	ND
1104-13	7	49713	M	0	0	0	0	0	0
1104-14	7	60354	M	1,05E+03	136,507	0	0	0	276,38
1104-15	7	80121	H	9,95655	ND	602,75	0	0	0
CERDA 1042	8	--	H	9,53E+04	-	-	-	-	-
1042-1	8	65644	M	0	180,49	0	0	0	981,49
1042-2	8	48443	M	0	0	537,155	0	0	0
1042-3	8	66350	M	0	0	0	0	0	0
1042-4	8	57341	H	0	ND	797,679	0	0	ND
1042-5	8	64040	M	0	0	0	0	0	0
1042-6	8	45226	M	0	ND	29,006	0	0	ND
1042-7	8	68765	M	0	0	0	0	0	0
1042-8	8	53686	M	56,87	0	0	0	0	0
1042-9	8	68392	M	0	0	0	0	0	0
1042-10	8	48912	H	0	0	1289,519	0	0	0
1042-11	8	55469	M	0	ND	ND	0	0	ND
1042-12	8	45713	M	167,54	356,92	0	0	0	0
1042-13	8	65695	M	0	1771,44	5,37153	0	0	0
1042-14	8	51180	M	0	0	279,355	0	0	0
1042-15	8	58697	M	39800	0	116,43	0	0	161,47
CERDA 1105	9	-	H	9,53E+04	-	-	-	-	-
1105-1	9	59316	M	28,0985	35100	0	0	0	747,41
1105-2	9	50613	H	302,689	1809,35	0	0	0	0
1105-3	9	52317	H	5,64875	424,64	445,85	0	0	ND
1105-4	9	54732	M	37,3278	478,162	0	0	0	0
1105-5	9	66510	M	73,1921	0	0	0	0	ND
1105-6	9	66014	M	8,85075	0	118,589	0	0	0
1105-7	9	71076	H	1,88E+03	0	0	0	0	0
1105-8	9	52813	M	319,898	3596,49	21,883	0	0	25617,3
1105-9	9	56075	H	185,738	127,427	1,94307	0	0	0
1105-10	9	52223	H	0	0	0	0	0	0

1105-11	9	63298	H	611,01	189,594	0	0	0	324,71
1105-12	9	56863	M	368,146	705,26	0	0	0	0
1105-13	9	67023	M	79,5025	276,211	0	0	0	0

Por inyecciones, se obtuvo un 15,6% de muestras positivas en la inyección nº 6 (17/109 testadas), 22,78% en la inyección nº 7 (18/79 muestras testadas), 14,45% en la inyección nº 8 (12/83 muestras testadas) y 36,85% en la inyección nº 9 (28/76 muestras testadas). No hubo diferencias significativas dependiendo del tipo de célula inyectado ni en la frecuencia de positivo en ninguno de los tejidos (aunque el corazón mostró tendencia; $p=0,057$) y sí la hubo para la frecuencia de positivos en PBMC dependiendo del número de células inyectadas ($p<0,001$) para las concentraciones $2 \cdot 10^6$ y $3,5 \cdot 10^6$ células totales. La frecuencia de positivos aparece en la figura 26.

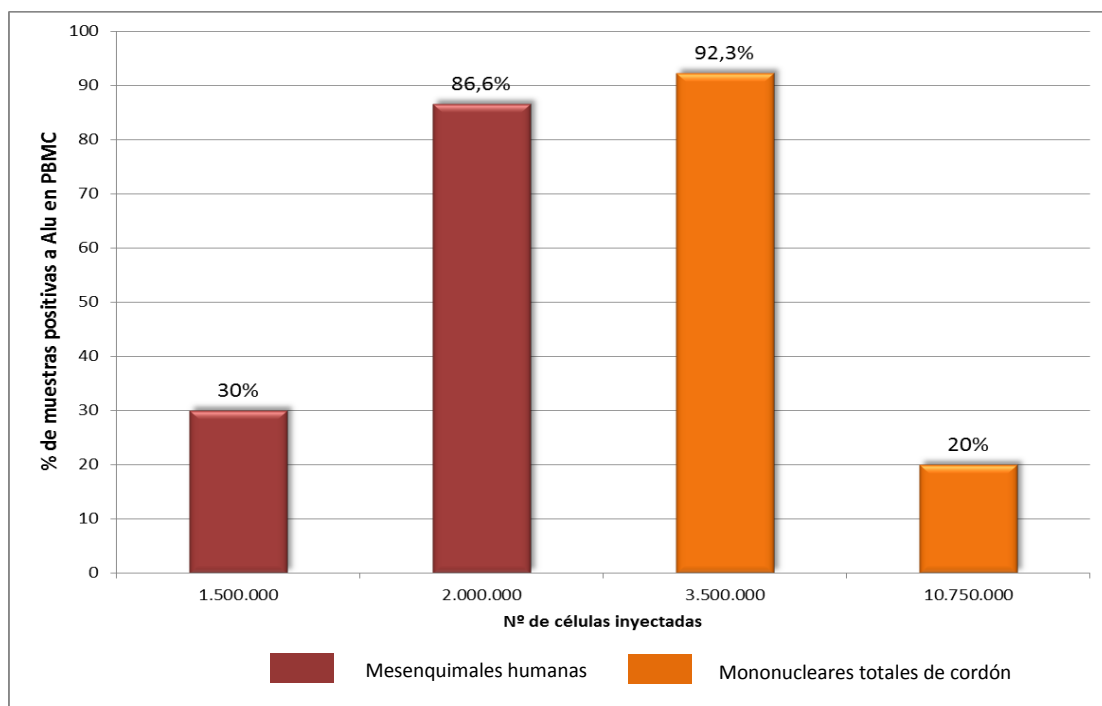


Figura 26. Porcentaje de muestras positivas a Alu en PBMC dependiendo del número de células inyectadas.

En este caso es notorio como las concentraciones medias (2 y 3,5 millones de células) han producido el mayor porcentaje de animales positivos.

Tampoco hubo ninguna relación entre los positivos a Alu en PBMCs y los positivos en hígado, corazón o riñón (Figura 27).

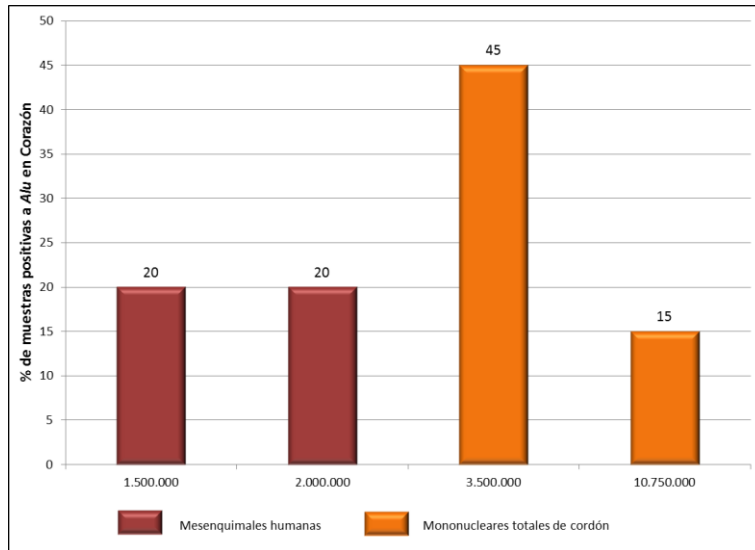
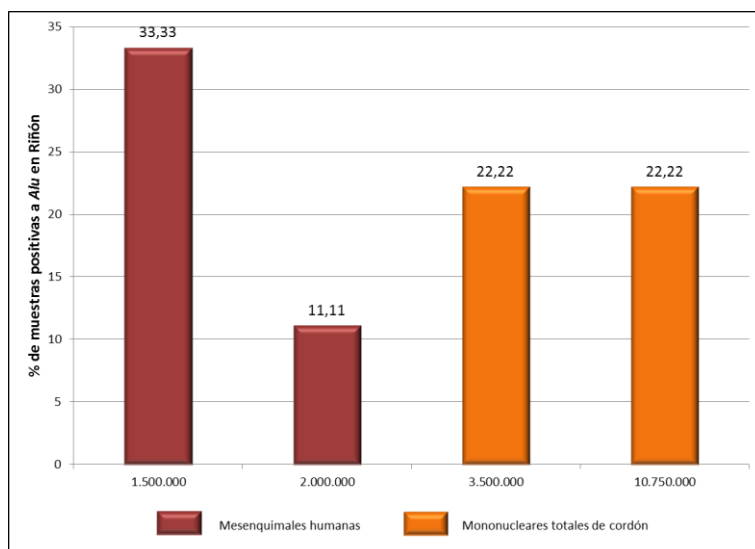
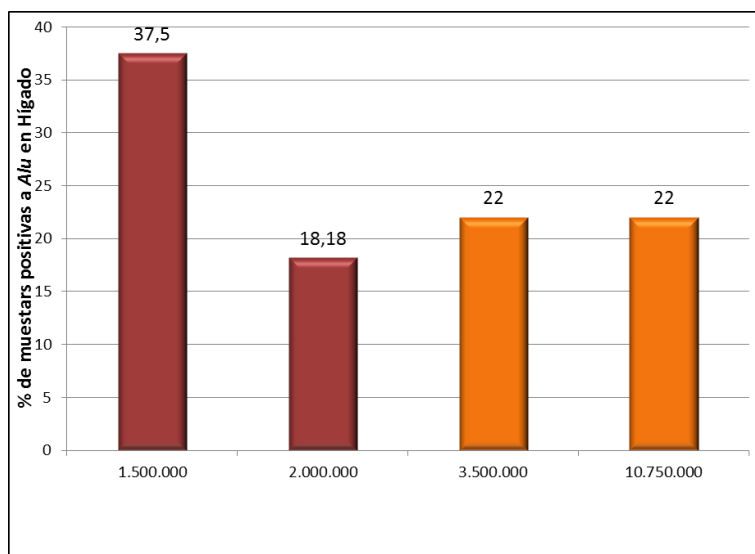


Figura 27. Porcentaje de muestras positivas a Alu en corazón, hígado y riñón dependiendo del número de células inyectadas.



De nuevo, se ha encontrado ADN humano en más lechones de los que fueron inyectados en cada camada. Esto, junto con los resultados de la citometría de flujo corroboran el tránsito de células entre compañeros de camada, como ya habían documentado anteriormente McConico *et al.* (2011). Los resultados de estos autores indican que las células podrían transferirse mediante migración tisular estrictamente y no a través de la circulación.

En cuanto a las cerdas, todas fueron positivas a la presencia de *Alu* en sangre. Aparte de nutrientes y oxígeno, las células intactas pueden atravesar la barrera maternofetal o lecho vascular de la placenta. Este hecho está bien documentado tanto en modelos humanos (Sunami *et al.*, 2010), como en modelos animales (Fujiki *et al.*, 2008). También fue descrito por McConico *et al.*, (2011), quienes señalaban lo sorprendente del paso de células dado la disposición anatómica de los fetos dentro del útero porcino y la morfología de éste. La placenta del cerdo es epiteliochorial, lo que significa que el corion de la placenta está en contacto con el epitelio del endometrio del útero (Leiser *et al.*, 1988). En este caso, seis capas de tejido separan las células de la madre de la circulación fetal (Amoroso *et al.*, 1952; Johansson *et al.*, 2001; Frandson *et al.*, 2009). La cerda correspondiente a la inyección nº 8 es la que mayor número de copias de *Alu* presenta en sangre, sin embargo, ninguno de sus lechones vivos resultaba positivo a la presencia del mismo gen en sangre. Esto nos sugiere que quizá se produjo una migración de la mayoría de las células a la cerda, produciendo niveles de presencia de células humanas por debajo del umbral de detección de las técnicas utilizadas, o

incluso sugiere también que no hubiera habido nidación de ninguna célula en los fetos, alojándose todas en la madre.

La frecuencia de positivos encontrada según tejidos difiere de la demostrada en anteriores trabajos mediante PCR o inmunocitoquímica. Así, mientras que McConico *et al.* (2011) encuentran células humanas en el riñón de prácticamente todos los lechones inyectados (y en menor frecuencia en los animales no inyectados), interesantemente, en nuestro estudio se han encontrado células humanas en el riñón de tres, uno, dos y tres lechones de las inyecciones 6, 7, 8 y 9, respectivamente. Estos lechones podrían ser animales inyectados. En el estudio anteriormente citado los autores encuentran células en riñón, corazón, bazo, timo, médula y cerebro de los animales inyectados y en riñón, bazo, timo y corazón en los no inyectados. En el presente estudio se encontraron células humanas en los tres tejidos testados, siendo el más frecuente hígado, seguido de corazón, y finalmente riñón.

4.2.2.4.- Correlación entre la presencia de células sanguíneas microquiméricas y la presencia del gen *Alu* en tejidos

Al relacionar los animales que dieron positivo a la determinación de *Alu* humano en función del resultado de la citometría de flujo para la detección de HLA I en PBMCs a los 15 días de vida, se observaron los resultados que aparecen en la Figura 28.

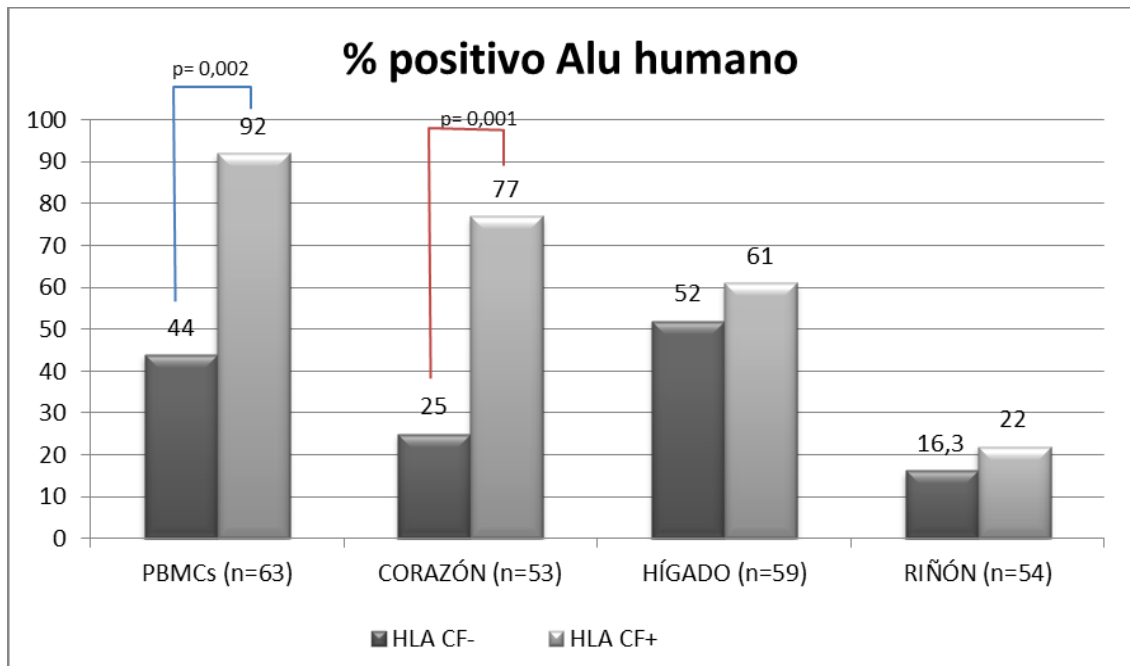


Figura 28. Porcentaje de positivos a gen *Alu* humano en PBMCs, hígado, corazón y riñón en animales positivos y negativos a citometría de flujo.

Se observó cómo en aquellos animales que presentaban HLA I en superficie se detectó *Alu* en PBMCs, hígado y corazón con una frecuencia significativamente mayor que en los que fueron negativos para HLA I en sangre. No hubo diferencia en la detección de *Alu* en tejido renal entre animales positivos y negativos. Un animal que fue positivo a la presencia de células HLA I positivas fue negativo en PCR realizada a PBMCs, pero posiblemente se trata de un falso positivo.

Con respecto a la densidad de gen Alu detectado comparando los animales que fueron positivos por CF con aquellos que fueron negativos, no se encontraron diferencias significativas para las PBMCs. Las diferencias aparentes que se aprecian en la Figura 29 se deben a la presencia de dos animales con valores extremos (> 20.000 copias/ μ l) en el grupo negativo para HLA I.

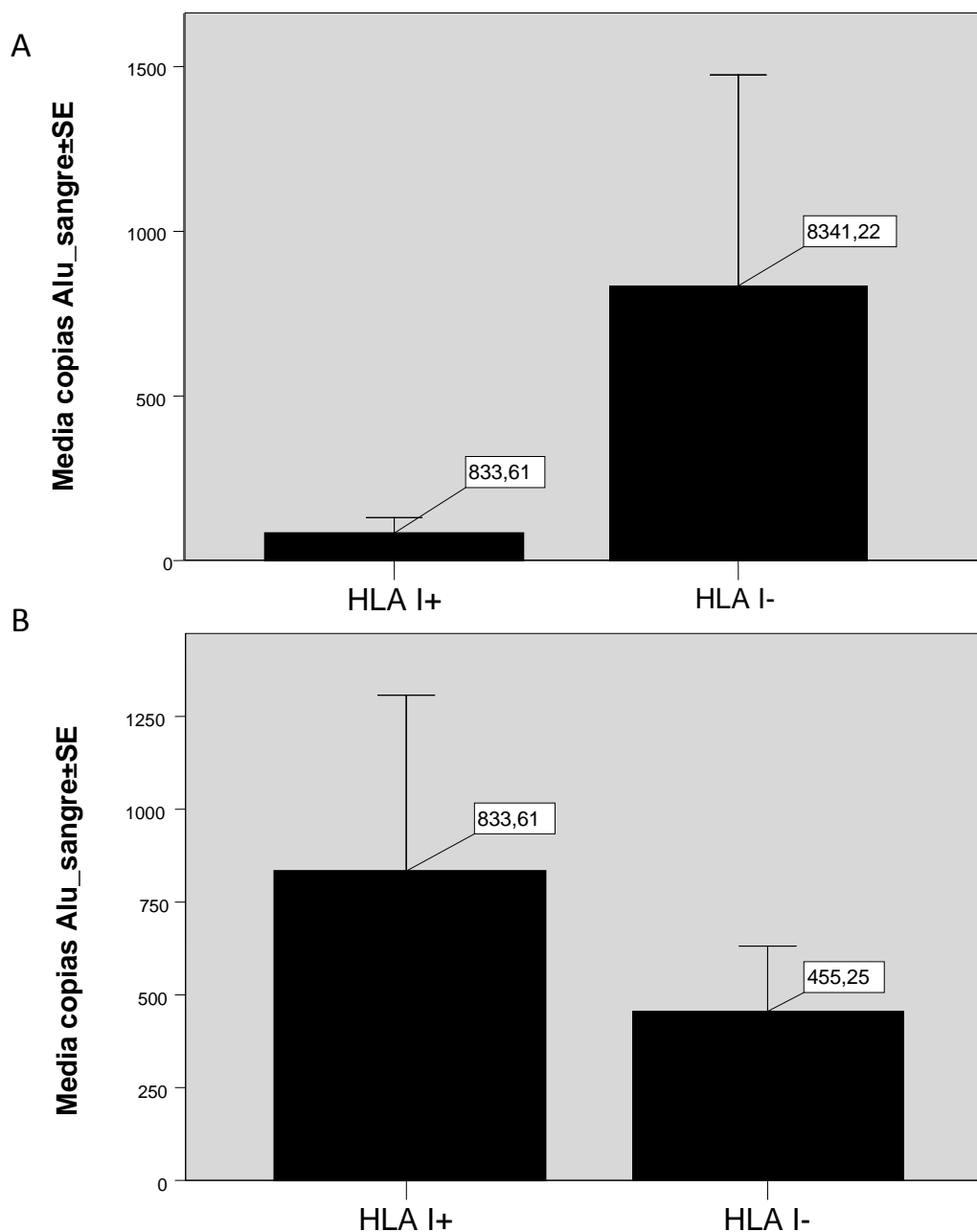


Figura 29. Número medio de copias del gen Alu en los animales positivos y negativos a HLA I por citometría. A) Includiendo todos los animales. B) Eliminando los animales con valores extremos.

