

1.INTRODUCCIÓ

La idea d'utilitzar òrgans d'animals per substituir-ne de danyats irreversiblement per alguna patologia va sorgir ja fa un segle. De fet la història del trasplantament clínic va començar amb trasplantaments d'òrgans d'origen animal. Els primers trasplantaments en humans van ser trasplantaments renals amb simis i ovelles com a donants aprofitant la tècnica de la sutura d'anastomosi vascular descrita per Alexis Carrel el 1902, que havia posat a punt realitzant trasplantaments renals entre gossos. Va ser el cirurgià Jaboulay qui va realitzar el primer xenotrasplantament renal heterotòpic utilitzant un ronyó de porc que va tenir una supervivència de tres dies. A aquest intent el van seguir d'altres que van resultar un fracàs total. A finals dels anys quaranta els estudis de Sir Peter Medawar¹ sobre els principis immunològics del rebuig i la tolerància van portar l'èxit en els primers trasplantaments autòlegs. No obstant als anys 60, mentre l'al·lotrasplantament estava a la seva infància i el concepte de mort cerebral no estava àmpliament acceptat es van dur a terme, als Estats Units, diversos xenotrasplantaments en humans on els donants eren ximpanzés i babuins. Encara que cap d'aquests intents s'arribés a llargues supervivències del pacient, Remtsma et al.² al 1964 van realitzar una sèrie de 12 trasplantaments renals en la qual van aconseguir supervivències de fins a 9 mesos utilitzant la immunosupressió disponible en aquell moment, azatioprina i corticoides. Els primers xenotrasplantaments hepàtics van realitzar-los Gilnes i Starzl^{3,4,5} a la mateixa època que Roy Calne⁶ va realitzar-ne de porc a babuí. Cap d'aquests

intents van tenir supervivències llargues. A aquesta època en que es van realitzar la majoria dels xenotrasplantaments en humans li va seguir una altra, la dels anys 70 i 80, en que la recerca en aquest camp va reduir-se conseqüència de la consolidació de l'al·lotrasplantament com a modalitat terapèutica gràcies al desenvolupament de les solucions de preservació i l'aparició d'un nou immunosupressor: la ciclosporina.

Als anys 90 l'interès de la comunitat científica pel camp del xenotrasplantament va revifar-se amb la idea de poder escurçar les llargues llistes d'espera, es va reflectir en els dos xenotrasplantaments hepàtics que es van realitzar a Pittsburgh a mans dels cirurgians A. Tzakis, S. Todo i T. Starzl^{7,8}.

És evident que existeix un desequilibri entre la necessitat d'òrgans i la seva disponibilitat. Només l'1 o 2% de les persones que moren en un hospital ho fan de mort cerebral, i d'aquestes menys d'un 50% en són donants idonis. Aquest motiu juntament amb els bons resultats obtinguts, una millor detecció de malalties i el rebuig crònic d'empelts anteriors causen l'augment de la llargada de les llistes d'espera en la totalitat dels països on s'utilitza el trasplantament d'òrgans com a terapèutica.

El xenotrasplantament ens podria aportar els següents avantatges respecte l'al·lotrasplantament:

- Font inexhaurible d'òrgans assequibles a pacients que actualment estan exclosos de les llistes d'espera.
- Estendre les possibilitats terapèutiques del trasplantament.
- L'oportunitat de la manipulació genètica dels òrgans donants per tal de modificar les respostes de rebuig dels receptors.
- La realització de pretractaments específics tant en els donants com en els receptors
- Operacions programades.
- Diferències de les espècies en la susceptibilitat a malalties pot ser útil per trasplantaments en grups específics (ex: pacients HIV+ o hepatitis B+). Evitar la recurrència de la malaltia a l'empelt ja que hi ha patologies espècie-específiques, per exemple la hepatitis B i el virus de la immunodeficiència adquirida.

També implicaria problemàtiques com:

- Problemes ètics.
- Transmissió de patògens del donant al receptor.
- L'aparició de soques virals emergents de les que es desconeix la patogènia.
- La transmissió de patologies humanes a l'empelt.

- Incompatibilitats fisiològiques, incloent les possibles diferències del procés d'envelliment de l'hoste i de l'empelt.
- Processos immunològics: el rebuig vascular i el cel·lular.