En cuanto a las copias del gen *Alu* encontradas en cada tejido, en la Figura 30 aparece la media \pm SEM para cada uno de ellos, dependiendo del resultado de la CF.

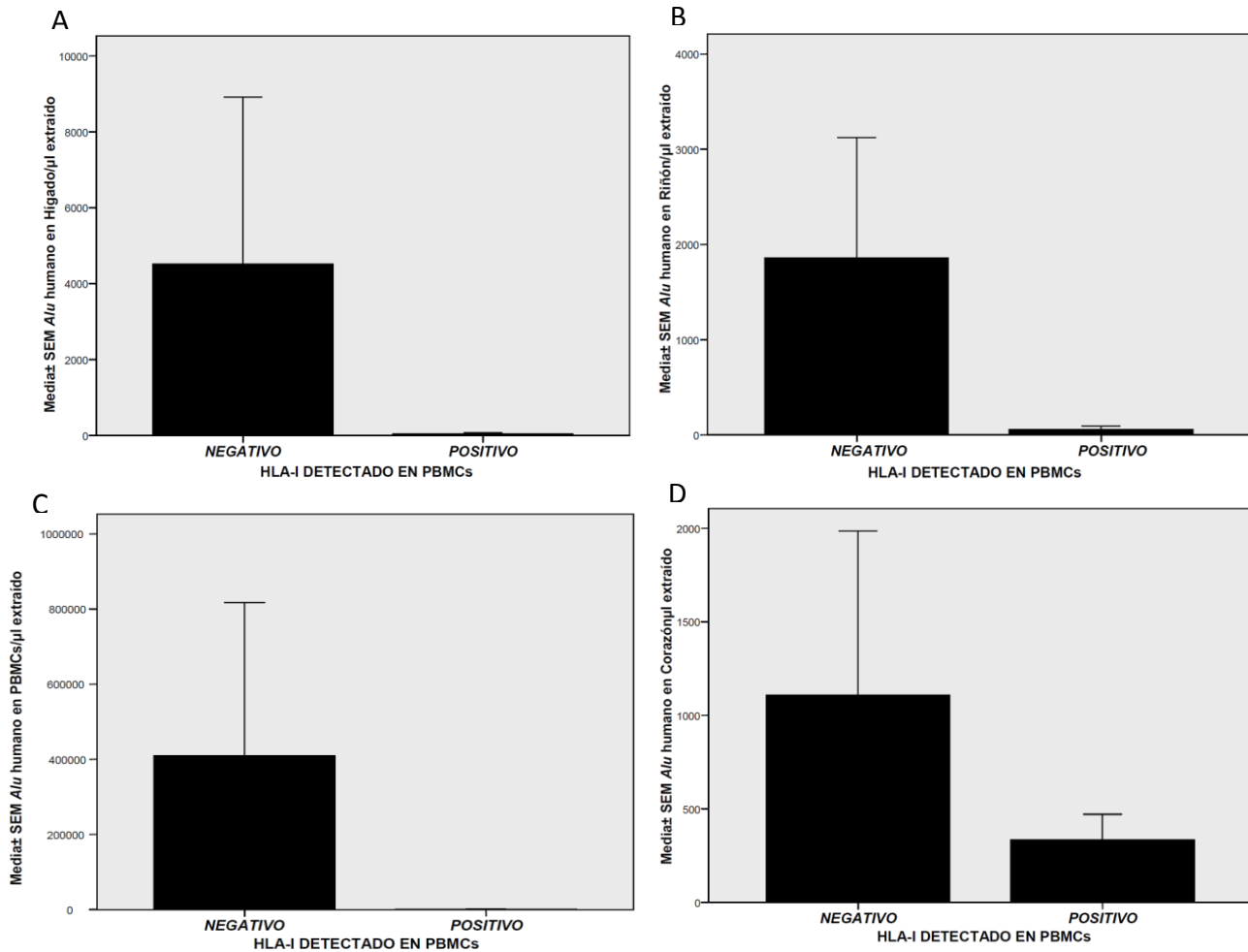


Figura 30: Número medio de copias de *Alu* (por μ l de extraído) en A) Células mononucleares sanguíneas, B) Tejido cardíaco, C) Tejido renal y D) Tejido hepático.

Se observó una diferencia significativa mediante el test U de Mann-Whitney al comparar la densidad de *Alu* en positivos y negativos a HLA I detectada en PBMCs en sangre ($p=0,008$), corazón ($p=0,005$) e hígado ($p=0,017$). Las medias y medianas aparecen en la Figura 30, no existiendo diferencias en el caso del tejido renal. Para interpretar estos resultados hay que tener en cuenta que los datos de citometría de flujo utilizados fueron aquellos obtenidos en la primera prueba realizada, cuando los

animales tenían 15 días de edad, mientras que los resultados de Alu en tejidos son los que se obtuvieron a los 80 y 175 días de edad para los animales negativos y positivos por CF, respectivamente. El hecho de que los animales negativos a CF, sacrificados con anterioridad a los animales positivos, muestren valores medios superiores a los segundos, indicaría que efectivamente se ha ido perdiendo el quimerismo y que en los animales sacrificados en último lugar la cantidad de ADN humano detectable es menor. La mayor carga en sangre en los animales negativos, que se analizó cuando los animales tenían 40 días de edad, se explicaría por la presencia de dos valores extremos en dicho grupo, correspondientes a los animales 63.218 y 58.697 con 20.400.000 y 39.800 copias del gen/ μ l de extraído, respectivamente. Cuando se eliminan ambos extremos, hay diferencia a favor de los animales positivos a CF como muestra la Figura 31, con una media de 770 copias frente a 171 copias, respectivamente.

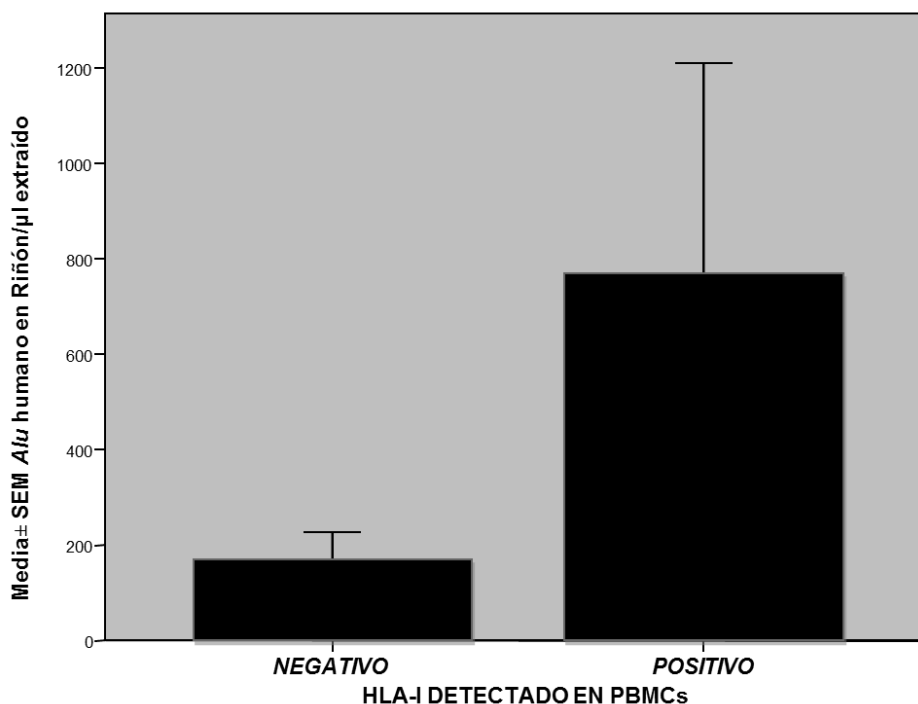


Figura 31. Copias medias de gen Alu en riñón en animales positivos y negativos por citometría de flujo para HLA I, eliminando valores extremos.

Hay que destacar el hecho de que se haya encontrado una frecuencia significativamente mayor de animales *Alu+* en PBMCs en aquellos que dieron positivo en la citometría de flujo realizada cuando los animales tenían 80 días de edad. Estos mismos animales no mostraron resultados positivos por CF para HLA I a los 105 días de vida.

No se ha encontrado correlación entre el porcentaje de células detectadas con HLA I humano en superficie con la cantidad de copias de *Alu*/μl presente en la sangre o los tejidos. Tampoco hay correlación entre el número de copias/μl de extraído de los tejidos con el obtenido para la sangre, ni entre las cantidades obtenidas para los tejidos al compararlos entre sí.

4.2.3. Inmunocitoquímica sobre tejidos

No se observaron células teñidas en ninguno de los tejidos valiosos para trasplante (hígado, riñón, corazón o pulmón). Sin embargo, se observaron hematíes en algunas de las muestras de bazo inmunorreactivos al anticuerpo anti-HLA. Los animales que fueron positivos aparecen en la Tabla 18.

Tabla 18: Animales con hematíes positivos en la pulpa roja esplénica.

Animal	CF 1 ^a	Alu	Hematíes
1	Positivo	Negativo	Negativo
2	Positivo	5,86E+03	Positivo
3	Positivo	73,1921	Negativo
4	Positivo	185,738	Positivo
5	Positivo	302,689	Positivo
6	Positivo	60,025	Negativo
7	Positivo	1,37E+03	Positivo
8	Positivo	611,01	Negativo
9	Positivo	37,3278	Negativo
10	Positivo	1,05E+03	Positivo
11	Negativo	Negativo	Positivo
12	Negativo	Negativo	Positivo
13	Negativo	137,89	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo
15	Negativo	1,01E+03	Negativo
16	Negativo	288,19	Positivo

Del total de animales testados, ocho mostraron hematíes positivos en la pulpa roja esplénica. De ellos, cinco eran animales que dieron positivo en la primera CF y tres fueron negativos en dicha prueba. Es decir, el 50% de cada uno de los grupos mostró hematíes positivos, por lo que no era esperable una diferencia significativa en la frecuencia. No se encontró una relación significativa ($p=0,230$) entre la carga de copias

del gen Alu humano en sangre, aunque los animales positivos mediante IHQ mostraron 1.132 ± 698 frente a las 241 ± 131 copias de los animales negativos a IHQ.

La presencia de HLA I en hematíes no es frecuente, aunque estas células pueden presentar dichas moléculas en su superficie en distintas circunstancias. El hecho de que no encontremos relación entre los animales positivos a CF y la presencia de hematíes puede deberse a que las células de la serie roja tienen una vida media muy superior a las de la serie blanca. Las CF se realizaron aislando el componente celular blanco y por tanto no se analizaron los hematíes.

La hipótesis sería que las células rojas podrían proceder o bien de células humanas que asentaron en la medula ósea posteriormente al implante *in utero* o bien de células quiméricas entre células STEM humanas y células porcinas. Este término aún se está dilucidando.

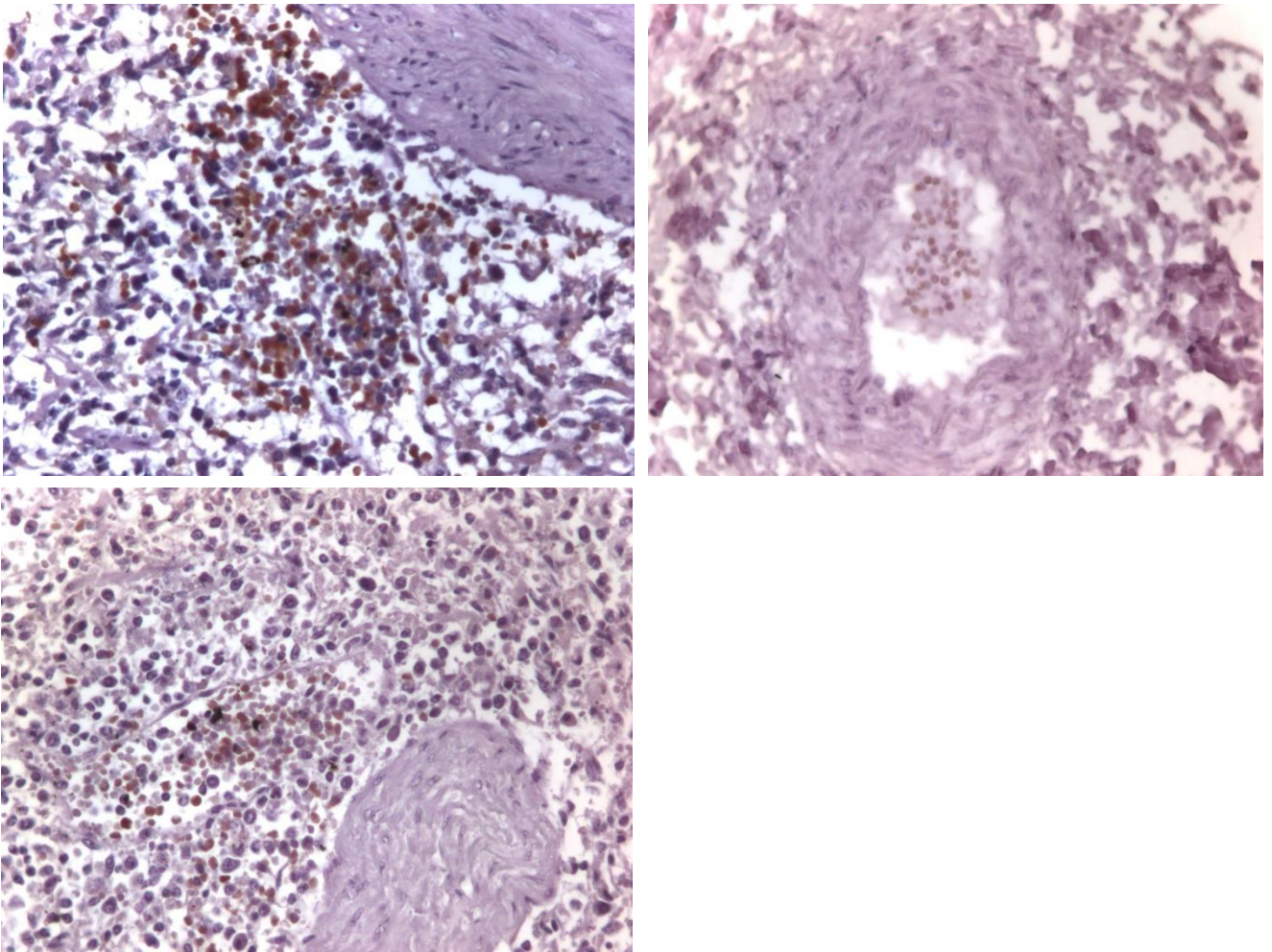


Figura 32. Hematíes positivos en la pulpa roja esplénica.

La detección mediante IHQ de células humanas en experimentos previos fue muy complicada puesto que la proporción de células positivas raramente excedía del 0,001%, lo que significa una cantidad de menos de 1 célula por campo, con algunas excepciones en las que se pueden encontrar agrupaciones de células humanas en ciertos tejidos (McConico *et al.*, 2011).

4.2.4. Resultados técnica ELISA para la detección de albúmina humana

Se analizaron muestras de suero de todos los animales nacidos vivos a los 45 días de edad de las cerdas inyectadas, no siendo ninguna de las muestras positivas para la presencia de albúmina humana.

4.3. DETERMINACIÓN DE COMPATIBILIDAD IN VITRO

4.3.1 Tipado ABO de los cerdos y primates

Todos los cerdos, incluyendo los cerdos de fenotipo salvaje, fueron asignados al grupo O tras ser tipados con las tarjetas de microtipaje utilizadas. Algunos ejemplos aparecen en la Figura 33. Se aprecia como los hematíes forman un pellet en el fondo de los micropocillos, en contraste con los animales A que presentan un depósito de hematíes en la superficie del gel (Figura 33-G, flecha blanca).

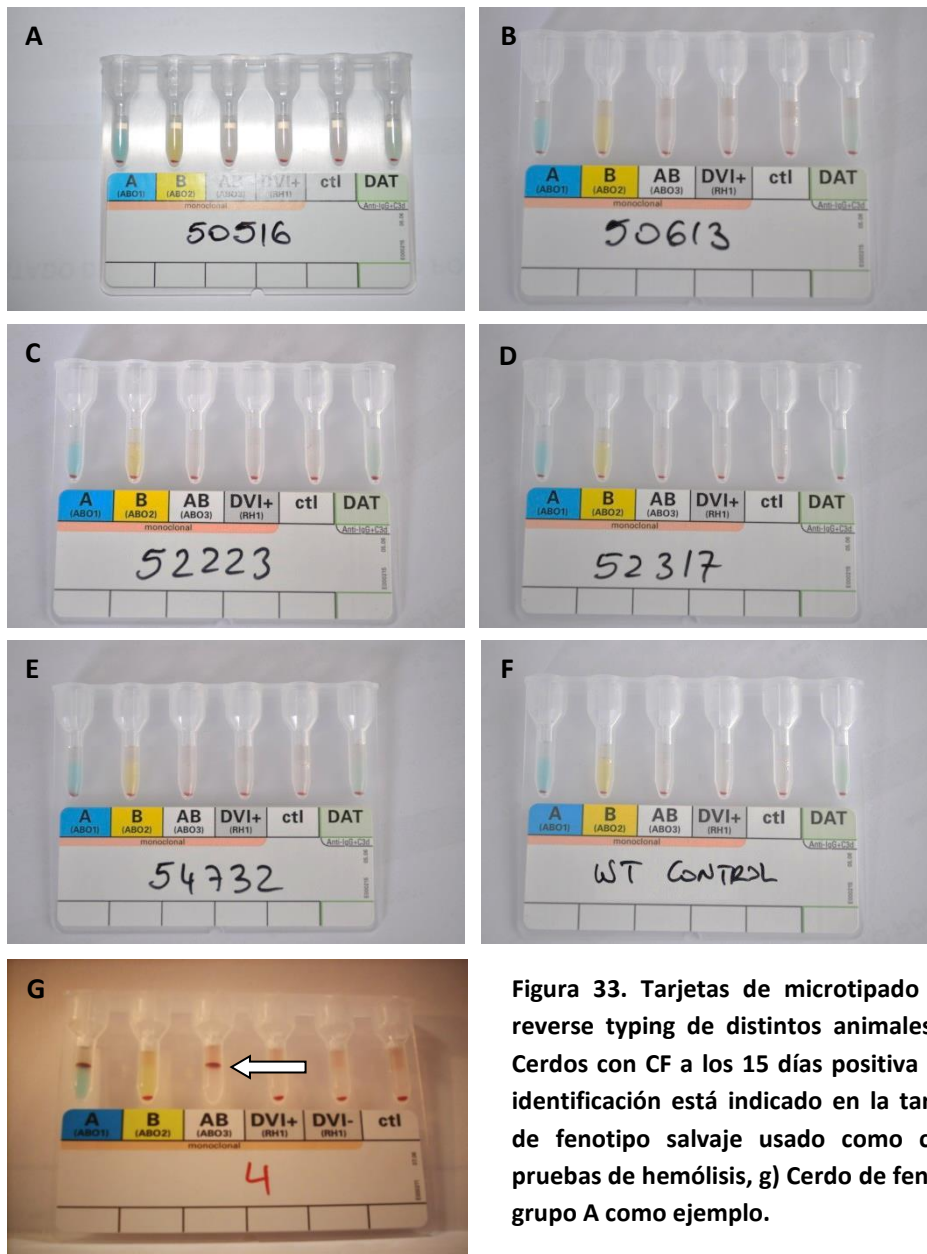


Figura 33. Tarjetas de microtipado Dia-Clon ABO reverse typing de distintos animales tipados; a-e) Cerdos con CF a los 15 días positiva (el número de identificación está indicado en la tarjeta), f) cerdo de fenotipo salvaje usado como control en las pruebas de hemólisis, g) Cerdo de fenotipo salvaje y grupo A como ejemplo.