Intuïtivament, quan es pensa en quina hauria de ser l'espècie utilitzada com a donant en el xenotrasplantament ens ve al cap alguna propera filogenèticament a l'ésser humà, alguna espècie de primats: ximpanzés o babuïns entre altres. El cert és que hi ha diverses raons fonamentades per explicar que els primats no són adequats com a donants d'òrgans. En primer lloc, alguns són espècies en perill d'extinció i que no es reproduïen quan es troben en captivitat a més a més de que tenen períodes de gestació llargs i d'una sola cria. En segon lloc, el risc de la transmissió de malalties infeccioses és més gran que entre altres espècies per la seva proximitat filogenètica, per exemple l'HIV. I en tercer lloc els problemes ètics que suposa la utilització d'animals socials i tant intel·ligents com donants d'òrgans. Així doncs es va haver de buscar una alternativa als primats com a donants d'òrgans. Havia de ser una espècie amb unes característiques físico-patològiques compatibles amb les de l'home, fàcilment reproduïble i amb la possibilitat d'aconseguir-ne de gnotobíotes (lliures de patògens per l'home). Tot i que es difícil de dir qui va ser el primer en proposar-ho els estudis s'han centrat en estudiar el porc com a font d'òrgans. Sembla que es va començar a considerar ja fa més de 40 anys quan R. Calne el 1970⁶ va definir les dues modalitats de xenotrasplantament, el concordant i el discordant. Tenen característiques reproductores ideals, arriben a la maduresa sexual als 9 mesos, tenen gestacions de 3,5 mesos i parts de 6 a 16 garrins. Els porcs estan molt més acceptats èticament que els primats com a donants d'òrgans ja que no tenen qualitats tant semblants a les dels humans i milers de porcs viuen captius a tot el món amb finalitats alimentàries i per vestir. En relació a la transmissió de malalties, tot i que manquen més estudis i que *in vitro* cèl·lules humanes poden ser infectades per retrovirus porcins, no sembla que sigui un fet habitual⁹. Tot i que encara manquen més estudis sobre les conseqüències dels retrovirus porcins, PERV (Porcine Endogenous RetroViruses), semblen molt més segurs els porcs que els primats en aquest aspecte. S'ha observat una similitud entre porc i home en aspectes com la fisiologia digestiva, els hàbits alimentaris, l'estructura i la funció renal, la temperatura corporal, l'estructura del llit vascular pulmonar, l'anatomia i fisiologia cardiovasculars, la distribució de les artèries coronàries i els índex respiratoris^{10,11}.

Tot i els avantatges que el porc ofereix com a possible donant existeixen obstacles importants a superar, aquests són els aspectes immunològics i els no immunològics com les possibles incompatibilitats metabòliques.

1.1 ASPECTES IMMUNOLÒGICS.

1.1.1 Immunologia del rebuig xenogènic.

Els principals factors implicats en els diferents tipus de rebuig són:

- Els xenoanticossos i xenoantígens
- El sistema de complement
- Les cèl·lules endotelials

Els xenoanticossos, xenoantígens i complement són elements propis del sistema immunològic, en canvi les cèl·lules endotelials tot i que no s'inclouen habitualment dins d'aquest sistema tenen un paper fonamental en els diferents tipus de rebuig.

1.1.1.1 Els xenoanticossos i xenoantígens.

1.1.1.1a Xenoanticossos o anticossos naturals.

Definició: immunoglobulines circulants del tipus IgG, IgA i IgM, presents en tots els mamífers, que reaccionen amb antígens localitzats en cèl·lules i teixits d'espècies animals diferents a la pròpia sense la necessitat de ser exposats prèviament, sensibilització. El motiu pel que aquestes espècies tenen anticossos que reconeixen antígens diferents és desconeguda. Tanmateix és coneguda la seva existència en diferents situacions clíniques des de fa temps. Ja en el 1924 Hanganutzi va informar de la presència d'anticossos capaços d'agregar eritròcits d'ovella en pacients que rebien injeccions terapèutiques d'antisèrum equí. En el camp del trasplantament Sir Roy Calne el 1970⁶ va descriure en el seu treball que "alguns constituents" de la sang reaccionaven de forma immediata i violenta amb l'empelt. Ell va apreciar que els receptors d'empelts d'espècies discordants presentaven un rebuig amb característiques

similars dels receptors d'alloempelts prèviament sensibilitzats. Aquests constituents que Calne feia referència eren els anticossos naturals preformats o xenoanticossos.

Existeix controvèrsia entre quin és l'isotip que intervé en el rebuig hiperagut. La confusió de quin tipus de xenoanticossos participa en aquest tipus de rebuig sembla que ha estat conseqüència de la varietat de tècniques utilitzades per a la seva detecció. Platt et al.¹² proposen com a mètode més lògic per a la determinació de xenoanticossos reactius el cultiu de cèl·lules endotelials porcines a les que s'enganxen els xenoanticossos específics i que es poden determinar, posteriorment, pel mètode d'ELISA. Amb aquest mètode es detecten tant IgM com IgG. Però mentre les IgM són presents a tots els individus estudiats les IgG només ho són en dues tercers parts dels individus. Moltes de les evidències recollides en els últims anys indiquen que són les IgM les responsables de l'activació del rebuig hiperagut:

- Es troben IgM de forma invariable en xenoempelts rebutjats de porc a primat mentre que les IgG sovint són absents, i quan es troben, acostumen a dipositar-se en una fase més tardana^{13,14}.
- Existeix una correlació entre els dipòsits d'anticossos naturals IgM i els dipòsits de complement (C3). En canvi, aquesta correlació no s'observa per les IgG xenoreactives¹⁵.
- Quan s'eliminen les IgM per depleció també s'aconsegueix prevenir l'activació del sistema del complement¹⁶.
- La infusió de IgG humanes purificades a primats receptors d'un òrgan de porc no acceleren el rebuig hiperagut, i el que és més sorprenent, semblen protegir el xenoempelt de patir un rebuig hiperagut.

Els xenoanticossos IgM constitueixen 0,1% de les IgM circulants¹⁷, són polireactives i sintetitzades per cèl·lules B CD5⁺¹⁸. Aquests xenoanticossos amb una afinitat relativament baixa, de l'ordre de 10^{-4} ¹⁹, presenten, en canvi, una gran avidesa (força amb la que s'uneixen els antígens i els anticossos).

1.1.1.1.b Xenoantígens.

En estudis realitzats amb teixits porcins es van establir els possibles antígens dels xenoanticossos:

1. α -Gal1-3 β Gal1-4 β GlcNac-R (trisacàrid lineal B).
2. α -NeuAc2-3 β Gal1-4 β GlcNac-R (sialil-n-acetil-lactosamina)
3. β -Gal1-4 β GlcNac-R (N-acetil-lactosamina)

Donat que les dades recollides fins al moment no mostren evidències que existeixin anticossos contra l'àcid siàlic i la lactosamina i que els teixits humans, incloent l'endoteli vascular, posseeixen ambdós hidrats de carboni, sembla poc probable que cap dels dos últims puguin desenvolupar algun paper en el rebuig que té lloc en el trasplantament porc-humà. Així doncs sembla que el paper central recau sobre el trisacàrid lineal B, concretament sobre la porció hidrocarbonada: α -Gal1-3 β Gal. Altres proves que ho demostren són:

- El tractament de les cèl·lules endotelials amb l'enzim α -galactosidasa, la qual trenca els grups α -gal, elimina la unió dels xenoanticossos IgM humans en un 80%²⁰.
- Cèl·lules COS transfectades amb cDNA de l'enzim α 1-3galactosiltransferasa expressen Gal α 1-3 Gal, i permeten la unió d'anticossos naturals humans i de complement²¹.

L'antígen lineal B es troba en la superfície dels eritròcits, limfòcits, cèl·lules endotelials, plaquetes i cèl·lules del parènquima renal, hepàtic pulmonar i de conductes pancreàtics de tots els mamífers excepte de l'home i dels primats no humans, desafortunadament des del punt de vista del xenotrasplantament. Els xenoanticossos IgM són produïts en aquests animals després de l'exposició a bacteris intestinals que expressen estructures carbohidratades similars, i la seva funció en sèrum és la de defensa contra invasions d'aquests organismes²². En el porc l'antígen α -Gal1-3 β Gal és expressat en nivells alts a tots els llits vasculars²³.

Hi ha un acord total en que el α -Gal és el principal xenoantígen, però sembla que no és l'únic implicat en el rebuig xenogènic hiperagut porc-humà. Recentment Magnusson et al.²⁴ han descrit la implicació d'altres antígens possiblement relacionats en aquest procés. Les molècules que descriuen són: SLA, de l'anglès *swine lymphocyte antigen*, l'antígen del grup sanguini A/O i els antígens Hanganutziu-Deicher (H-D), aquests últims són presents en la majoria de mamífers i són absents en humans.

La informació dels antígens que mitjancien el rebuig en el xenotrasplantament en rosegadors no és massa extensa. Sembla que de la mateixa manera, en porc-primat, els xenoantígens són carbohidrats o glicoproteïnes. Wu et al.²⁵ descriuen diversos carbohidrats com a possibles xenoantígens, destacant-ne el carbohidrat Sialyl-Le com a antígen principal implicat en el rebuig del xenoempelt cardíac en la combinació hámster-rata. Així doncs mentre el Sialyl-Le és l'antigen d'aproximadament el del 80% dels anticossos IgM hi ha un ventall de diversos carbohidrats que interaccionen amb molta menys intensitat amb els anticossos IgM. D'altra banda altres investigadors han descrit un glicoesfingolipid, anomenat antigen de Forssman, com a una de les principals dianes dels xenoanticossos IgM. Aquest antigen es present en el hámster i el presenta la rata. Malgrat tot no sembla ser la principal causa de rebuig en el xenotrasplantament hámster-rata.

Tot i que els carbohidrats centren l'atenció quan és parla de xenoantígens no sembla que siguin els únics implicats en el rebuig en models de rosegadors. Knechtle et al. descriuen que el MHC I juga un paper destacat en el rebuig hiperagut entre diferents soques de rates.

1.1.1.2. El sistema del complement

El sistema del complement és un sistema funcional de proteïnes, prop de 40, que interaccionen les unes amb les altres de forma regulada i participen en moltes de les funcions efectores de la immunitat humoral i de la inflamació. Aquest sistema té una sèrie de propietats que el capaciten per funcionar de manera eficaç en la defensa contra elements estranys sense alterar els teixits normals.

Les principals propietats del sistema del complement són:

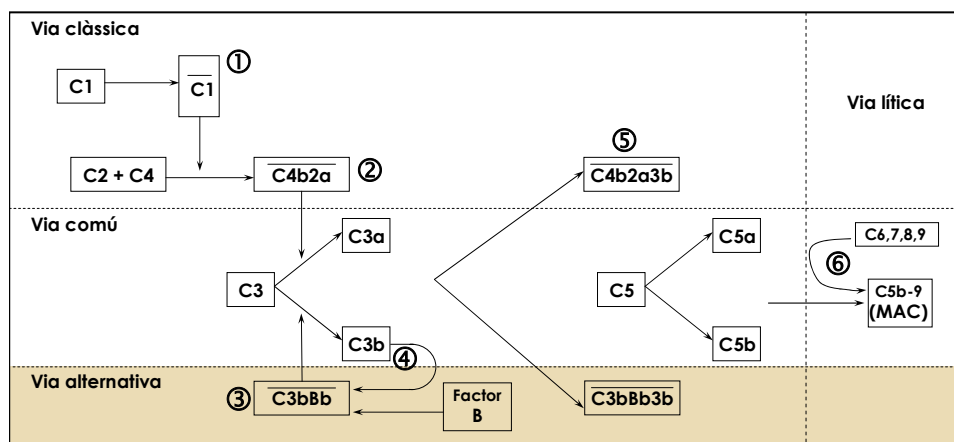
- Activació enzimàtica seqüencial. Al ser una cascada proteolítica indueix a una amplificació molt gran de la resposta, cada enzim activat pot generar múltiples molècules activades per al pas següent.