Con este tipado se asegura que en ninguna de las pruebas de hemólisis realizadas se producirá interferencia debida al grupo ABO, independientemente del grupo de los primates de los que proceda el suero.

4.3.2. Hemólisis mediada por anticuerpos y complemento mediante sistema RTCA xCELLigence

4.3.2.1.- Validación del método

Perfil en relación con la cantidad de células sembradas

Cada concentración de hematíes produjo un perfil de impedancia, como muestra la Figura 34A. La IC máximo registrada fue de 0'578, 0'7801, 1'1689 y 1'7075 para cada una de las concentraciones sembradas. La IC media para todos los replicados mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$) al comparar todas las concentraciones de siembra. Hubo una correlación muy alta y significativa entre el IC_{max} y la concentración de células sembradas (Figura 35).

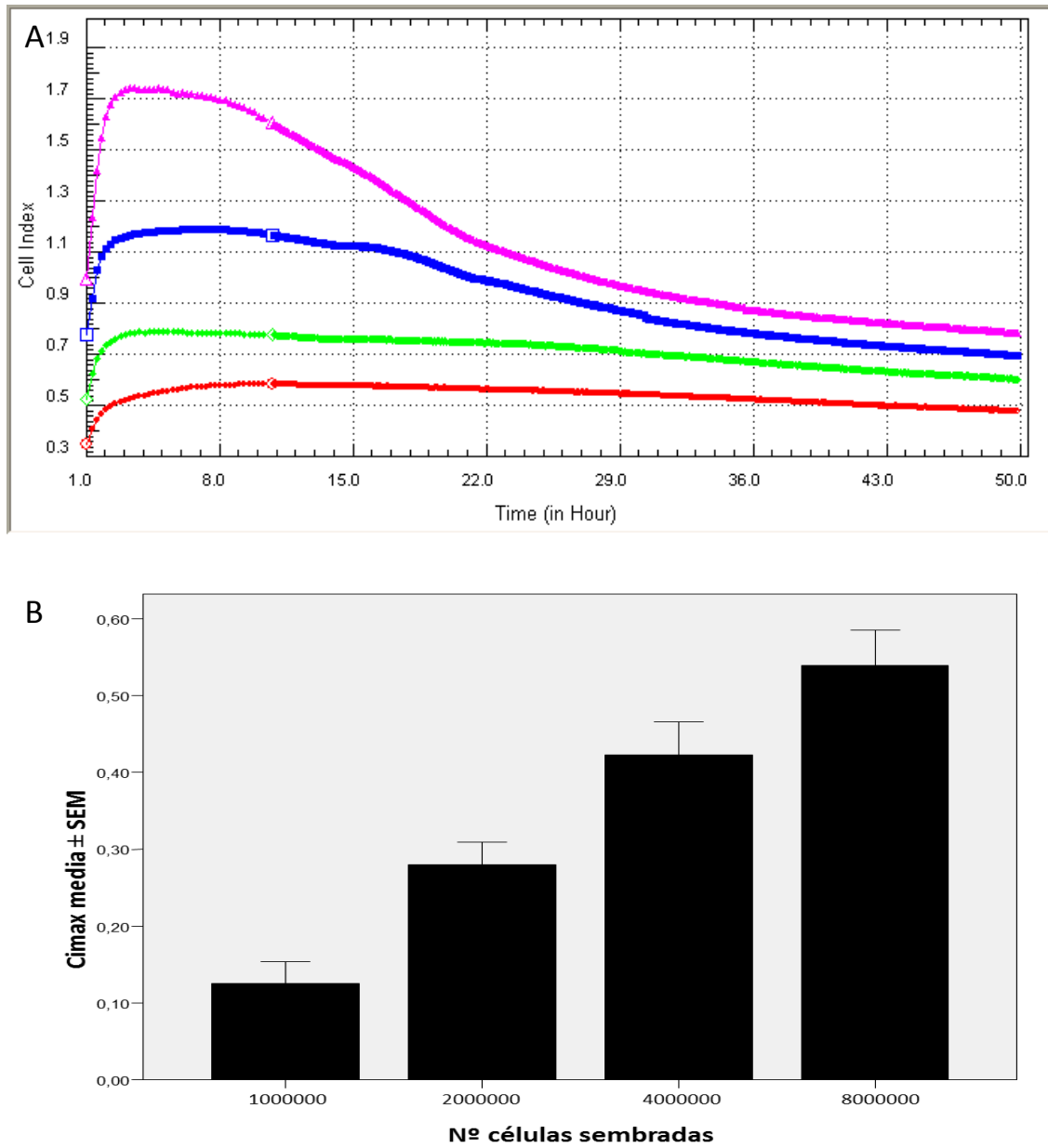


Figura 34: A) Perfil de impedancia para hematíes porcinos sembrados a una densidad de 1×10^6 (línea roja), 2×10^6 (línea verde), 4×10^6 (línea azul) y 8×10^6 (línea rosa). B) IC_{max} media obtenida para cada una de las concentraciones sembradas.

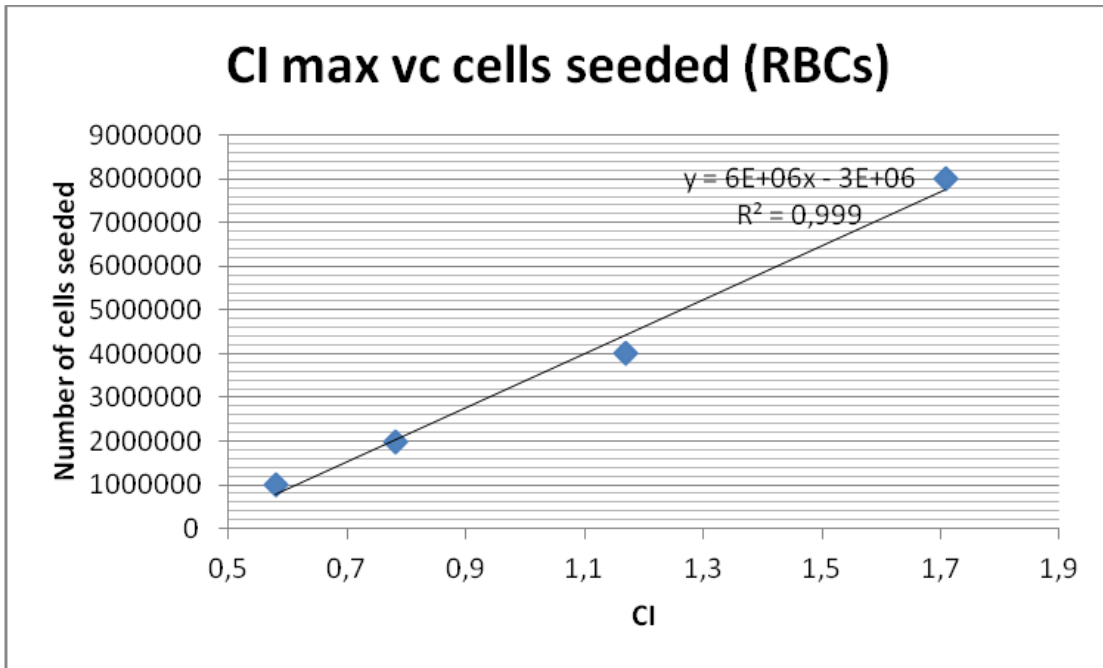


Figura 35: Correlación entre el número de células sembradas y el IC_{max} observado ($p < 0,001$).

Se observó una correlación muy alta y significativa entre los contajes en cámara y el IC en el mismo momento temporal ($r^2=0,829$, $p < 0,001$). Dicha correlación se mantuvo constante a lo largo del experimento, como denotan los coeficientes de correlación obtenidos a las 20 ($r^2=0,851$, $p < 0,001$), 40 ($r^2=0,873$, $p < 0,001$) y 60 horas post-desafío ($r^2=0,890$, $p < 0,001$).

De estos resultados se desprende que los hematíes, aún sin ser células adherentes, producen un perfil de impedancia característico y muy correlacionado con la cantidad de células sembradas. De hecho, la concentración de $2 \cdot 10^6$ hematíes totales es capaz de producir un IC próximo de 0,5 en unas 5 horas, lo que sería suficiente según el fabricante del instrumento para iniciar una prueba de viabilidad o citotoxicidad.

La figura 36 muestra el perfil de impedancia obtenido para el animal 50516 y el humano 1 a lo largo de las 90 horas que duró el experimento en las diluciones 1:1 hasta 1:16.

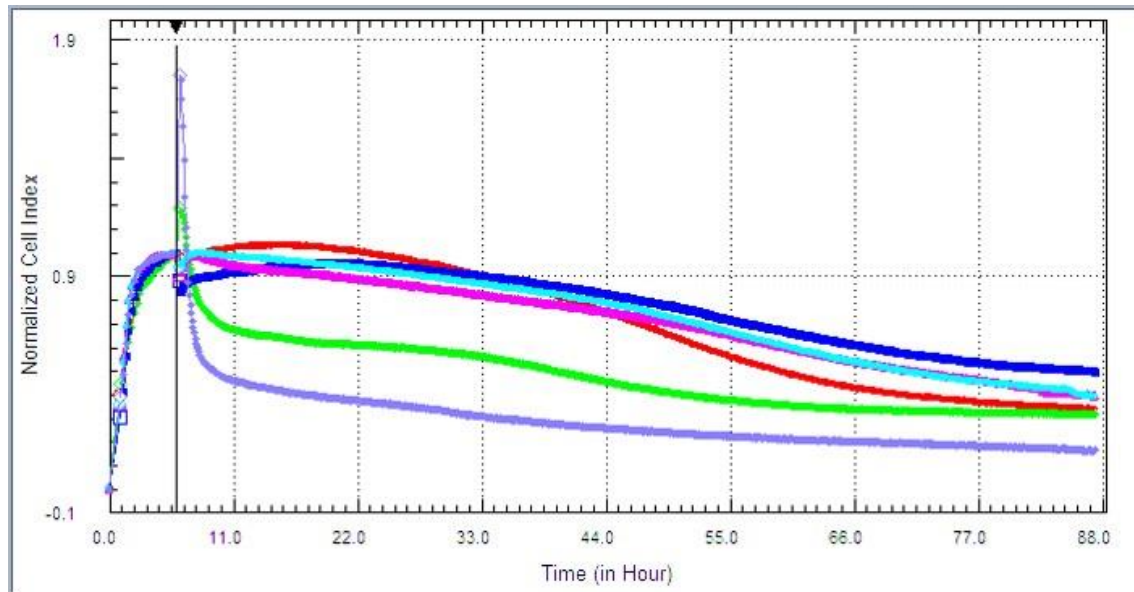


Figura 36. Perfil de impedancia obtenido para el animal 50516 y el humano 1 a distintas concentraciones. Rojo: control, Violeta: 40 µL suero, verde: 20 µL suero, azul oscuro: 10 µL suero, rosa: 5 µL suero, azul claro: 2,5 µL suero.

Para el AUC se obtuvo un coeficiente de determinación de entre $r^2 = 0,994$ y $r^2 = 0,983$ durante las primeras 20 horas post-adición del suero a las muestras, estudiado en intervalos de 5 horas. Esto significa que el coeficiente de correlación obtenido estuvo entre $r=0,997$ y $r=0,991$ ($p<0,001$). Este coeficiente indica una bondad de ajuste muy significativa para el AUC (Figura 37).

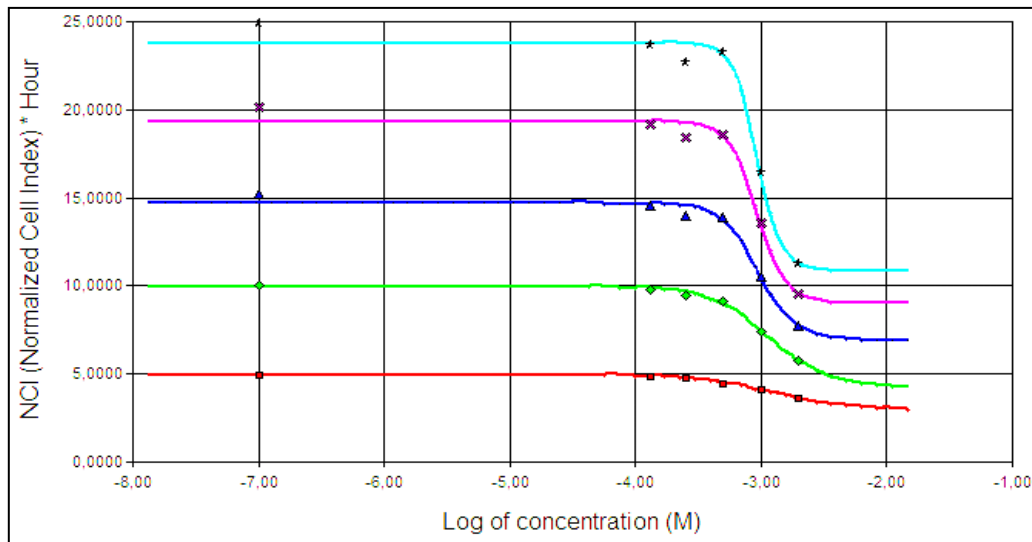


Figura 37: Área bajo la curva para el cerdo 50516 y el humano 1 estudiado a las 5 (●), 10 (●), 15 (●), 20 (●) y 25 (●) horas post-adición del suero a la muestra.

Se obtuvieron coeficientes de correlación de $r=0,997$, $r=0,997$, $r=0,993$, $r=0,991$ y $r=0,991$ ($p<0,001$), respectivamente, para cada punto temporal estudiado.

El índice celular IC_{min} frente a la concentración en un periodo de tiempo tuvo un valor $r^2 =0,982$ y $r^2=0,999$ entre las horas 5 y 50 post-desafío, lo que indica que hay una correlación muy alta entre la concentración y la IC_{min} . Un ejemplo del gráfico tal y como lo ofrece el software del sistema xCELLigence aparece en la Figura 38.

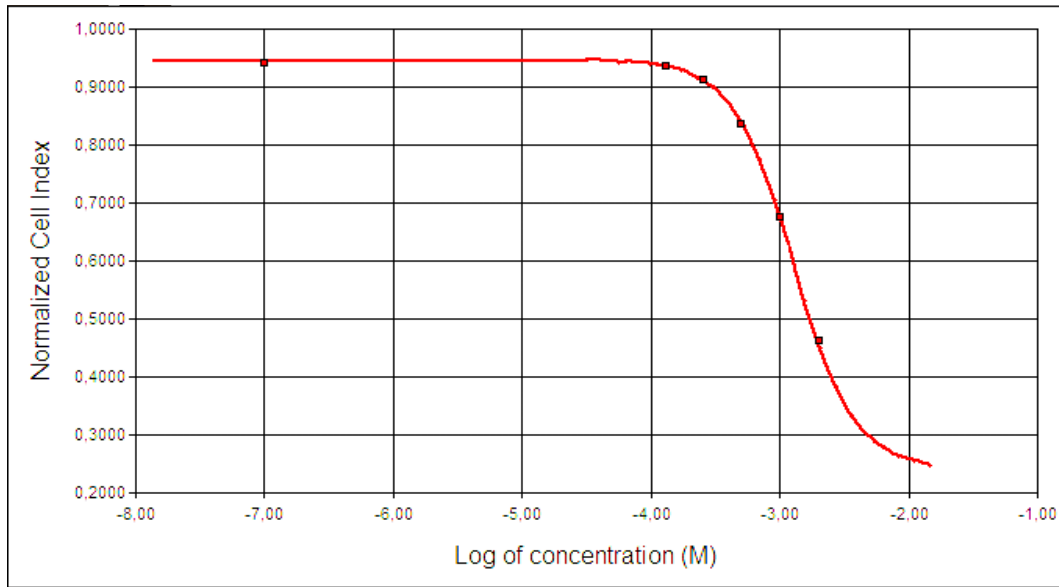


Figura 38. IC mínima frente a la concentración a las 5 horas postdesafío.

4.3.2.2.- Perfil de impedancia de los animales quiméricos control

Para determinar el periodo durante el cual se mantenían estables los hematíes para poder evaluar el fenómeno de hemólisis se determinó el periodo en el que el IC normalizado se mantuvo por encima de 1, valor que adopta el IC en el punto de normalización.

Se determinó que durante al menos 20 horas los pocillos conteniendo hematíes que no se desafiaron con suero tuvieron un IC por encima de 1 (Figura 39).

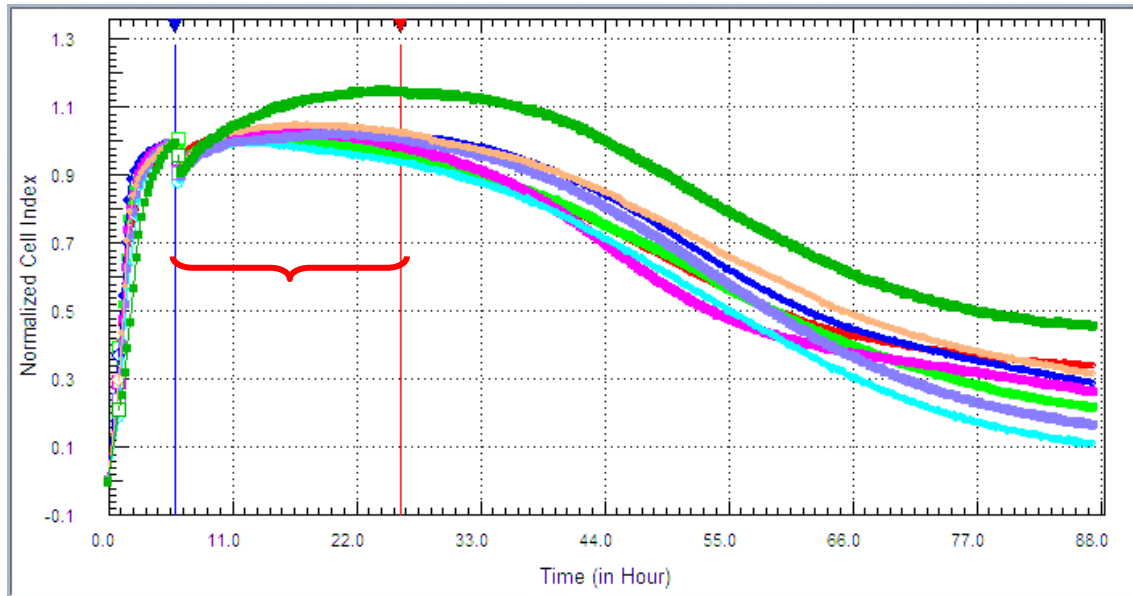


Figura 39. Perfil de impedancia de los pocillos conteniendo células control sin desafiar. El periodo que permaneció el IC por encima de 1 aparecen entre las líneas roja y azul.

4.3.2.3.- Hemólisis mediada por anticuerpos y complemento medida con RTCA

La figura 40 muestra los perfiles de impedancia para los animales testados.