- Està regulat per proteïnes solubles o associades a les membranes que inhibeixen l'activació del complement en múltiples punts. Es limita o s'atura l'activació després de la resposta a un agent estrany i evita una activació anòmala o constitutiva.
- Les funcions del complement es donen per complexos formats amb components d'aquest sistema que s'uneixen a la superfície cel·lular o bé a immunocomplexes. També es poden donar per fragments solubles de proteïnes del complement que s'uneixen a receptors específics cel·lulars.
- L'activació del sistema del complement és pot donar per interacció amb diferents molècules. Depenent d'aquestes interaccions s'activa la via clàssica o bé la via alternativa del complement. Aquestes dues vies difereixen en la seva activació però comparteixen els últims estadis i les funcions efectores (figura 1).
 - Via clàssica: és el mecanisme efector per a les respostes immunitàries mitjançades per anticossos. S'activa per la unió de C1 a la porció constant (Fc) de l'anticòs, que després d'haver-se unit amb l'antígen ha patit canvis conformacionals deixant accessible el punt d'unió per a la proteïna C1.
 - Via alternativa: S'activa a través de constituents de la superfície cel·lular que són estranys per l'organisme. Per exemple els components de les membranes bacterianes.

L'activació del complement pot produir diverses conseqüències, principalment sobre les cèl·lules endotelials de l'empelt ²⁶:

- pèrdua d'heparan sulfat.
- inducció de quimiotaxis.
- activació de neutròfils.
- estimulació de mastòcits i macròfags.

Figura 1: Esquema del sistema del complement, on veiem els punts d'acció d'alguns dels reguladors humans d'aquest sistema. C1 inh: inhibidor de C1; C4bp, proteïna d'unió a C4; CR1, receptor del complement 1; DAF, factor accelerador del decaïment (CD 55); MAC, complex d'atac de la membrana; MCP, proteïna cofactora de membrana (CD46).



Reguladors de l'activitat del complement		Punts regulació negativa	Efectes de regulació
Unió a la membrana	Proteïnes plasmàtiques		
-	C1 inh	1	Inactivació de C1s i C1r
CR1, MCP, DAF	Factor I, C4bp	2	Dissociació de C4b2a i degradació de C4b
CR1, MCP, DAF	Factor H	3	Increment de la descomposició de C3bBb
CR1, MCP	Factor H, factor I	4	Inhibició de la unió del Factor B, frustrar el loop d'amplificació, trencament de C3b
CR1, DAF	C4bp	5	Dissociació de C4b2a3b
CD59	-	6	Inhibició de la formació del MAC i l'inserció a la membrana

1.1.1.3 Les cèl·lules endotelials.

Fins fa pocs anys es pensava que l'endoteli era una senzilla barrera de cèl·lules. En els últims anys ha crescut l'interès pel seu estudi i s'ha demostrat que posseeixen nombroses components estructurals que estan adaptades als requeriments funcionals de cada part de l'organisme i que són capaces de desenvolupar funcions metabòliques necessàries per aquests sistemes cel·lulars. Donat que l'endoteli es troba per tot l'organisme i realitza funcions específiques es pot considerar un òrgan o un sistema endocrí que es creu que té 1,2 trilions de cèl·lules i un volum comparable al del fetge i una relació superfície/volum molt elevada. Segons Henderson ocupa una superfície d'uns 400m² per un home de 70 Kg¹¹.

Constitueixen un epitel·li pla senzill, d'una sola capa de cèl·lules que és revestit per una capa de teixit connectiu anomenada làmina basal. Poden presentar variacions estructurals depenent de en quin òrgan es trobin. Les unions entre aquestes cèl·lules s'anomena *zonulae occludens*. La integritat d'aquesta capa és fonamental per la realització de les múltiples funcions que duen a terme.

Funcions de les cèl·lules endotelials:

- **Barrera i transport:** regulen l'intercanvi de matèries com l'aigua, els gasos respiratoris, el pas de petites molècules greixoses i altres de més grans hidròfiles o lipòfiles derivades de les proteïnes o lipoproteïnes.
- **Síntesi de substàncies del teixit conjuntiu:** sintetitzen múltiples substàncies de les que en destaquen els components del teixit conjuntiu, com la fibronectina, trombospondina, elastina, microfibrilles i enzims com la elastasa i la colagenasa.
- **Metabolisme lipídic:** presenten receptors de les lipoproteïnes circulants i participen així en processos de distribució de lípids per tot l'organisme.
- **Regulació dels mecanismes de la coagulació:** sintetitzen els factors de la coagulació IXa, VIIa, Xa, von Willebrand, VIII i V. Posseeixen un enzim protrombinasa que afavoreix el pas de protrombina a trombina. Presenten mecanismes anticoagulants com és la síntesi d'heparan-sulfat. Cofactor de l'antitrombina III, que inactiva i evita la formació de trombina. També sintetitzen trombosmodulina, que catalitza l'activació de la proteïna C, que posseeix una acció anticoagulant. Aquesta molècula també bloqueja l'activació de les plaquetes per la trombina. Dues substàncies més sintetitzades per aquestes cèl·lules tenen una acció d'antiagregant plaquetari: la prostaciclina i l'òxid nítric.
- **Regulació de la fibrinolisi:** sintetitzen l'activador tissular del plasminogen i l'activador de la uroquinasa que transformen el plasminogen en plasmina que és realment l'enzim fibrinolític. D'altra banda s'ha descrit la síntesi d'un inhibidor ràpid del plasminogen que afavoreix la trombosi per part de les cèl·lules endotelials.
- **Inflamació i mecanismes de defensa immunològica:** es produeix una interacció entre les cèl·lules endotelials i els leucòcits polimorfonuclears fonamental en la reacció inflamatòria. Participen en la reacció immunitària ja que s'han identificat antígens HLA en la superfície de les cèl·lules endotelials i s'ha comprovat que estimulen la producció, pels limfòcits T, d'interleucina -2 (IL-2).

- ♦ Infiltració leucocitària.
- ♦ Síntesi de molècules d'adhesió: selectines, integrines, cadherines, proteoglicans i mucines.
- **Síntesi de factors de creixement**
- **Síntesi de substàncies vasoactives:**
 - ♦ Vasoconstrictores: a la superfície de les cèl·lules endotelials hi ha un enzim que converteix l'angiotensina I en angiotensina II, que és un potent vasoconstrictor. Aquest mateix enzim inhibeix la bradicina que és un potent vasodilatador. Més recentment s'ha descrit la presència a la superfície de les cèl·lules endotelials de la endotelina, molècula vasoconstrictora.
 - ♦ Vasodilatadores: la prostaciclina i l'òxid nítric són les dues molècules amb acció vasodilatadora que es troben a les cèl·lules endotelials.

1.1.1. Tipus de rebuig xenogènic.

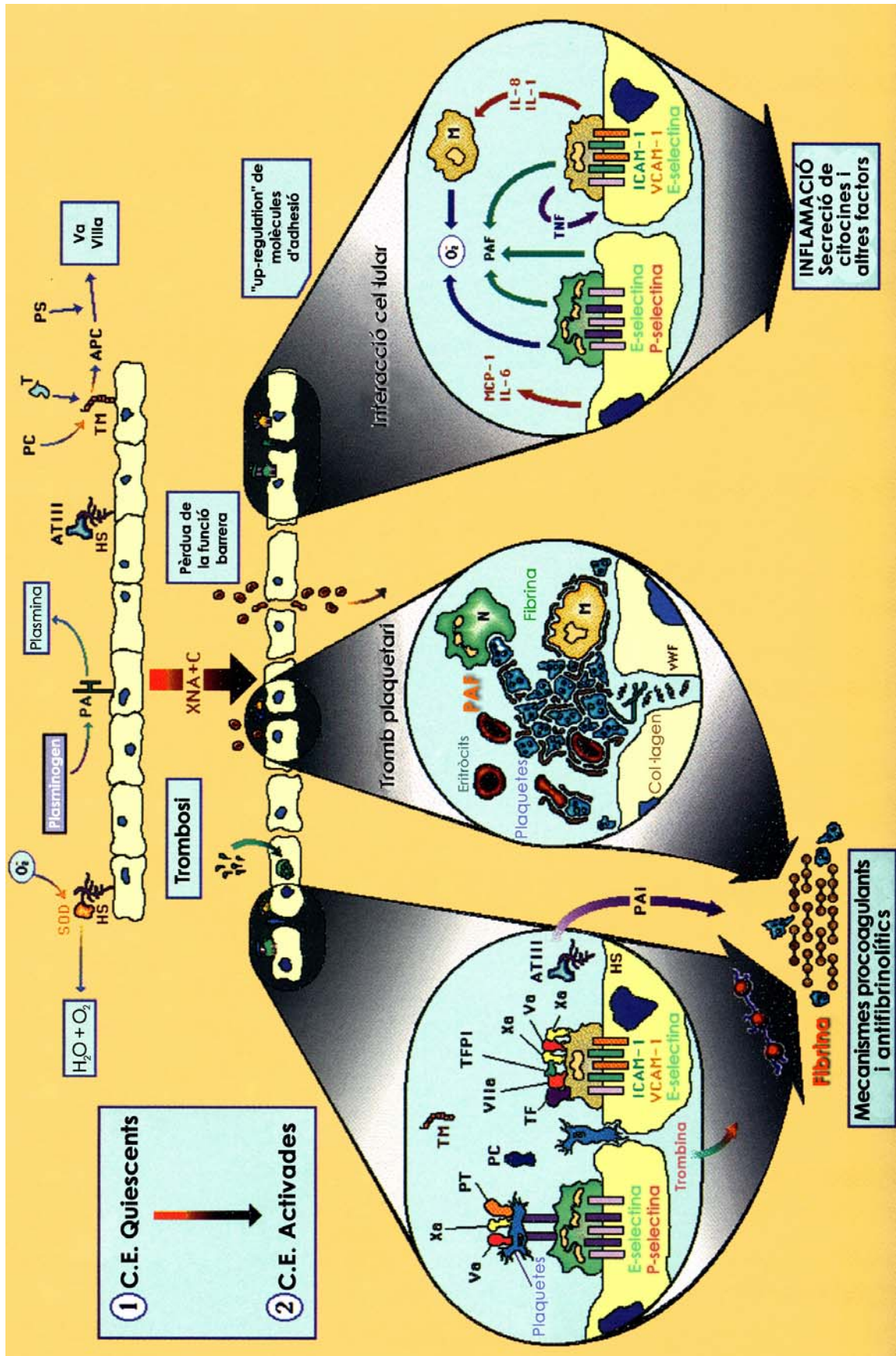
1.1.2.1. Rebuig hiperagut.