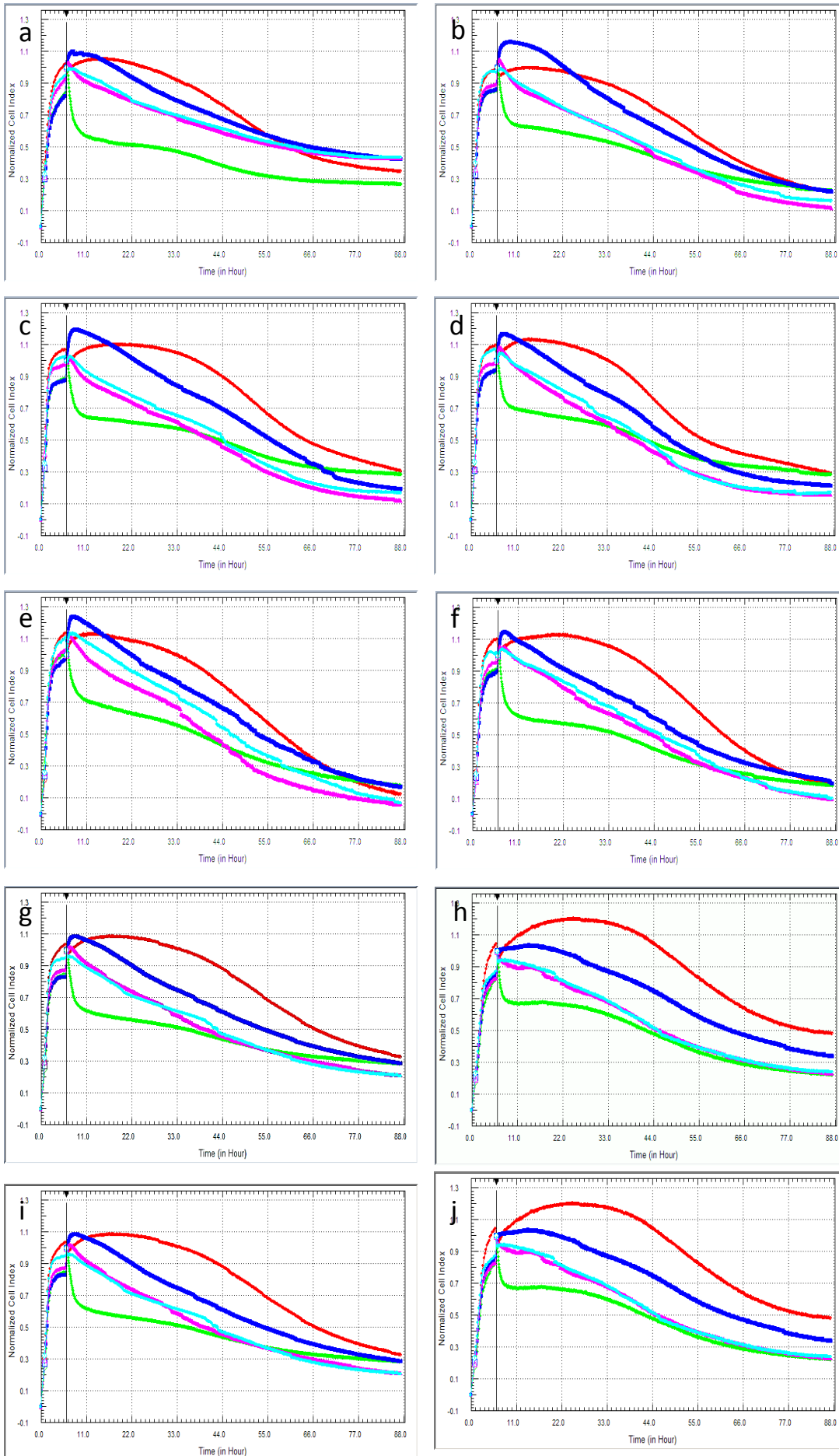


Figura 40. Perfil de impedancia de 10 de los 13 animales que dieron positivo a citometría de flujo para HLA I frente a distintos sueros humanos. La línea roja es el cultivo control.

La media de reducción de IC para cada animal microquimérico mediante CF aparece en la Figura 41.

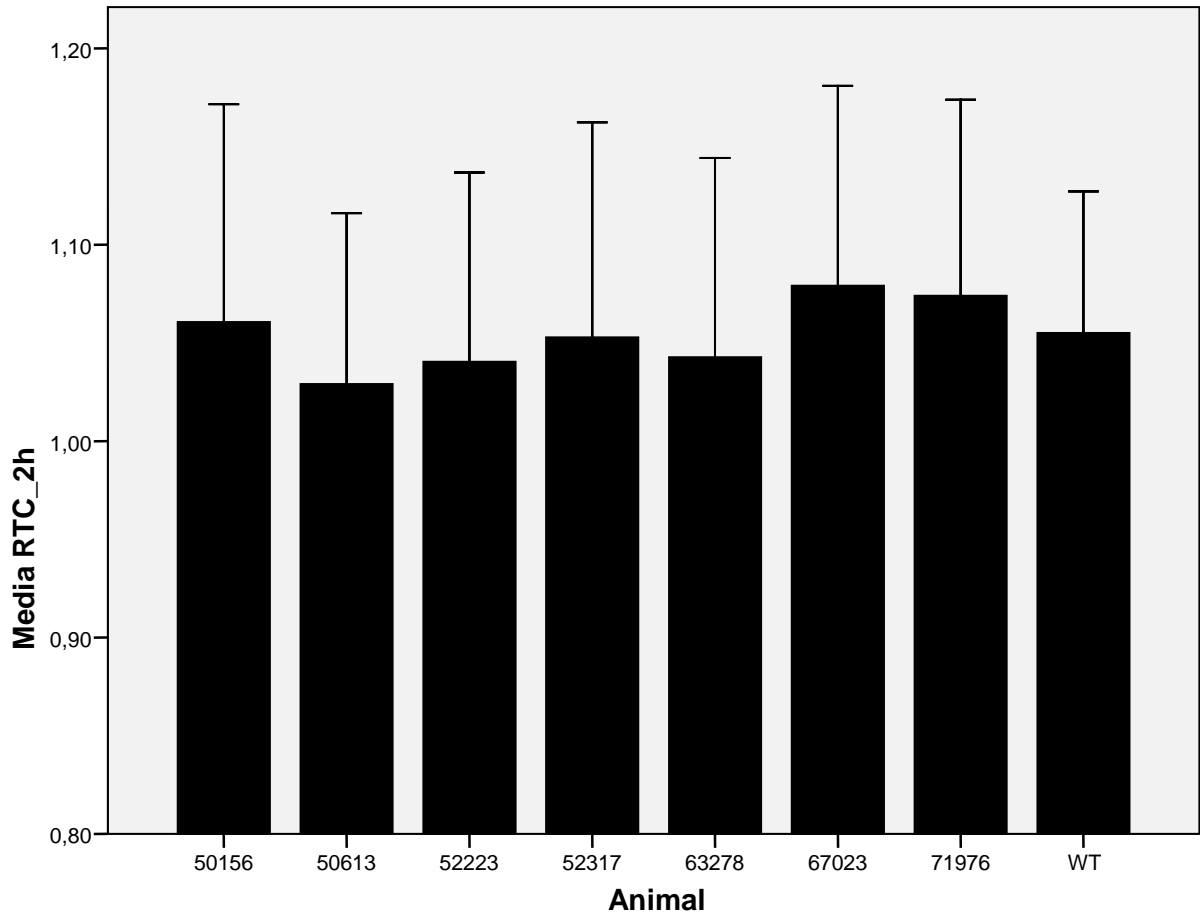


Figura 41. IC media obtenida a las dos horas postdesafío en los animales microquiméricos.

En este experimento no se observaron diferencias entre animales ni con los animales de fenotipo normal. Tampoco se obtuvieron diferencias para la IC mínima obtenida para los animales microquiméricos y los WT (Figura 42).

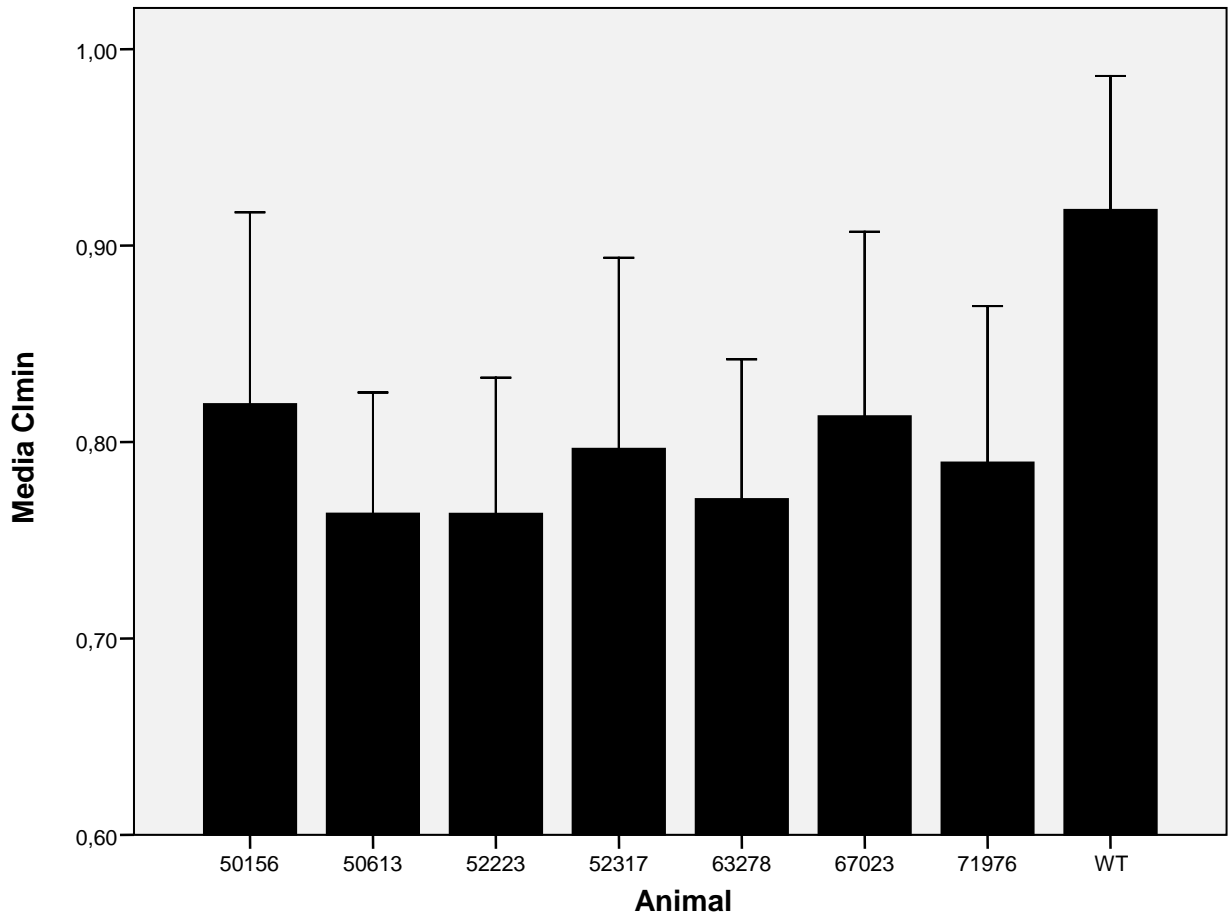


Figura 42. IC_{min} obtenida para animales microquiméricos y WT.

Estos resultados corroborarían la pérdida de células humanas circulantes, lo que hace que desaparezca la diferencia entre animales quiméricos, no quiméricos y de control, con respecto a los hematíes resistentes a los anticuerpos preformados y el complemento.

4.3.3. Hemólisis mediada por anticuerpos y complementos mediante el método clásico (APA)

4.3.3.1.- Hemólisis media obtenida mediante APA

Para las reacciones de APA clásica se realizó una recta de regresión entre la concentración de suero añadida y el valor de hemólisis relativa. La recta con la fórmula de regresión y el coeficiente de determinación aparecen en la Figura 43, tanto para las rectas realizadas con adición de complemento exógeno como para las que se realizaron sin adición de complemento.

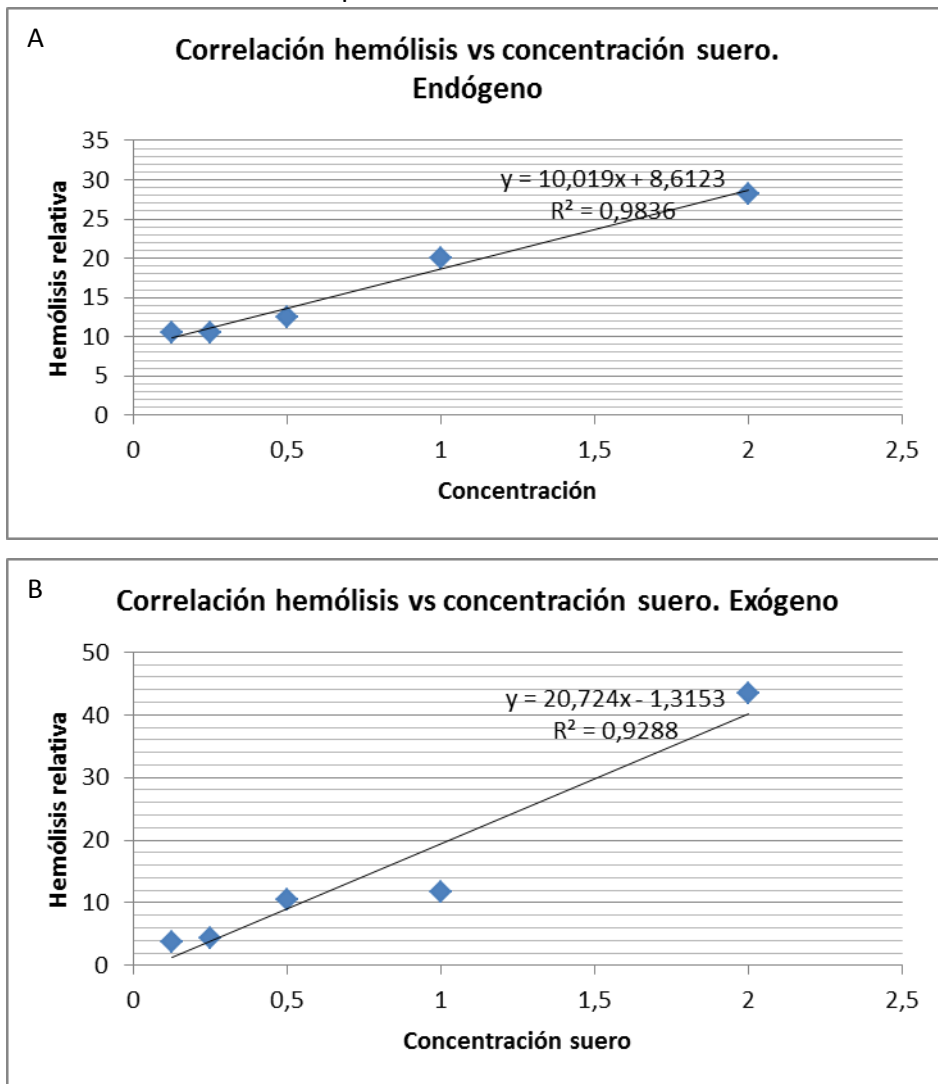


Figura 43. Correlación entre hemólisis relativa y concentración de suero A) Sin adición de complemento exógeno y B) Con adición de complemento exógeno

Al comparar las hemólisis medias obtenidas para los animales quiméricos, no quiméricos y de fenotipo salvaje, se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) mediante el test de Kruskal-Wallis (Figura 44). Al comparar los grupos dos a dos mediante la U de Mann-Whitney se observaron diferencias entre los animales del grupo quimérico con los otros dos ($p < 0,001$ con ambos), pero no se observaron diferencias entre los animales no quiméricos y de fenotipo salvaje ($p = 0,077$) (Figura 45).

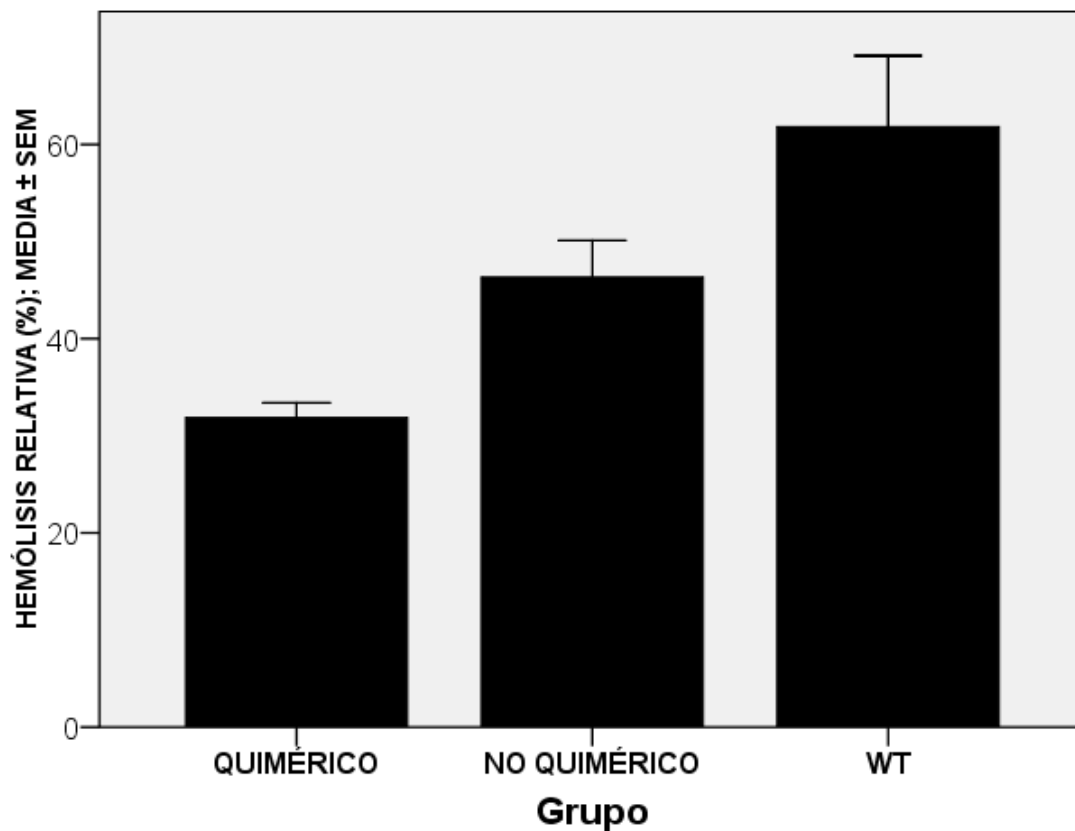


Figura 44. Hemólisis media para cada grupo experimental.

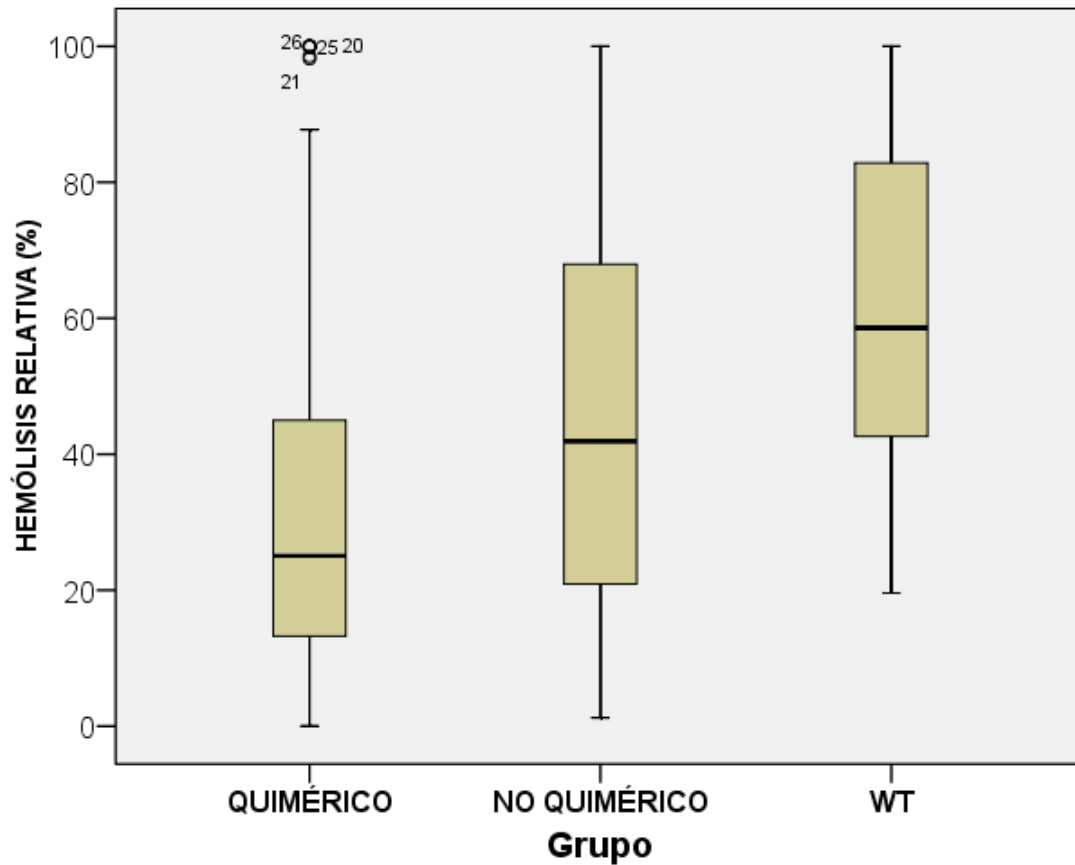


Figura 45. Diagrama de cajas para la hemólisis observada para cada grupo experimental. Las cajas están delimitadas por los cuartiles 25 y 75, dejando en el centro la mediana.