És el rebuig que té lloc minuts després de la revascularització de l'empelt quan es realitza un trasplantament entre espècies discordants, per exemple porc-humà. És un rebuig vascular on les característiques principals són hemorràgia, edema i infart dels teixits intersticials amb trombosis dels vasos xenogènics. Els factors que inicien i duen a terme aquest procés són els xenoanticossos i el complement. Els xenoanticossos s'uneixen a les cèl·lules endotelials dels vasos de l'empelt, donant la conseqüent activació del complement. Aquest causa la retracció de les cèl·lules endotelials que així disminueixen la barrera entre la sang i els teixits i s'estimula l'agregació plaquetar (figura 2).

1.1.2.1.a El complement en el rebuig hiperagut.

En contacte amb l'endoteli xenogènic els xenoanticossos IgM desencadenen l'activació del sistema del complement. La implicació d'aquest en el rebuig hiperagut s'ha demostrat amb la manca d'aquest procés en animals tractats amb agents anti-complement com pot ser el verí de cobra o realitzant xenotrasplantaments en animals deficientes pel sistema del complement^{27,28}.

Figura 2: Rebuig hiperagut en un model discordant . La figura presenta un model de les principals reaccions que porten al rebuig en combinacions xenogèniques discordants.



Els xenoanticossos IgM activen la via clàssica del complement produint la molècula C3b que a la vegada dispara l'activació de la via alternativa. En la combinació porc-primat hi ha suficients evidències per dir que la via clàssica és la principal, ja que amb l'eliminació dels xenoanticossos s'evita el rebuig hiperagut tot i tenir les dues vies del sistema del complement intactes²⁹. Això recolza la idea que l'activació independent d'anticossos no té un paper destacat. Una altra evidència és que l'inhibició de la molècula C1, que actua exclusivament a la via clàssica, evita la lisi de cèl·lules endotelials en presència de sèrum humà³⁰. D'altra banda Zhao et al.³¹, en estudis *in vitro*, van demostrar l'activació de la via alternativa. Tot i aquestes evidències existeix controvèrsia sobre quina és la via que inicia el rebuig hiperagut en aquesta combinació xenogènica.

En la combinació conill-porquí rata, tot i la presència de xenoanticossos circulants la via alternativa del complement contribueix de forma significativa en el rebuig hiperagut³². L'administració de Factor de verí de cobra previ al trasplantament va perllongar significativament la supervivència dels empelts suggerint que el complement per si sol tenia una funció important en l'inici del rebuig hiperagut. Fins i tot podem trobar combinacions, com la de gat a conill, on la via principal que inicia el rebuig hiperagut és l'alternativa. Així doncs, no sembla que hi hagi un funcionament igual per a totes les combinacions xenogèniques.

La base molecular d'aquesta activació sembla estar relacionada amb una funció inadequada de les proteïnes reguladores del sistema del complement. Aquestes proteïnes formen part d'una família de proteïnes que es caracteritzen per la presència de seqüències repetitives de 60 aminoàcids (short consensus repeats) i estan codificades en una regió única del cromosoma 1 coneguda com a RCA (de l'anglès: *regulators of complement activation*). Existeixen també altres proteïnes de membrana com l'HRF (de l'anglès: *Homologous Restriction Factor*), que només protegeix de l'atac lític si les proteïnes del complement pertanyen a la mateixa espècie, fenomen que es coneix com a restricció homòloga. D'aquestes proteïnes n'hi ha de plasmàtiques: C1 inhibidora, factor J, factor I, factor H i properdina; i n'hi ha de membrana *Decay Accelerating Factor* (DAF) o CD55; *Complement Receptor 1* (CR1) i *Membrane Cofactor Protein* (MCP) o CD46.

Les seves funcions són:

- Factor I: fragmenta les molècules C3b i C4b.
- C1 inhibidor: impedeix l'activació de la molècula C1.
- DAF i CR1: acceleren la disociació de les convertases de la via clàssica i de la via alternativa.
- MCP: cofactor del factor I en la degradació de les molècules C3b i C4b.

En condicions normals quan s'activa el complement les proteïnes reguladores del complement com "decay-accelerating factor" (DAF) i el CD59 expressades a la superfície de les cèl·lules endotelials, eviten el dany tissular. El fet que aquestes proteïnes són espècie-específiques fan el xenoempelt molt més susceptible al dany tissular que l'autoempelt.

1.1.2.1.b Cèl·lules endotelials en el rebuig hiperagut.

En aquest procés sembla molt important l'activació de les cèl·lules endotelials. Els primers en suggerir que és un factor molt important en aquest procés van ser Plat i Bach¹⁶. L'endoteli vascular és clau en el tràfic de leucòcits, la alliberació de citocines i la regulació de la cascada de la coagulació. En qualsevol cas l'activació de les cèl·lules endotelials en el rebuig xenogènic, presenta característiques diferents respecte l'activació induïda per citocines o endotoxines. Bach i Pober³³ van anomenar aquest tipus d'activació immediata que té lloc: activació de tipus I, per diferenciar-la de la que és depenent de la transcripció de gens, que anomenen activació de tipus II.

L'activació de tipus I de cèl·lules endotelials implica la retracció d'aquestes cèl·lules formant-se espais intercel·lulars i com a conseqüència exposant-se la làmina basal fibrosa, composta principalment per colagen i proteoglicans. Aquest mecanisme va acompanyat de l'expressió de P-selectina i del Factor von Willebrand (vWF) en les cèl·lules endotelials i la secreció del Factor d'Activació Plaquetar (PAF). La P-selectina juntament amb dipòsits de complement promou l'adhesió de neutròfils, monòcits i plaquetes a les cèl·lules endotelials³⁴. El PAF contribueix a incrementar la permeabilitat vascular i l'expressió de P-selectina i vWF. Aquests esdeveniments provoquen el reclutament de plaquetes. La seva adhesió i activació produeix la síntesi de substàncies vasodilatadores com el tromboxà A₂ que contrau la musculatura vascular i altera el flux sanguini. Un cop s'ha produït l'activació plaquetar, l'endoteli esdevé extremadament trombogènic mitjançant l'adhesió de factors de la coagulació³⁵. Aquest procés es veu accelerat per la pèrdua d'heparan sulfat de la superfície de les cèl·lules endotelials. L'heparan sulfat és fonamental per mantenir la integritat de la capa de cèl·lules endotelials ja que aquest glucosaminglicà present a la superfície luminal de les cèl·lules endotelials confereix als vasos sanguinis funcions de barrera al pas dels constituents sanguinis mantenint un medi anticoagulant i protegeix l'endoteli dels radicals lliures³⁶. La pèrdua d'heparan sulfat contribueix a la formació d'edema, i a l'exudació de proteïnes plasmàtiques que caracteritzen l'edema, afavoreix l'extravasació de cèl·lules sanguínies i a més a més incrementa la susceptibilitat dels teixits a patir lesions induïdes per radicals d'oxigen, ja que l'heparan sulfat a la superfície de les cèl·lules endotelials es troba unit a l'enzim superòxid dismutasa (SOD). Segons Dalmaso et al.³⁷ la pèrdua d'heparan sulfat és deguda a l'acció combinada de la molècula del complement C5a i dels anticossos naturals sobre les

cèl·lules endotelials. La combinació d'aquests dos factors provoca l'activació d'un enzim en les cèl·lules endotelials que fragmenta l'heparan sulfat.

1.1.2.1.c. Estratègies per superar el rebuig hiperagut.

Depenent del que afecten aquestes estratègies podem fer la següent classificació:

Reducció dels nivells d'anticossos naturals xenoreactius:

- Plasmaferesi
- Adsorció en l'òrgan
- Immunoadsorció en columnes d'afinitat
- Anticossos antixenoanticossos naturals
- Administració intravenosa de GAS914

Control de l'activació del sistema del complement:

- Enginyeria genètica: expressió de proteïnes reguladores del complement d'origen humà en els teixits donants d'origen porcí.
- sCR1: administració d'aquest potent inhibidor del complement, tant de la via clàssica com de l'alterna.
- Substàncies anticomplement.