Al comparar los grupos dependiendo de la adición de complemento exógeno o no (Figura 46), se observaron diferencias entre los animales quiméricos y los de fenotipo salvaje en ambos casos ($p=0,003$ sin complemento exógeno y $p=0,001$ con complemento exógeno añadido).

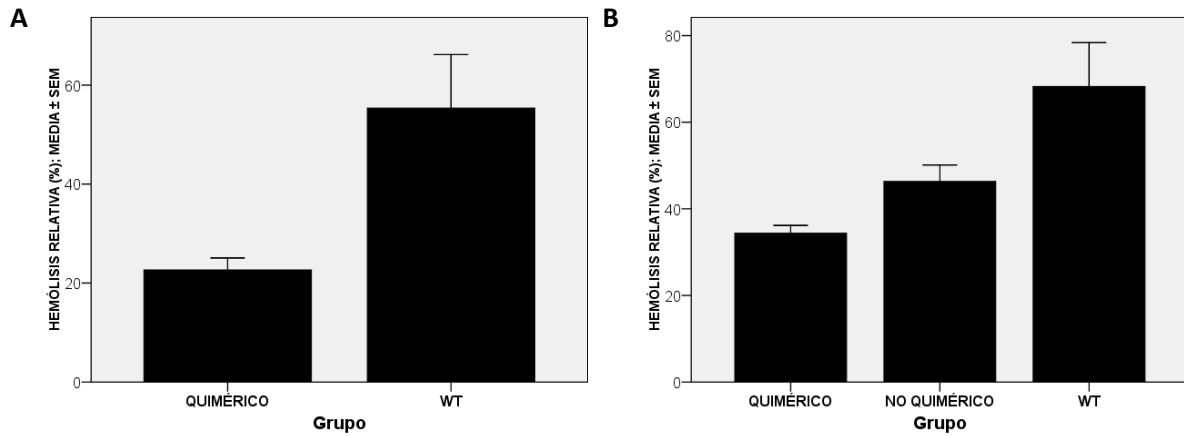


Figura 46: Comparación entre grupos A) sin complemento exógeno añadido y B) con complemento exógeno añadido.

Las APA realizadas con complemento exógeno mostraron una diferencia significativa con las que no se les añadió complemento de conejo cuando el suero usado fue humano ($p < 0,001$), pero no cuando el suero era de babuino ($p = 0,23$) (Figura 47).

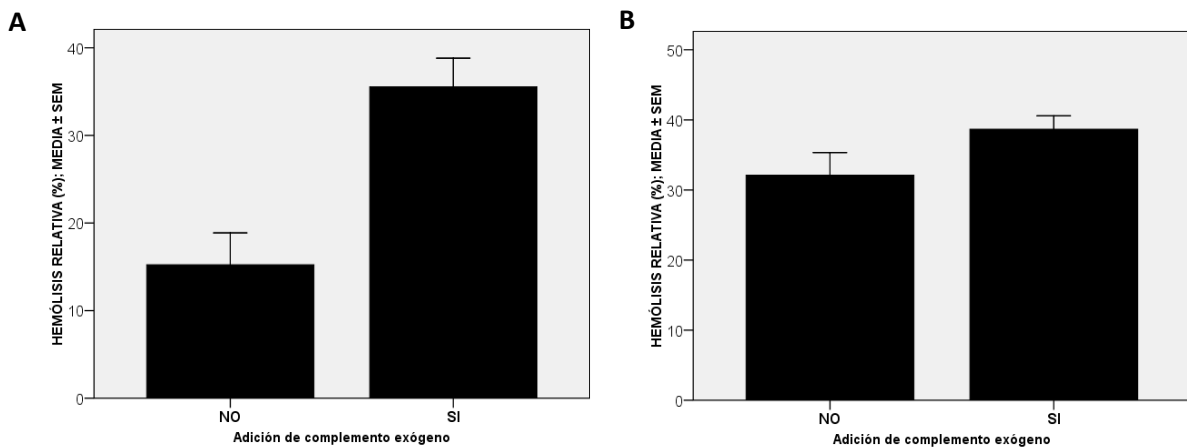


Figura 47: Comparación entre las hemólisis realizadas con y sin complemento exógeno añadido. A) con suero humano y B) con suero de babuino.

Los resultados obtenidos con y sin la adición de complemento exógeno tuvieron una correlación media ($r=0,544$; $p=0,014$).

Al comparar las hemólisis producidas por cada especie (Figura 48), independientemente de la adición de complemento, se observaron diferencias en el grupo de quiméricos cuando el suero usado fue humano ($p<0,001$), pero no hubo diferencia en el grupo de animales de fenotipo salvaje.

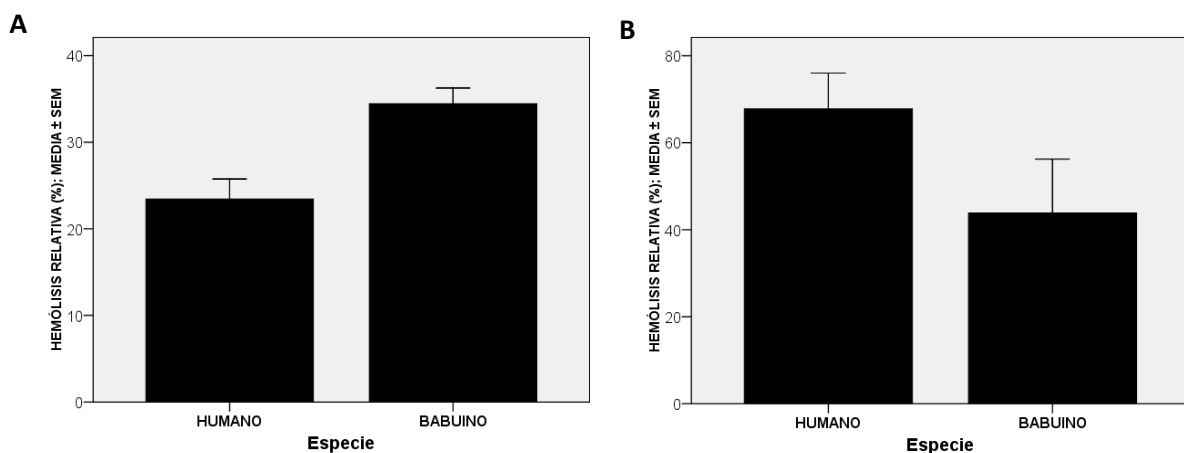


Figura 48: Comparación entre las hemólisis realizadas con suero humano y de babuino. A) en el grupo de animales quiméricos y B) en el grupo de animales de fenotipo salvaje.

Al comparar las especies de primate de la que se obtuvo el suero (Figura 49), independientemente de la adición de complemento, también se observaron diferencias entre grupos tanto en aquellos donde se realizó la hemólisis con suero humano ($p<0,001$) como en las que se realizó con suero de babuino ($p=0,017$). En el caso de los babuinos, donde se probaron los tres grupos, hubo diferencias de los quiméricos con los no quiméricos ($p=0,006$) y los WT ($p<0,001$), pero no hubo diferencias entre los no quiméricos y los WT.

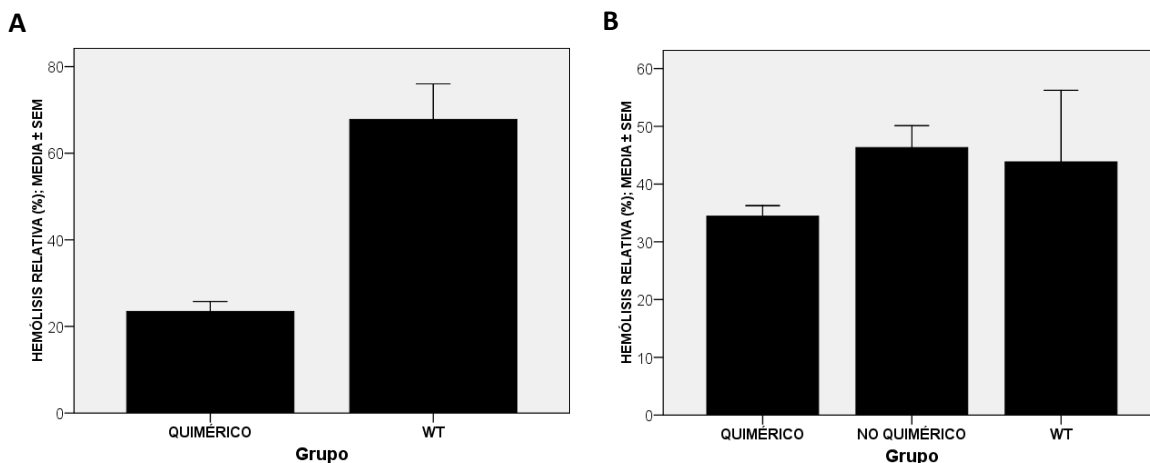


Figura 49: Comparación entre grupos A) con suero humano y B) con suero de babuino.

La presencia de hematíes con HLA-I humano en superficie, como se demostró con la técnica de la inmunocitoquímica, podría explicar la protección frente a la reacción de APA. Además, corroboraría que aquellos animales en los que se observó quimerismo mediante CF tienen menos hemólisis mediada por anticuerpos y complemento, puesto que habría un porcentaje de hematíes que serían humanos y, por tanto, no tendrían antígenos α -gal en superficie y no sufrirían la reacción detonada por los xenoanticuerpos preformados y el complemento.

4.3.3.2.- APA clásicas comparando la primera extracción sanguínea con la segunda

Los resultados obtenidos para APA clásica utilizando hematíes de la 1ª y de la 2ª extracción se compararon mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas, observándose una diferencia significativa cuando se compararon todas las hemólisis realizadas con hematíes procedentes de la primera extracción comparada con la segunda ($W=-3,77$; $p<0,001$) (Figura 50).

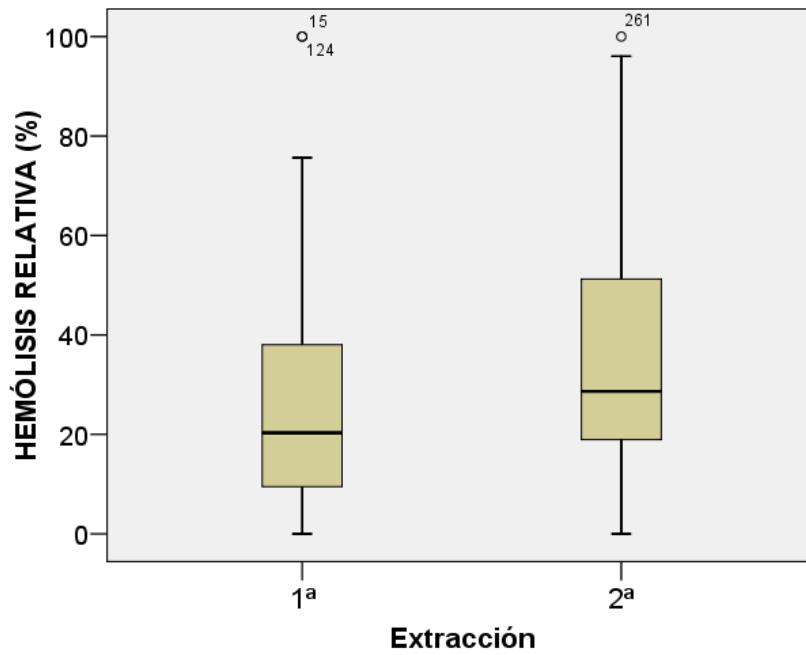


Figura 50: Diagrama de cajas para la hemólisis clásica producida por suero obtenido en la primera extracción y en la segunda. Las cajas están delimitadas por los cuartiles 25 y 75, la línea central marca la mediana.

Cuando se compararon las APAs producidas sobre los hematíes de ambas extracciones, pero discriminando entre los grupos con complemento exógeno añadido (Figura 51), también se obtuvieron diferencias significativas, tanto para las APAs con complemento exógeno añadido ($Z=-3,046$; $p=0,002$) como a las que no se añadió complemento exógeno ($Z=-2,48$; $p=0,013$).

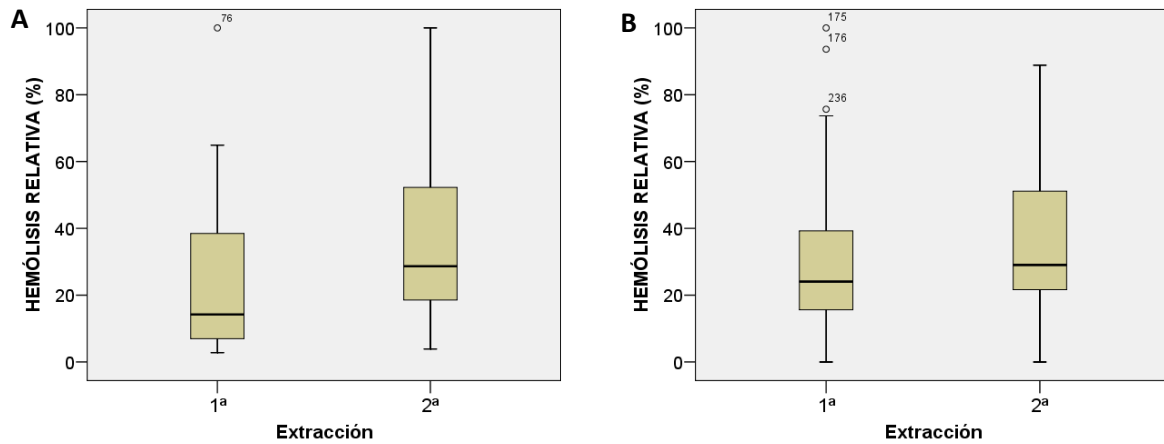


Figura 51: Hemólisis relativa producida sobre hematíes de la primera y la segunda extracción A) Sin adición de complemento exógeno y B) Con adición de complemento exógeno.

Cuando se compararon las APAs producidas por humanos o por babuinos, independientemente de la adición de complemento (Figura 52), se encontraron diferencias entre ambas extracciones en las hemólisis con suero humano ($Z=-4,772$, $p<0,001$) pero no en las realizadas con suero de babuino ($Z=-1,097$; $p=0,273$).

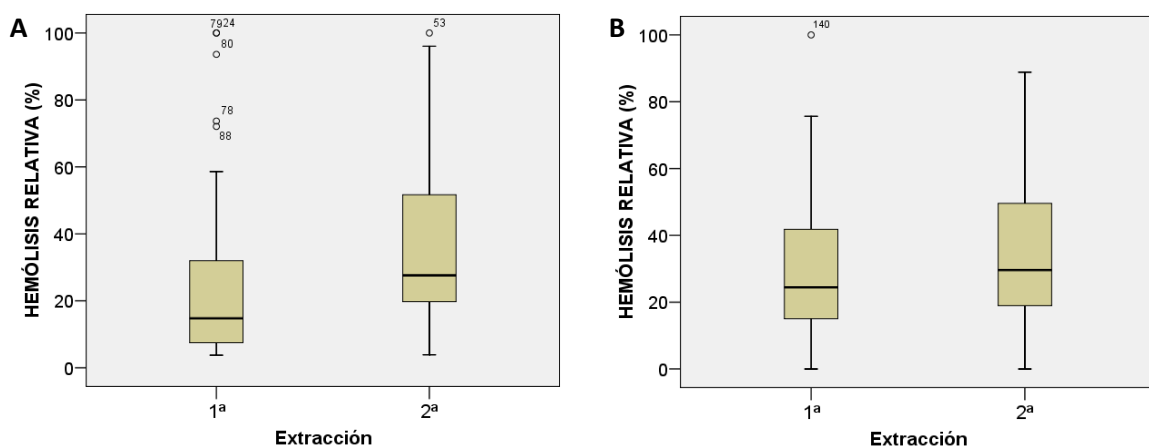


Figura 52: Hemólisis relativa producida sobre hematíes de la primera y la segunda extracción A) Con sueros humanos y B) Con suero de babuino.

Al comparar ambas extracciones, según la especie de primate y la adición de complemento exógeno (Figura 53), se obtienen resultados similares, con diferencias entre extracciones en el humano independientemente de la adición de complemento ($Z=-3,882$, $P>0,001$ y $Z=-2,8$, $p=0,005$; sin y con complemento exógeno añadido) y sin diferencias en ambos grupos usando suero de babuino ($Z=-0,154$, $p=0,877$; $Z=-1,697$, $p=0,09$).

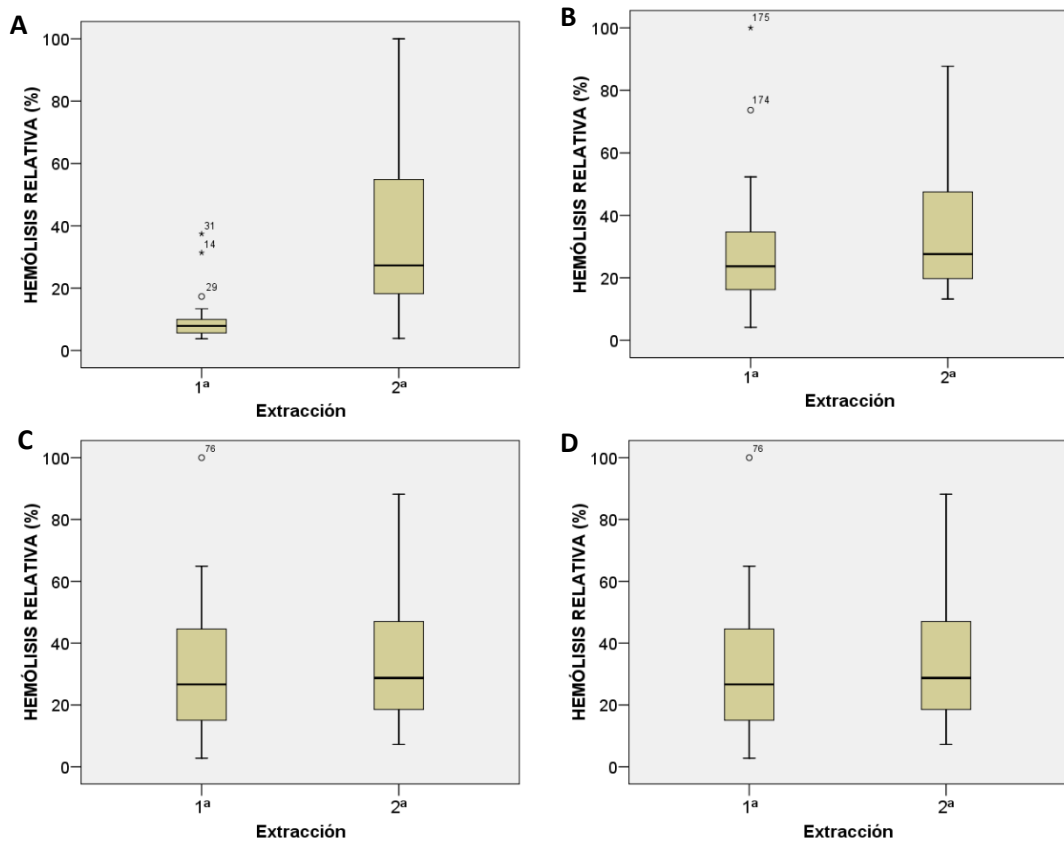


Figura 53: Hemólisis relativa producida por sueros de la primera y la segunda extracción en A) Humano sin adición de complemento exógeno; B) Humano con adición de complemento exógeno; C) Babuino sin adición de complemento exógeno y D) Babuino con adición de complemento exógeno.

Al comparar animal por animal los resultados de cada una de las dos pruebas de hemólisis, se encontraron correlaciones tanto en el grupo al que se le añadió complemento exógeno ($r=0,288$; $p=0,043$) como al grupo al que no se le añadió complemento exógeno ($r=-0,291$; $p=0,041$).

La adición de complemento exógeno dio lugar a una disminución de los valores de IC_{min} , lo que significa que una mayor concentración de complemento produciría una citotoxicidad mayor, o incluso alteraciones en las células, evento previamente descrito en ensayos hemolíticos (Cozzi *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 2004; Díaz-Román *et al.*, 2006).

El aumento en el porcentaje relativo de hemólisis estaría relacionado con la desaparición progresiva de las células humanas entre la toma de sangre a los 15 días de edad y a los dos meses.

4.3.3.3.- Correlación hemólisis clásica vs RTCA

Se ha encontrado una correlación positiva entre el resultado obtenido para la hemólisis medida en xCELLigence y la observada mediante la técnica clásica usando los hematíes de la segunda toma de muestras, al comparar los resultados obtenidos en el RTCA a la hora y las dos horas ($r=0,534$ y $r=0,487$; $p<0,001$) y entre la diferencia con el cultivo control y las APAs a la hora y dos horas post-adición del suero ($r=0,462$ y $r=0,501$; $p<0,001$) al añadir complemento exógeno en el APA (iguales condiciones que en el RTCA). Sin embargo, al comparar los resultados de la hemólisis clásica usando los hematíes de la primera extracción con los resultados del RTCA (2ª extracción), no se encontró correlación con el NIC obtenido a la hora y dos horas post-adición de suero

($r=0,294$ y $r=0,335$; $p=0,102$ y $p=0,061$, respectivamente), aunque sí la tuvo con las diferencias con el cultivo control en RTCA ($r=0,352$; $p=0,048$ y $r=0,359$; $p=0,043$, respectivamente).

Cuando no se añade complemento de conejo no hay correlación entre la disminución del IC y el porcentaje relativo de hemólisis encontrado. Igualmente, cuando se comparan los resultados obtenidos en las hemólisis realizadas con las sangres de la primera toma de muestras, no hay correlación con los resultados obtenidos en el RTCA que se realizó con muestras obtenidas en la segunda toma. Esto indicaría que hay una variación en el porcentaje de hemólisis en cada toma de muestras como se demostró en el apartado anterior.

4.4 Relación entre los distintos parámetros analizados

4.4.1. Correlación entre las hemólisis clásicas y la CF

Se encontró correlación entre los resultados obtenidos para la hemólisis utilizando hematíes de la primera extracción y con adición de complemento exógeno con el porcentaje de células totales mediante CF ($r=0,438$, $p=0,03$), con el porcentaje de monocitos ($r=0,449$, $p=0,017$) y con el porcentaje de linfocitos ($r=0,410$; $p=0,030$). Sin embargo, no hubo correlación cuando no se añadió complemento exógeno utilizando hematíes de la primera extracción ni en ningún caso cuando se hicieron las reacciones de hemólisis con los hematíes obtenidos en la segunda extracción.

Estos resultados indicarían la relación entre la presencia de células mononucleares con HLA I en superficie y hematíes resistentes a la hemólisis, ya que las pruebas de CF se hicieron con la sangre obtenida en la primera toma de muestras. La ausencia de correlación entre esta prueba y las hemólisis realizadas con hematíes de la segunda toma corroborarían la disminución o desaparición de células humanas.

4.4.2. Correlación entre las hemólisis RTCA y la CF

Como era de esperar, no se encontró ninguna correlación entre los valores obtenidos en la hemólisis mediante RTCA (CI a una y dos horas pos-desafío y diferencia de CI con el cultivo control a una y dos horas post-desafío) con los resultados de la CF, ya que se utilizaron hematíes y células mononucleares de distintas tomas de muestra en cada uno de los dos experimentos. Esto estaría en consonancia con la ausencia de correlación entre las CF y las APA clásicas usando hematíes de distintas tomas de muestras.

4.4.3. Correlación entre las hemólisis clásicas y la determinación de Alu-Y8

Tan sólo se encontró correlación entre la hemólisis clásica con adición de complemento y usando hematíes de la primera toma de muestras con la cantidad de copias de *Alu* encontradas en los riñones ($r=0,533$; $p=0,007$).

4.4.3. Correlación entre las hemólisis RTCA y la determinación de Alu-Y8

No se encontró ninguna correlación entre la hemólisis observada por RTCA y las copias de *Alu* encontradas en los distintos tejidos.

V. CONCLUSIONES

1. La técnica de implante percutáneo ecoguiado de células STEM en fetos de hasta 50 días de gestación es adecuada en cuanto a rendimiento reproductivo y obtención de lechones quiméricos. Esta técnica supone una mejoría y simplificación sustanciales frente a las técnicas con laparotomía utilizadas hasta la fecha para el mismo fin.
2. En los animales quiméricos se encuentran células circulantes con HLA I humano y ADN humano aun utilizando baja densidad de células en el implante *in utero*.
3. Se ha encontrado ADN humano en más lechones que los que se inyectaron *in utero* lo que confirma el tránsito de células entre lechones de la misma camada.
4. La duración del quimerismo, en términos de detección de células con complejo mayor de HLA I en superficie es insuficiente para que los cerdos alcancen un tamaño de donante adecuado para un humano adulto.
5. El genotipo de la cerda receptora se ha demostrado crítico para los resultados ya que las cerdas cruzadas produjeron rendimientos comparables a cerdas comerciales mientras que ninguna de las gestaciones de las cerdas puras llegó a término.
6. Las pruebas de hemólisis indican que los hematíes de los animales con moléculas de HLA I en superficie sufren menos hemólisis que los animales sin estas moléculas o el fenotipo salvaje. De ello se deduciría que sufrirían menor efecto del RHA.
7. La capacidad de protección frente a la hemólisis disminuye con el tiempo, de forma paralela a la reducción de las copias de ADN humano o de la presencia de células con HLA I en superficie.

VI. RESUMEN

No hay duda que el poder disponer de órganos animales para trasplante solucionaría el problema de su escasez. Pero para que los xenotrasplantes puedan llegar a ser una realidad clínica, se deben superar varias barreras, siendo una de la más importante la barrera inmunológica. Durante los últimos años las líneas de investigación han estado dirigidas a la creación de estrategias para la inducción de tolerancia inmunológica tanto de las células T como B.

Una estrategia especialmente prometedora para acercarnos a la xenotolerancia es conseguir tolerancia de las células B, mediante la obtención del quimerismo mixto hematopoyético.

El objetivo de este trabajo ha sido generar lechones con quimerismo mixto mediante la inyección ecoguiada intrauterina de un número bajo de diferentes estirpes celulares humanas y determinar posteriormente la resistencia al rechazo hiperagudo *in vitro* mediante técnicas clásicas.

Para lograr este objetivo se procedió a la puesta a punto de una técnica ecográfica ecoguiada intrauterina, incluyendo pruebas de citotoxicidad de un contraste sonográfico mediante análisis celular en tiempo real. Finalmente se procedió a la inyección ecoguiada de 15 cerdas, usando distintas densidades de células STEM humanas CD34+, células mononucleares totales de sangre de cordón umbilical y células mesenquimales de médula ósea.

Cuatro de las cerdas inyectadas parieron lechones vivos. En estos animales se determinó la presencia de quimerismo mixto *in vitro* mediante diferentes técnicas clásicas: PCR, citometría de flujo (CF), inmunocitoquímica y técnica ELISA para determinación de albúmina humana. Además, se realizaron pruebas de hemólisis *in vitro* mediante sistema RTCA xCELLigence y el método clásico (APA).

Utilizando CF para identificar células con HLA I A, B o C en sangre periférica de todos los lechones nacidos vivos a los 15 días de edad, se encontraron 13 positivos de 58 lechones

testados, procedentes de dos de las inyecciones realizadas. La presencia de más animales positivos de los inyectados nos indica que hubo tránsito de dichas células humanas entre hermanos de camada. Estos 13 animales positivos fueron testados de nuevo a los dos meses de edad y ninguno fue positivo, demostrando la desaparición de las células quiméricas o humanas con el paso del tiempo.

Mediante q-PCR para la detección del gen *Alu* Yb8 humano, se analizaron las muestras sanguíneas y tejidos de animales muertos perinatalmente (N=8), así como el tejido hepático (n= 59), cardíaco (n=53), renal (n=54) e intestino grueso y delgado (n=63) de los animales nacidos vivos procedentes de cerdas inyectadas. En los animales muertos perinatalmente se encontró el gen humano en distintos tejidos y en mayor cantidad que en los animales nacidos vivos ($p < 0,001$). En sangre periférica de lechones nacidos vivos se encontró ADN humano en más animales de los que fueron inyectados en cada camada, al igual que sucedía en la CF. Esto confirmaría que habría tráfico celular entre los lechones durante la gestación. En cuanto a los tejidos de estos lechones, se determinó la presencia de *Alu* humano en el 37,74% de las muestras cardíacas, el 54,2% de las muestras hepáticas y el 16,7% de las muestras renales y no se pudo determinar la presencia de células humanas en ninguna muestra de intestino delgado o grueso. En los animales positivos por CF se detectó este gen en PBMCs, hígado y corazón, con una frecuencia significativamente mayor que en los que fueron negativos para HLA I en sangre. Se observó una diferencia significativa al comparar la densidad de *Alu* en animales positivos y negativos a HLA I, pero para interpretar estos resultados hay que tener en cuenta que los datos de CF utilizados fueron aquellos obtenidos en la primera prueba realizada, cuando los animales tenían 15 días de edad, mientras que los resultados de *Alu* en tejidos son los que se obtuvieron a los 80 y 175 días de edad para los animales negativos y positivos por CF, respectivamente. El hecho de que los animales negativos a CF, sacrificados con anterioridad a los animales positivos, muestren valores medios superiores a los segundos,

indicaría que se ha ido perdiendo el quimerismo y que en los animales sacrificados más tarde la cantidad de ADN humano detectable es menor.

Mediante inmunocitoquímica, no se observaron células teñidas en ninguno de los tejidos valiosos para trasplante (hígado, riñón, corazón o pulmón). Sin embargo, en algunas de las muestras de bazo se observaron hematíes inmunorreactivos al anticuerpo anti-HLA. Tampoco se encontró albumina humana mediante ELISA.

Finalmente, se determinó la resistencia al RHA mediado por anticuerpos y complemento mediante la técnica clásica de hemólisis (APA) y se evaluó la hemólisis mediante la puesta a punto y uso de una técnica de análisis celular en tiempo real (RTCA). Se encontró que mediante APA clásica se apreciaba un nivel de hemólisis significativamente creciente al comparar animales CF+, CF- y no modificados. Se observaron también diferencias entre los hematíes tomados a los 15 y a los 80 días de vida, con un mayor nivel de hemólisis en estos últimos. La presencia de hematíes con HLA I humano en superficie, como se demostró con la técnica de la inmunocitoquímica, podría explicar la protección frente a la reacción de APA. Además, corroboraría que aquellos animales en los que se observó quimerismo mediante CF tienen menos hemólisis mediada por anticuerpos y complemento, puesto que habría un porcentaje de hematíes que serían humanos, por tanto, no tendrían antígenos α -gal en superficie y no sufrirían la reacción detonada por los xenoanticuerpos preformados y el complemento. Esta capacidad de protección disminuiría con el tiempo, de forma paralela a la reducción de las copias de ADN humano o de la presencia de células con HLA I en superficie.

VII. SUMMARY

There is no doubt that having animal organs for xenotransplantation will solve the shortage of human tissues for transplantation. But for xenotransplantation to become a clinical reality have to overpass different barriers, such as immunological rejection. During years the research has been focused on different strategies to get donors avoiding this kind of rejection. Among them is the generation of B cells xenotolerance, inducing immunological tolerance against T and B cells.

Thus, the aim of this work has been to generate piglets with mixed chimerism through ecoguided *in utero* cellular injection with a low number of different types of human cells and to determinate the ability of these animals to overpass hyperacute rejection by means of different analytical technics.

To achieve this aim, firstly a percutaneous ecoguided technic was designed and refined, including the assessment of cytotoxicity against human and pig cells of an ultrasonographic contrast agent. STEM CD34+ cells, total mononuclear cells from umbilical cord blood and cultured mesenchymal human cells from marrow bone were injected into 15 sows.

Four injected sows produced alive piglets. Mixed chimerism was determined in samples from these piglets using flow cytometry (CF), immunohistochemistry, and ELISA to detect human albumin. Moreover, hemolysis assays were performed in a double way: classical APA and APA based in real time cells analysis (RTCA).

Using CF the presence of cells having HLA I molecules on surface of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) obtained from piglets on 15th and 80th days was identified. Thirteen out of 58 piglets resulted positive and these animals were born only from two sows. The number of positive piglets higher than injected piglets confirms the cell trafficking among litter matters *in utero*.

By means of real time PCR to detect *Alu* human gene, human DNA was researched in blood samples, tissue samples from death born piglets (n=8) and liver (n=59), heart (n=53), kidney (n=54) and small and large intestine (n=63) from alive born piglets coming from injected sows. Human DNA was found in higher frequency and quantity in death born piglets ($p < 0,001$). The *Alu* gene was identified in PBMCs from 33 piglets, confirming thus the cellular trafficking. This gene was also identified in 37.73% of heart samples, 54.2% of liver samples, 16.7% of kidney samples and none of gut and intestine samples. The animals CF+ showed higher frequency of samples with human DNA than CF- animals. There was higher density of *Alu* copies in CF- animals than in CF+ but it should be taken into account that samples from CF- were obtained 2 months before CF+ samples. All these data point out to a progressive decrease in the number of human cells with the age of the animals.

There was no positive immunostained cells for HLA I, except for red blood cells in spleen. There was not found human albumin in sera samples by ELISA.

As regards protection against hyperacute rejection, using the hemolysis assays (classical APA and RTCA assay) there was difference comparing CF+ and CF- animals. By means of APA assay, there was significant higher hemolysis percentage comparing CF+, CF- and wild phenotype pigs. There was also higher hemolysis in the second blood sampling compared to the first one. The presence of red blood cells in tissue samples could explain this effect. So, in the CF+ animals would have a certain number of red blood cells of human origin avoiding the effect of anti-alpha-gal antibodies. The difference between the first and the second blood sampling would corroborate again the decrease of the human origin cells in the chimeric animals.

VIII. ABREVIATURAS

Acs: Anticuerpos

Acs anti- α Gal: Anticuerpos naturales contra α Gal

APA: Pruebas de Hemólisis in Vitro Mediada por Anticuerpos anti-cerdo

AUC: Área bajo la Curva

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CF: Citometría de Flujo

CRP: Proteínas Reguladoras del Complemento

Ct: Ciclo umbral

CVF: Factor de Veneno de Cobra

DA: Donación en Asistolia

DAB: 3-3' Tetracloruro de Diaminobencidina

DAF: Decay Accelerating Factor

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Ds: Desviación estándar

Du: Duroc

EBV: Virus Epstein-Barr

EIA: Inmunoadsorción Extracorpórea

ELISPOT: Inmunoensayos ligados a enzimas

FDA: Food and Drug Administration

GTKO: Cerdos knockout para el Locus α -1, 3-galactosiltransferasa

GDV: Granja Docente de Veterinaria

KO: Cerdos Knock-out

hCRP: Proteínas Reguladoras de Complemento Humano

HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos

HT: H-transferasa

IC: Índice Celular

IC_{max}: Índice Celular Máximo

IC_{min}: Índice Celular Mínimo

IHQ: Inmunocitoquímica

IUHCT: Trasplante de Células Madre Hematopoyéticas en Útero

LD: Landrace

LDH: Lactato Deshidrogenasa

LM: Lechones Momificados

LNM: Lechones Nacidos Muertos

LNT: Lechones Nacidos Totales

LNV: Lechones Nacidos Vivos

LW: Large White

MAC: Complejo de Ataque de Membrana

MCP: Proteína Cofactor de Membrana

MCU: STEM Procedentes de Mononucleares Totales de Cordón Umbilical

MMO: Células Mesenquimales Aisladas de Médula Ósea

NIC: Índice Celular Normalizado

- ONT: Organización Nacional de Trasplantes
- PBMCs: Células Mononucleares de Sangre Periférica
- PBPC: Células Progenitoras de Sangre Periférica Movilizadas
- PERV: Retrovirus Endógenos Porcinos
- qPCR: PCR Cuantitativa o en Tiempo Real
- RHA: Rechazo Hiperagudo
- RTCA: Sistema de Análisis Celular en Tiempo Real Mediante la Medición de Impedancia
- RVA: Rechazo Vascular Agudo
- SCID mouse: Ratón Completamente Inmunocompetente
- SPF: Specific Pathogen Free
- TH: Trasplante hepático
- TIC_{max}: Tiempo Para Alcanzar el Índice Celular Máximo
- TIC_{min}: Tiempo al que se Produce el IC_{min}
- T_m: Temperatura de disociación
- XenoAcs: Anticuerpos Naturales Xenoreactivos
- αGal: Azúcares de tipo αGalactosa (1-3) β-Galactosa

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abtahi H, Sadeghi MR, Shabani M, Edalatkhah H, Hadavi R, Mehdi Akhondi M, Talebi S. Causes of bimodal melting curve: asymmetric guaninecytosine (GC) distribution causing two peaks in melting curve and affecting their shapes. *Afr J Biotechnol* 2011; 10:101.
- Ahn C, Kim JY, Lee BC, Kang SK, Lee JR, Hwang WS. The past, present, and future of xenotransplantation. *Yonsei Med J.* 2004; 45: 1017-24.
- Almeida-Porada G, Flake AW, Glimp HA, Zanjani ED. Cotransplantation of stroma results in enhancement of engraftment and early expression of donor hematopoietic STEM cells in utero. *Exp Hemato.* 1999; 27(10): 1569-75.
- Amoroso E C. Placentation. In 'Marshall's Physiology of Reproduction'. 1952; 3rd edn. (Ed. A. S. Parkes.) pp. 127-311.
- Alexandre GP, Gianello P, Latinne D. Plasmapheresis and splenectomy in experimental renal xenotransplantation. In Hardy MA. eds *Xenograft*. NY, Elsevier, 1989. p25
- Amir M, Emily T, Aimen F. Regulation of the earliest immune response to in utero hematopoietic cellular transplantation. *Chimerism.* 2010; 1: 61-63;
- Ashizuka S, Peranteau WH, Hayashi S, Flake AW. Busulfan conditioned bone marrow transplantation results in high-level allogeneic chimerism in mice made tolerant by in utero hematopoietic cell transplantation. *Exp Hematol.* 2006; 34: 359-368.
- Ashton-Chess J, Meurette G, Karam G, Petzold T, Minault D, Naulet J, Tesson L, Plat M, Anegon I, Soullillou JP, Blancho G. The study of mitoxantrone as a potential immunosuppressor in transgenic pig renal xenotransplantation in baboons: comparison with cyclophosphamide. *Xenotransplantation.* 2004; 11: 112-22.
- Bak T, Wachs M, Trotter J, Everson G, Trouillot T, Kugelmas M, Steinberg T, Kam I. Adult-to-adult living donor liver transplantation using right-lobe grafts: results and lessons learned from a single-center experience. *Liver Transpl.* 2001; 7: 680-6.
- Barnard C.N., Wolpowitz A., Losman J.G. Heterotopic cardiac transplantation with xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass. *S Afr Med J.* 1977; 52: 1035.
- Bailey LL, Nehlsen Cannarella SL, Concepcion W, Jolley WB. Baboon to human cardiac xenotransplantation in a neonate. *J Amer Med Assoc.* 1985; 254:3321.
- Benichou G, Nadazdin O, Cosimi AB, Kawai T. Successful Tolerance to Fully MHC Disparate Renal Allografts via Donor Hematopoietic Mixed Chimerism in Non-Human Primates. *Am J Transplant.* 2013; 13:2500

- Becker M, Nitsche A, Neumann C, Aumann J, Junghahn I, Fichtner I. Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems. *Br J Cancer*. 2002; 87:132
- Billingham REL, GH, Medawar PB, Williams HLL. Tolerance to homografts, twin diagnosis, and the freemartin condition in cattle. *Heredity*. 1952; 6: 201–212
- Blakemore K, Hattenburg C, Stetten G, Berg K, South S, Murphy k, Jones R. In utero hematopoietic stem cell transplantation with haploidentical donor adult bone marrow in a canine model. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 190: 960-973.
- Blazar BR, Taylor PA, Vallera DA. Adult bone marrow-derived pluripotent hematopoietic stem cells are engraftable when transferred in utero into moderately anemic fetal recipients. *Blood*. 1995; 85: 833-841.
- Blusch JH, Patience C, Martin U. Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2002; 9: 242-251
- BPEX. 2010 pig cost of production in selected countries
http://pork.ahdb.org.uk/media/2372/2010_pig_cost_of_production_in_selected_countries.pdf
- 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; 12: 134-41.
- Broelsch CE, Burdelski M, Rogiers X, Gundlach M, Knoefel WT, Langwieler T, Fischer L, Latta A, Hellwege H, Schulte FJ, Schmiegel W, Sterneck M, Greten H, Kuechler T, Krupski G, Loeliger C, Kuehnl P, Pothmann W, Schulte J. Living donor for liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20: 49S-55S.
- Bucher P, Morel P, Buhler LH. Xenotransplantation: an update on recent progress and future perspectives. *Transpl Int*. 2005; 18: 894-901.
- Bucuvalas JC, Ryckman FC. The long-and-short-term outcome of living-donor liver transplantation. *J Pediatrics* 1999; 134: 259-61.
- Buhler L, Awwad M, Treter S, Chang Q, Basker M, Alwayn I. P, Teranishi K, Ericsson T, Moran K, Harper D, Kurilla-Mahon B, Huang C, Sackstein R, Sykes M, White-Scharf M, Sachs D, Down J. D, Cooper DK. Pig hematopoietic cell chimerism in baboons conditioned with a nonmyeloablative regimen and CD154 blockade. *Transplantation*. 2002; 73: 12–22.

- Buhler L, Goepfert C, Kitamura H, Basker M, Gojo S, Alwayn IP, Chang Q, Down JD, Tsai H, Wise R, Sachs DH, Cooper DK, Robson SC, Sackstein R. Porcine hematopoietic cell xenotransplantation in nonhuman primates is complicated by thrombotic microangiopathy. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 27: 1227–1236.
- Calne RY, White HJO, Herbertson BM, Millard PR, Davis DR, Salaman JR, Samuel JR. Pig to baboon liver xenografts. *Lancet.* 1968; 1: 1176-8.
- Calne RY, Davis DR, Pena JR, Balner H, de Vries M, Herbertson BM, Joysey VC, Millard PR, Seaman MJ, Samuel JR, Stibbe J, Westbroek DL. Hepatic allografts and xenografts in primates. *Lancet.* 1970; 1: 103-6.
- Caplan A. The case for using pigs. *Bull World Health Organ.* 1969; 77: 67-8.
- Caraguel CG, Stryhn H, Gagné N, Dohoo IR, Hammell KL. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *J Vet Diagn Invest* 2011;23.
- Carrier E, Lee TH, Busch MP, Cowan MJ. Induction of tolerance in nondefective mice after in utero transplantation of major histocompatibility complex-mismatched fetal hematopoietic stem cells. *Blood.* 1995; 86: 4681-4690.
- Castalino DJ, Salem HH. Natural anticoagulants and the liver. *J Gastroenterol Hepatol.* 1997; 12: 77–83.
- Chiang TR; Fanget L; Gregory R, Tang Y, Ardiet DL, Gao L, Meschter C, Kozikowski A, Buelow R, Vuist W. Anti-Gal antibodies in humans and 1, 3alpha-galactosyltransferase knock-out mice. *Transplantation.* 2000; 69: 2593–2600.
- Christensen JL, Wright DE, Wagers AJ, Weissman IL. Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLoS Biol.* 2004; 2: E75.
- Contreras JL, Chan C, Vilatoba M, Anthon FJ, Podgaetz E, Eckhoff D E. Trasplante hepático; Consideraciones generales. *Rev. Gastroenterol Mex.* 2003; 68: 7-18.
- Cooper DKC, Gollackner B, Sachs DH. Will the pig solve the transplantation backlog? *Annu Rev Med.* 2002; 53: 133-147.
- Cowan PJ, Aminian A, Barlow H, Brown AA, Chen CG, Fiscaro 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; 69: 2504-15.

- Cowan PJ, d'Apice AJ. The coagulation in xenotransplantation: incompatibilities and strategies to overcome them. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008; 13: 178–183.
- Cowan PJ, Robson SC, D'Apice AJ. Controlling coagulation dysregulation in xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011; 16: 214-21.
- Cozzi E, Bhatti F, Schmoeckel M, Chavez G, Smith KG, Zaidi A Bradley J, Thiru S, Goddard M, Vial C, Ostlie D, Wallwork J, White DJ, Friend P. Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation*. 2000; 70: 15-21
- Czaplicki J., Blonska B., Religa Z. The lack of hiperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human. *J. Heart Lung Transplant*. 1992; 11: 393.
- Daar AS. Ethics of xenotransplantation: animal issues, consent, and likely transformation of transplant ethics. *World J Surg*. 1997; 21: 975-82.
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*. 2002; 20: 251-255.
- Dalmasso AP, Platt JL. Prevention of complement-mediated activation of xenogeneic endothelial cells in an in vitro model of xenograft hyperacute rejection by C1 inhibitor. *Transplantation*. 1993; 56: 1171-6
- Davies ML, Xu, S, Lyons-Weiler J, Rosendorff A, Webber S A, Wasil L R, Metes D, Rowe. D T. Cellular factors associated with latency and spontaneous Epstein–Barr virus reactivation in B-lymphoblastoid cell lines. *Virology*. 2010; 400, 53-67
- 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.
- Diamond LE, McCurry KR, Martin MJ, McClellan SB, Oldham ER, Platt JL, Logan JS. Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium. *Transplantation*. 1996; 61: 1241-1249.
- ONT. Donación en Asistolia en España: Situación actual y Recomendaciones. Documento de Consenso Nacional 2012.
- Donahue J, Gilpin E, Lee TH, Busch MP, Croft M, Carrier E. Microchimerism does not induce tolerance and sustains immunity after in utero transplantation. *Transplantation*. 2001; 71: 359-368.

- Dorak MT. Real-time PCR. Ed: Taylor and Francis Group, Nueva York, EEUU. 2006; p.104.
- Dorfman JR, Raulet DH. Acquisition of Ly49 receptor expression by developing natural killer cells. *J Exp Med.* 1998; 187: 609-18.
- Ekser B, Gridelli B, Tector AJ, Cooper DKC. Pig liver xenotransplantation as a bridge to allotransplantation: which patients might benefit? *Transplantation.* 2009; 88: 1041–1049.
- Ekser B, Echeverri JG, Hassett CA, Yazer JM, Long C, Meyer M, Ezzelarab M, Che Lin C, Hara H, van der Windt JD, Dons MI, Phelps C, Ayares D, Cooper D, Gridelli B. Hepatic Function After Genetically Engineered Pig Liver Transplantation in Baboons. *Transplantation.* 2010; 90: 483–493
- Ekser B, Cooper DK. Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010; 6: 219-30.
- Ekser B, Echeverri GJ, Hassett AC, Yazer MH, Long C, Meyer M, Ezzelarab M, Lin CC, Hara H, van der Windt DJ, Dons EM, Phelps C, Ayares D, Cooper D, Gridelli B. Hepatic function after genetically engineered pig liver transplantation in baboons. *Transplantation.* 2010; 90: 483-9
- Ekser B, Kumar G, Veroux M, Cooper DK. Therapeutic issues in the treatment of vascularized xenotransplants using gal-knockout donors in nonhuman primates. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011; 16: 222-30.
- Ekser B, Burlak C, Waldman JP, Lutz AJ, Paris LL, Veroux M, Robson SC, Rees MA, Ayares D, Gridelli B, Taylor AJ, Cooper DKC. Immunobiology of liver xenotransplantation. *Expert review of clinical immunology.* 2012; 8:621-634.
- Emond JC, Rosenthal P, Roberts JP, Stock P, Kelley S, Gregory G, Lim RC, Ascher NL. Living related donor liver transplantation: the UCSF experience. *Transplant Proc.* 1996; 28(4):2375-7.
- Fishman JA. Infection in xenotransplantation. *BMJ.* 2000; 321: 717-8.
- Flake AW, Harrison MR, Adzick NS, Zanjani ED. Transplantation of fetal hematopoietic stem cells in utero: the creation of hematopoietic chimeras. *Science.* 1986; 233: 776-778.
- Frandsen RD, Wilke WL, Fails AD. *Anatomy and Physiology of Farm Animals.* 7ª edición. Ed: Wiley-Blackwell, Hoboken, EEUU. 2009, Pp. 528 .

- Fisher JE, Lillegard JB, Mckenzie TJ, Rodysill BR, Wettstein PJ, Nyberg SL. In utero Transplanted Human Hepatocytes Allows for Postnatal Engraftment of Human Hepatocytes in Pigs. *Liver Transpl.* 2013; 19(3): 328–335.
- Fleischman R, Mintz B. Prevention of genetic anemias in mice by microinjection of normal hematopoietic cells into the fetal placenta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76: 5736-5740.
- Fodor WL, Williams BL, Matis LA, Madri JA, Rollins SA, Knight JW, Velandar 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; 91: 11153-7.
- Fuchimoto Y, Huang CA, Yamada K, Shimizu A, Kitamura H, Colvin RB, Ferrara V, Murphy MC, Sykes M, White-Scharf M, Neville DM, Sachs DH. Mixed chimerism and tolerance without whole body irradiation in a large animal model. *J Clin Invest.* 2000; 105: 1779–1789.
- Fudaba Y, Spitzer TR, Shaffer J, Kawai T, Fehr T, Delmonico F, Preffer F, Tolkoff-Rubin N, Dey BR, Saidman SL, Kraus A, Bonnefoix T, McAfee S, Power K, Kattleman K, Colvin RB, Sachs D H, Cosimi A B, Sykes M. (2006). Myeloma responses and tolerance following combined kidney and nonmyeloablative marrow transplantation: in vivo and in vitro analyses. *Am. J. Transplant.* 6.
- Fujiki Y, Fukawa K, Kameyama K, Kudo O, Onodera M, Nakamura Y, Yagami K-I, Shiina Y, Hamada H, Shibuya A, Nakauchi H. Successful multilineage engraftment of human cord blood cells in pigs after in utero transplantation. *Transplantation.* 2003; 75: 916-922.
- Fujiki Y, Johnson KL, Tighiouart H, Peter I, Bianchi DW. Fetomaternal trafficking in the mouse increases as delivery approaches and is highest in the maternal lung. *Biol Reprod.* 2008;79:841.
- 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. *Hepatology Res.* 2003; 26: 106-113.
- Gill T. Chimerism in humans. *Transplant Proc.* 1977; 9: 1423-1431.
- Glasgow SC, Kanakasabai S, Ramachandran S, Mohanakumar T, Chapman WC. Complement depletion enhances pulmonary inflammatory response after liver injury. *J Gastrointest Surg.* 2006; 10: 357-64.

- Grant D, Mendicino M, Levy G. Xenotransplantation: Just around the corner? *Surgery*. 2001; 129: 243-7.
- Griesemer A, Yamada K, Sykes M. Xenotransplantation: Immunological hurdles and progress toward tolerance. *Immunol Rev*. 2014; 258: 241–258.
- Haller GW, Esnaola N, Yamada K, Wu A, Shimizu A, Hansen A, Ferrara VR, Allison KS, Colvin RB, Sykes M, Sachs DH. Thymic transplantation across an MHC class I barrier in swine. *Journal of immunology*. 1999; 163: 3785–3792.
- Hansen HE, Niebuhr E, Lomas C. Chimeric twins. T.S. and M.R. reexamined. *Hum Hered*. 1984; 34: 127-130.
- Hardy J.D., Kurrus F.E., Chavez C.M, Neely WA, Eraslan S, Don TurnerM, Fabian LW, Labecki TD. Heart transplantation in man: developmental studies and report of a case. *J Am Med Ass*. 1964; 188: 1132.
- Harrison MR, Slotnick RN, Crombleholme TM, Golbus MS, Tarantal AF, Zanjani ED. In-utero transplantation of fetal liver haemopoietic stem cells in monkeys. *Lancet*. 1989; 2: 1425-1427.
- Hashikura Y, Makuuchi M, Kawasaki S, Matsunami H, Ikegami T, Nakazawa Y, Kiyosawa K, Ichida T. Successful living-related partial liver transplantation to an adult patient. *Lancet*. 1994; 343: 1233-4.
- Hayashi S, Abdulmalik O, Peranteau WH, Ashizuka S, Campagnoli C, Chen Q, Horiuchi K, Asakura T, Flake AW. Mixed chimerism following in utero hematopoietic stem cell transplantation in murine models of hemoglobinopathy. *Exp Hematol*. 2003; 31: 176-184.
- Hayashi S, Peranteau WH, Shaaban AF, Flake AW. Complete allogeneic hematopoietic chimerism achieved by a combined strategy of in utero hematopoietic stem cell transplantation and postnatal donor lymphocyte infusion. *Blood*. 2002; 100: 804-812.
- Hecker JM, Lorenz R, Appiah R, Vangerow B, Loss M, Kunz R, Schmidtko J, Mengel M, Klempnauer J, Piepenbrock S, Dickneite G, Neidhardt H, Rückoldt H, Winkler M. C1-inhibitor for prophylaxis of xenograft rejection after pig to cynomolgus monkey kidney transplantation. *Transplantation* 2002; 73: 688–94
- Heffron TG, Langnas AN, Fox IJ, Mack D, Dhawan A, Kaufman S, Antonsen D, Pillen T, Sudan D, Jerius J, Vanderhoof J, Donovan JP, Shaw B Jr. Living related donor liver transplantation at the University of Nebraska Medical Center. *Transplant Proc* 1996; 28: 2382.

- Horner BM, et al. Predictors of organ allograft tolerance following hematopoietic cell transplantation. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006; 6: 2894–2902.
- Huang CA, Fuchimoto Y, Scheier-Dolberg R, Murphy MC, Neville DM Jr, Sachs DH. Stable mixed chimerism and tolerance using a nonmyeloablative preparative regimen in a large-animal model. *The Journal of clinical investigation*. 2000; 105: 173–181.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1981; 29: 577-580.
- Ildstad ST, Sachs DH. Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature*. 1984; 307: 168–170.
- Jaboulay M. Kidney grafts in the antecubital fossa by arterial and venous anastomosis. *Lyon Med*. 1906; 107: 575-92.
- Johansson S, Dencker L, Dantzer V. Immunohistochemical localization of retinoid binding proteins at the materno-fetal interface of the porcine epitheliochorial placenta. *Biol Reprod*. 2001; 64, 60–68.
- Johnson RK. Inbreeding effects on reproduction, growth and carcass traits. In: L.D. Young (Editor), *Genetics of Swine*. Publ. NC-103. University of Nebraska, Lincoln, NB. 1990.
- Jurim O, Shackleton CR, McDiarmid SV, Martin P, Shaked A, Millis JM, Imagawa DK, Olthoff KM, Maxfield A, Pakrasi AL. Living-donor liver transplantation at UCLA. *Am J Surg* 1995; 169: 529-32.
- Kalscheuer H, Onoe T, Dahmani A, Li HW, Hölzl M, Yamada K, Sykes M. Xenograft tolerance and immune function of human T cells developing in pig thymus xenografts. *J Immunol*. 2014; 192: 3442-50.
- Klymiuk N, Muller M, Brem G, Aigner B. Characterization of porcine endogenous retrovirus gamma pro-pol nucleotide sequences. *J Virol*. 2002; 76: 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.
- Kolber-Simonds D, Lal L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen 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; 101: 7335-40.
- Korsgren O, Buhler LH, Groth CG. Toward clinical trials of islet xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2003; 10: 289-92.
- Kroshus TJ, Bolman RM III, Dalmaso 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; 61: 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; 10: 562-8.
- 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, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DK. Heart transplantation in baboons using alpha1, 3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med*. 2005; 11: 29-31.
- Lee LA, Gritsch HA, Sergio JJ, Arn JS, Glaser RM, Sablinski T, Sachs DH, Sykes M. Specific tolerance across a discordant xenogeneic transplantation barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91: 10864–10867.
- Lee PW, Cina RA, Randolph MA, Goodrich J, Rowland H, Arellano R, Kim HB, Sachs DH, Huang CA. Stable multilineage chimerism across full MHC barriers without graft-versus-host disease following in utero bone marrow transplantation in pigs. *Exp Hematol*. 2005; 33: 371-379.
- Lee WM, Squires RH Jr, Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. Acute liver failure: summary of a workshop. *Hepatology*. 2008; 47: 1401–1415.

- Leiser R, Dantzer V. Structural and functional aspects of porcine placental microvasculature. *Anat. Embryol.* 1988; 177, 409–419.
- Leventhal J, Miller J, Abecassis M, Tollerud DJ, Ildstad ST. Evolving approaches of hematopoietic stem cell-based therapies to induce tolerance to organ transplants: the long road to tolerance. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2013; 93: 36–45.
- Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, Platt JL, Manivel CJ, Bolman RM, Matas AJ. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation* 1993; 55: 857–65.
- 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-Gal α 1-3Gal antibodies in acute vascular rejection and accommodation of xenografts. *Transplantation.* 2000; 70: 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; 101: 1745-56.
- López-Navidad A, Kulisevsky J, Caballero F. Historia de la actitud y conducta en la obtención y extracción de órganos y tejidos para trasplantes. En: *El donante de órganos y tejidos. Evaluación y manejo.* Springer-Verlag Ibérica. Barcelona 1997.
- Loubière L S, Lambert N C, Flinn L J, Erickson TD, Yan Z, Guthrie K A, Vickers K T, Nelson JL. Maternal microchimerism in healthy adults in lymphocytes, monocyte/macrophages and NK cells. *Lab. Invest.* 2006; 86, 1185–1192.
- Magre S, Takeuchi Y, Bartosch B. Xenotransplantation and pig endogenous retroviruses. *Rev Med Virol.* 2003; 13: 311-29.
- Makowka L, Wu GD, Hoffman A, Podesta L, Sher L, Tusso PJ, Breda M, Chapman FA, Cosenza C, Yasunaga C. Immunohistopathologic lesions associated with the rejection of a pig to human liver xenograft. *Transplant Proc.* 1994; 26: 1074.
- Malago M, Rogiers X, Broelsch CE. Liver splitting and living donor techniques. *Brit Med Bull* 1997; 53: 860-7.
- 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 ; 32 : 888-9.
- Marion P. Les transplantations cardiaques et les transplantations hepaticues. *Lyon Med.* 1969; 222: 585.
- 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; 15: 361-8.
- Martínez-Alarcón L, Ramis G, Majado MJ, Quereda JJ, Herrero-Medrano JM, Ríos A, Ramírez P, Muñoz A. ABO and RH1 blood group phenotyping in pigs (*Sus scrofa*) using microtyping cards. *Transp Proc.* 2010; 42: 2146-2148
- Martínez-Alarcón L, Ríos A, Pons JA, González MJ, Ramis G, Ramírez P, Parrilla P. Attitudinal study of organ xenotransplantation in patients on the kidney and liver transplant waiting list in a country with a high rate of deceased donation. *Xenotransplantation.* 2011; 18: 168-75.
- Mathes DW, Yamada K, Randolph MA, Utsugi R, Solari MG, Gazelle GS, Wu A, Sachs DH, Lee WP. In utero induction of transplantation tolerance. *Transplant Proc.* 2001; 33:98.
- Mazurek U, Kimsa MC, Strzalka-Mrozik B, Kimsa MW, Adamska J, Lipinski D, Zeyland J, Szalata M, Slomski R, Jura J, Smorag Z, Nowak R, Gola J. Quantitative analysis of porcine endogenous retroviruses in different organs of transgenic pigs generated for xenotransplantation. *Curr Microbiol.* 2013; 67(4):505-14.
- McConico A, Butters K, Lien K, Knudsen B, Wu X, Platt JL, Ogle BM. et al: In utero cell transfer between porcine littermates. *Reprod Fertil Dev.* 2011; 23: 297-302.
- 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; 1: 423-7.
- 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; 130: 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; 64: 708-17.

- McKane W, Lee J, Preston R, Hacking A, Simpson P, Lynds S, Goldberg L, Cairns T, Taube D. Polymorphism in the human anti-pig natural antibody repertoire: implications for antigen-specific immunoadsorption. *Transplantation*. 1998; 66: 626-33.
- ONT. Memoria de Donación 2014. www.Msc.es/ont/esp/home.htm. Accedido el día 15 de julio de 2015.
- Metes D, Logar A, Rudert WA, Zeevi A, Woodward J, Demetris AJ, Abu-Elmagd K, Eghtesad B, Shapiro R, Fung JJ, Trucco M, Starzl TE, Murase N. Four-Color Flow Cytometric Analysis of Peripheral Blood Donor Cell Chimerism. *Hum Immunol*. 2003; 64: 787–795.
- Mikkola HK, Gekas C, Orkin SH, Dieterlen-Lievre F. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Exp Hematol*. 2005; 33: 1048-1054.
- Muñoz A, Ramis G, Pallarés FJ, Martínez JS, Oliva JE, Martínez M, Munitiz V, Yélamos J, Ramirez P, Parrilla P. Surgical procedure for specific pathogen free piglet production by modified terminal hysterectomy. *Transplant Proc*. 1999; 31: 2627-28
- Murase N, Demetris AJ, Woo J, Tanabe M, Furuya T, Todo S, Starzl TE. Graft-versus-host disease after brown Norway-to-Lewis and Lewis-to-Brown Norway rat intestinal transplantation under FK506. *Transplantation*. 1993; 55:1.
- Nash K, Chang Q, Watts A, Treter S, Oravec G, Ferrara V, Buhler L, Basker M, Gojo S, Sachs DH, White-Scharf M, Down JD, Cooper DK. Peripheral blood progenitor cell mobilization and leukapheresis in pigs. *Lab Anim Sci*. 1999; 49: 645–649.
- Neuhof H. The transplantation of tissues. Appleton, New York, 1923.
- Nikolic B, Gardner JP, Scadden DT, Arn JS, Sachs DH, Sykes M. Normal development in porcine thymus grafts and specific tolerance of human T cells to porcine donor MHC. *J Immunol*. 1999; 162: 3402–3407.
- Nitsche A, Becker M, Junghahn I, Aumann J, Landt O, Fichtner I, Wittig B, Siegert W. Quantification of human cells in NOD/SCID mice by duplex real-time polymerase chain reaction. *Haematologica*. 2001;
- Ogle BM, Butters KA, Plummer TB, Ring KR, Knudsen BE, Litzow MR, Cascalho M, Platt JL. Spontaneous fusion of cells between species yields transdifferentiation and retroviral transfer in vivo. *Faseb J*. 2004; 18: 548–550

- Ohdan, H., Yang, Y. G., Swenson, K. G., Kitamura, H. & Sykes, M. T cell and B cell tolerance to GAL α 1,3GAL expressing heart xenografts is achieved in α 1,3-galactosyl transferase-deficient mice by nonmyeloablative induction of mixed chimerism. *Transplantation*. 2001; 71, 1532–1542.
- Otte JB, de Ville de Goyet J, Reding R, Sokal E, Lerut J, Vanormelingen P, Janssen M. Living related donor liver transplantation in children: The Brussels Experience. *Transplant Proc* 1996; 28: 2378-9.
- Owen RD. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* 1945; 102: 400
- 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; 1: 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; 285: 1236-41.
- Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 1997; 3: 282.
- Pearce R, Kiehm D, Armstrong D, et al. Induction of hematopoietic chimerism in the caprine fetus by intraperitoneal injection of fetal liver cells. *Experientia*. 1989; 45: 307-308.
- Picus J, Aldrich WR, Letvin NL. A naturally occurring bonemarrow- chimeric primate. I. Integrity of its immune system. *Transplantation*. 1985; 39: 297-303.
- Picus J, Holley K, Aldrich WR, Griffin JD, Letvin NL. A naturally occurring bone marrow-chimeric primate. II. Environment dictates restriction on cytolytic T lymphocyte-target cell interactions. *J Exp Med*. 1985; 162: 2035-2052
- Platt JL. New directions for organ transplantation. *Nature*. 1998; 392: 11-7.
- Platt JL. Xenotransplantation: recent progress and current perspectives. *Curr Opin Immunol*. 1996; 8: 721-728.
- 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; 407: 86-90.

- Powelson J, Cosimi AB, Asuten W Jr, Bailen M, Colvin R, Gianello P, Sablinski T, Lorf T, Kawai T, Tanaka M. Porcine to primate orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc.* 1994; 26: 1353-4.
- Quereda JJ, Martínez-Alarcón L, Mendonça L, Majado MJ, Herrero-Medrano JM, Pallares FJ, Ríos A, Ramírez P, Muñoz A, Ramis G. Validation of xCELLigence Real Time Cell Anañyzer to assess compatibility in xenotransplantation with pig-to-baboon model. *Transplant Proc.* 2010; 42: 3239-3243.
- Quereda JJ, Herrero-Medrano JM, Abellaneda JM, García-Nicolás O, Martínez-Alarcón L, Pallarés FJ, Ramírez P, Muñoz A, Ramis G. Porcine endogenous retrovirus copy number indifferent pig breeds is not related to genetic diversity. *Zoonoses Public Health* 2012; 59: 401-7.
- Qian H, Wang J, Wang S, Gong Z, Chen M, Ren Z, Huang S. In utero transplantation of human hematopoietic stem/progenitor cells partially repairs injured liver in mice. *Int J Mol Med.* 2006; 18(4):633-42.
- Ramírez P, Chavez R, Majado M, Munitiz V, Hernandez Q, Loba M, et al. Study of xenograf rejection in a model of liver xenotransplantation from unmodified pig to primate. *Transplant Proc.* 1999; 31: 2814-7
- Ramirez P, Chavez R, Majado M, Munitiz V, Muñoz A, Hernandez Q, Palenciano CG, Pino-Chavez G, Loba M, Minguela A, Yelamos J, Gago MR, Vizcaino AS, Asensi H, Cayuela MG, Segura B, Marin F, Rubio A, Fuente T, Robles R, Bueno FS, Sansano T, Acosta F, Rodriguez JM, Navarro F, Cabezuelo J, Cozzi E, White DJ, Calne RY, Parrilla P. Life-supporting human complement regulator decay acceleratin factor transgenic pig liver xenograf maintains the metabolic function and coagulation in the nonhuman primate for up to 8 days. *Transplantation.* 2000; 70: 989-98.
- Ramírez P, Montoya MJ, Ríos A, García Palenciano C, Majado M, Chávez R, Muñoz A, Fernández OM, Sánchez A, Segura B, Sansano T, Acosta F, Robles R, Sánchez F, Fuente T, Cascales P, González F, Ruiz D, Martínez L, Pons JA, Rodríguez JI, Yélamos 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; 3: 4103-6.
- Ramirez P, Muñoz A, Martínez-Alarcón L, Ramis G, Parrilla P. Xenotrasplante hepático: estado actual y prespectivas de futuro. *Med Clin Monogr (Barc.).* 2013; 14: 12-16

- Ramis G, Martínez-Alarcón L, Majado MJ, Quereda JJ, Mendonça L, Herrero-Medrano JM, Abellaneda JM, Lopes K, López-Navas A, Ríos A, Ramírez P, Muñoz A. Donor-Graft Compatibility Tests in Pig-to-Primate Xenotransplantation Model: Serum Versus Plasma in Real-Time Cell Analyzer Trials. *Transplant Proc.* 2011; 43: 259-243
- Ramis G, Martínez-Alarcón L, Quereda JJ, Mendonça L, Majado MJ, Gomez-Coelho K, Herrero-Medrano JM, Abellaneda JM, Pallares FJ, Ríos A, Mrowiec A, Ramírez P, Muñoz A. Optimization of Real Time Impedance Cell Analysis for cytotoxicity assays. *Bio Microd.* 2013; 15: 985-95
- Reemtsma K, McCracken BH, Schiegel JV, Pearl M: Heterotransplantation of the kidney: two clinical experiences. *Science.* 1964; 143: 700-702.
- 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; 73: 881-9.
- Ríos A, Ramírez P, Martínez L, Jarvis N, Sánchez J, Rodríguez MM, Alcaraz J, Montoya MJ, Parrilla P. British citizens in a regional community of south-eastern Spain with a pre-clinical organ xenotransplantation program. A study of attitude toward xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2007; 14: 255-64.
- Robson SC, Cooper DKC, d'Apice AJF. Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2000; 7: 166–176.
- Rodríguez-Gago M, De Heredia A, Ramírez P, Parrilla P, Aparicio P, Yélamos J. Human anti-porcine gammadelta T cells xenoreactivity is inhibited by human Fas L expression on porcine endothelial cells. *Transplantation.* 2001; 72: 503-9.
- Rosengard AM, Cary NR, Langford GA, Tucker AW, Wallwork J, White DJ. Tissue expression of human complement inhibitor, decay-accelerating factor, in transgenic pigs. *Transplantation.* 1995; 59: 1325-1333.
- Ross DN. Experience with human heart transplantation. Shapiro, H., eds. Butterworths, Durban, p227, 1969.
- Rothschild MF. Genetics and reproduction in the pig. *Anim Repro Sci.* 1996; 42: 143-151.

- Rubin JP, Cober SR, Butler PE, Randolph MA, Gazelle GS, Ierino FL, Sachs DH, Lee WP. Injection of allogeneic bone marrow cells into the portal vein of swine in utero. *J Surg Res.* 2001; 95: 188-94
- Sachs DH, Sablinski T. Tolerance across discordant xenogenic barriers. *Xenotransplantation* 1995; 2: 234-9
- Sachs DH. The pig as a potential xenograft. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 43: 187-193.
- Sachs DH, Sykes M, Kawai T, Cosimi AB. Immuno-intervention for the induction of transplantation tolerance through mixed chimerism. *Seminars in immunology.* 2011; 23: 165–173.
- Sah JÁ, Navarro-Alvarez N, DeFazio M, Rosales IA, Elias N, Yeh H, Colvin RB, Cosimi AB, Markmann JF, Hertl M, Sachs DH, Vagefi PA. A bridge to somewhere: 25-day survival after pig-to-baboon liver xenotransplantation. 2016; *Ann. Surg.* 283: 1069-1071.
- Samstein B, Platt JL. Physiologic immunologic hurdles to xenotransplantation. *Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 182-93.
- Sánchez A, Ramírez 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; 35: 2041-2.
- Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, Benike C, Millan MT, Shizuru JA, Hoppe RT, Lowsky R, Engleman EG, Strober S. Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2008; 358: 362–368.
- Schlitt HJ, Hundrieser J, Hisanaga M, Uthoff K, Karck M, Wahlers T, Wonigeit K, Pichlmayr R. Patterns of donor-type microchimerism after heart transplantation. *Lancet.* 1994; 343:1469.
- Schmelzle M, Schulte Esch J 2nd, Robson SC. Coagulation, platelet activation and thrombosis in xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; 15: 212-8.
- 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; 65: 1570-7.

- Schuurman HJ, Cheng J, Lam T. Pathology of xenograft rejection: a commentary. *Xenotransplantation*. 2003; 10: 293.
- Shah JA, Navarro-Álvarez N, DeFazio M, Rosales IA, Elias N, Yeh H, Colvin RB, Cosimi AB, Markmann JF, Hedrtzl M, Sachs DH, Vagefi PA. a bridge to somewhere: 25-day survival after pig-to-baboon liver xenotransplantation. *Annals of Surgery*. 2016; doi: 10.1097/SLA.0000000000001659
- Shaaban AF, Kim HB, Milner R, Flake AW. A kinetic model for the homing and migration of prenatally transplanted marrow. *Blood*. 1999; 94: 3251-3257.
- Sharabi Y, Abraham VS, Sykes M, Sachs DH. Mixed allogeneic chimeras prepared by a nonmyeloablative regimen: requirement for chimerism to maintain tolerance. *Bone Marrow Transplant*. 1992; 9: 191–197.
- Sharabi Y, Aksentijevich I, Sundt TMD, Sachs DH, Sykes M. Specific tolerance induction across a xenogeneic barrier: production of mixed rat/mouse lymphohematopoietic chimeras using a nonlethal preparative regimen. *J Exp Med*. 1990; 172: 195–202.
- Shields LE, Bryant EM, Easterling TR, Andrews RG. Fetal liver cell transplantation for the creation of lymphohematopoietic chimerism in fetal baboons. *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 173: 1157-1160.
- 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; 16: 2732-45.
- Shimizu A, Hisashi Y, Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Houser SL, Robson SC, Schuurman HJ, Cooper DK, Sachs DH, Yamada K, Colvin RB. Thrombotic microangiopathy associated with humoral rejection of cardiac xenografts from alpha1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs in baboons. *Am J Pathol* 2008; 172: 1471–81.
- 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; 65: 346-53.
- Singer PA, Siegler M, Whittington PF, Lantos JD, Emond JC, Thistlethwaite JR, Broelsch CE. Ehtics of liver transplantation with living donors. *N Engl J Med*. 1989; 321: 620-1

- Song P, Xie Z, Guo L, Wang C, Xie W, Wu Y. Human genome specific real time PCR method for sensitive detection and reproducible quantitation of human cells in mice. *Stem Cell Rev Rep*. 2012; 8: 1155-1162.
- Slavin S, Reitz B, Bieber CP, Kaplan HS, Strober S. Transplantation tolerance in adult rats using total lymphoid irradiation: permanent survival of skin, heart, and marrow allografts. *J Exper Med*. 1978; 147: 700–707.
- Starzl TE, Tzakis A, Fung JJ, Todo S, Demetris AJ, Marino IR, Doyle H, Zeevi A, Warty V, Michaels M, Kusne S, Rudert WA, Trucco M. Human liver transplantation. *Xenotransplantation*. 1993; 1: 4.
- 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; 26: 1082-8.
- Starzl, TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet*. 1992; 339: 1579.
- Straw BE, Dewey CE, Wilson MR. Differential Diagnosis of disease. En: *Diseases of Swine*. 9ª Ed. Straw BE, Zimmerman JJ, D’Allaire S, Taylor DJ Eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, EE.UU. 2009
- Strong RW, Lynch SV, Ong TH, Matsunami H, Koido Y, Balderson GA. Successful liver transplantation from a living donor to her son. *N Engl J Med* 1990; 322: 1505-7.
- Sunami R, Komuro M, Yuminamochi T, Hoshi K, Hirata S. Fetal cell microchimerism develops through the migration of fetus-derived cells to the maternal organs early after implantation. *J Reprod Immunol*. 2010; 84:117.
- Sykes M, Sharabi Y, Sachs DH. Achieving alloengraftment without graft-versus-host disease: approaches using mixed allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1988; 3: 379–386.
- Sykes M. Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity*. 2001; 14: 417–424.
- Tanemura M, Maruyama S, Galili U. Differential expression of alpha-GAL epitopes (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) on pig and mouse organs. *Transplantation*. 2000; 69: 187-90.
- 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; 2: 35-41.

- Tomita Y, Khan A, Sykes M. Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen. *J Immunol.* 1994; 153: 1087–1098
- Tseng YL, Kuwaki K, Dor FJ, Shimizu A, Houser S, Hisashi Y, et al. alpha1,3-Galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation.* 2005; 80: 1493–1500.
- Unger L. Transplantation des vaisseaux et des organes. *B Fur Chir.* 1908 ;46: 1367.
- 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; 407: 90-4.
- Van Dijk B, BommsmaD, de Man A. Blood group chimerism in human multiple births is not rare. *Am J Med Genet.* 1996; 61: 264-268.
- Walker JA, Kilroy GE, Xing J, Shewale J, Sinha SK, Batzer MA. Human DNA quantitation using Alu element-based polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 2003; 315:122
- 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; 32: 860.
- White DJ, Yannoutsos N. Production of pigs transgenic for human DAF to overcome complement-mediated hyperacute xenograft rejection in man. *Res Immunol.* 1996; 147: 88-94.
- White DJ, Yannoutsos N. Production of pigs transgenic for human DAF to overcome complement-mediated hyperacute xenograft rejection in man. *Res Immunol.* 1996; 147: 88-94
- 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 1-4betaGlc-X immunoaffinity column. *Transplantation.* 1998; 65: 172-9.
- Yamada, K., Shimizu, A., Utsugi, R. et al, Thymic transplantation in miniature swine. II. Induction of tolerance by transplantation of composite thymokidneys to thymectomized recipients. *J Immunol.* 2000; 164: 3079–3086.

- Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, Iwanaga T, Hisashi Y, Nuhn M, O'malley P, Nobori S, Vagefl 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; 11: 32-4.
- Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 519-31.
- Yang YG, de Goma E, Ohdan H, Bracy JL, Xu Y, Iacomini J, Thall AD, Sykes M. Tolerization of anti-Gal α 1-3Gal natural antibody-forming B cells by induction of mixed chimerism. *J Exp Med* 1998; 187: 1335-1342.
- Young AJ, Holzgreve W, Dudler L, Schoeberlein A, Surbek DV. Engraftment of human cord blood-derived stem cells in preimmune ovine fetuses after ultrasound-guided in utero transplantation. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 3: 189.
- 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: 1584-90.
- Zanjani ED, Ascensao JL, Flake AW, Harrison MR, Tavassoli M. The fetus as an optimal donor and recipient of hemopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 1992; 10: 107-114.
- Zanjani ED, Flake AW, Rice H, Hedrick M, Tavassoli M. Long-term repopulating ability of xenogeneic transplanted human fetal liver hematopoietic stem cells in sheep. *J Clin Invest.* 1994; 93: 1051-1055.
- Zhao Y, Swenson K, Sergio JJ, Arn JS, Sachs DH, Sykes M. Skin graft tolerance across a discordant xenogeneic barrier. *Nature Medicine.* 1996; 2: 1211-1216.