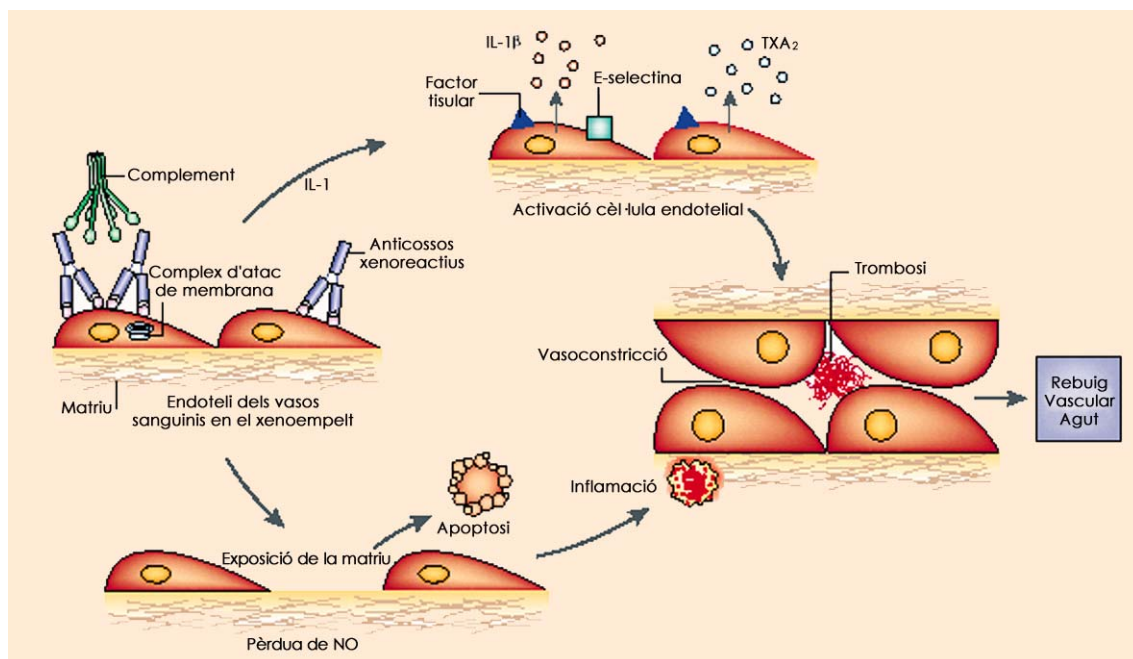
Estratègies dirigides contra l'antígen:

- Knock-out de l'enzim α 1,3 galactosiltransferasa
- Expressió d'una glicosilasa mitjançant DNA recombinant
- Transfecció del gen que codifica per la H-transferasa, enzim que competeix amb α 1,3 galactosiltransferasa.
- Transfecció d'un gen bloquejant de α 1,3 galactosiltransferasa
- Ribozimes dirigides per degradar el mRNA de l' α 1,3 galactosiltransferasa
- DNA antisentit per evitar la traducció del mRNA de l' α 1,3 galactosiltransferasa

1.1.2.2. Rebuig vascular agut.

Quan en combinacions discordants el rebuig hiperagut és superat és dona el que coneixem com a Rebuig Vascular Agut del xenoempelt (AVR, de l'anglès Acute Vascular Rejection). També s'anomena Rebuig retardat del xenoempelt (DXR, de l'anglès Deleterious Xenograft Rejection). Aquest rebuig s'inicia unes 24 hores després de la reperfusió de l'òrgan i generalment destrueix l'empelt en un període que pot ser de dies o bé de setmanes. Es caracteritza per causar un dany sever a les cèl·lules endotelials dels vasos de l'empelt, infiltració de cèl·lules inflamatòries de l'hosta a l'empelt i per una coagulació intravascular difusa que porta a una trombosi (figura 3).

Figura 3: Esquema de la patogènia del rebuig vascular agut, veiem la intervenció dels anticossos i del sistema del complement



La causa d'aquest rebuig ha estat motiu de controvèrsia^{38,39}. Sembla que sigui la unió dels anticossos naturals preformats anti-endoteli als vasos de l'empelt i l'activació de petites quantitats de complement⁴⁰ que fan que s'activin les cèl·lules endotelials. L'endoteli danyat o activat perd la capacitat de realitzar les seves funcions normals, incloent la retenció de cèl·lules i soluts dins dels vasos sanguinis i inhibir la coagulació sanguínia i la inflamació. L'endoteli activat promou la coagulació sanguínia, perd la trombomodulina que és una

important molècula anticoagulant que es troba a la superfície de les cèl·lules endotelials⁴¹, i facilita la inflamació a través de la expressió *de novo* de molts gens, que la seva expressió és controlada pel factor de transcripció NFκβ. Es sintetitzen molècules com el factor tissular, un cofactor per a la formació del complex protrombinasa, E-selectina, molècula a la qual les cèl·lules inflamatòries s'hi uneixen específicament, altres molècules d'adhesió com I-CAM i V-CAM i les citocines IL-1, IL-6, IL-8 i MCP-1. Aquests canvis són els responsables de la formació de la trombosis i de la inflamació que caracteritza aquest tipus de rebuig^{42,43}. Al danys causats pels anticossos anti-endotelials se li suma l'acció d'altres factors com els productes inflamatoris del sistema del complement, l'acció citotòxica de les cèl·lules *Natural Killer* (NK), l'acció de les cèl·lules inflamatòries com són els neutròfils i la fallada intrínseca de la regulació, dels factors de la cascada de la coagulació humans per part de les cèl·lules endotelials porcines^{38,44}.

Les cèl·lules NK sembla que tinguin un paper destacat en aquest tipus de rebuig, tot i que les evidències de la seva participació encara s'estan estudiant¹⁰. Les cèl·lules NK en condicions normals expressen receptors per molècules MHC I i la interacció d'aquests receptors amb molècules de MHC de classe I pròpies inhibeixen les cèl·lules NK. En el cas del xenotrasplantament al ser les molècules de MHC I d'origen diferent no es dona la inactivació d'aquestes cèl·lules.

Aquest tipus de rebuig es resistent a les teràpies amb els immunosupressors comuns, així doncs per intentar superar aquest tipus de rebuig s'ha de pensar en tractaments com:

- La infusió de cèl·lules hematopoiètiques abans del trasplantament, que puguin induir tolerància a antígens xeno específics com ho és el Galα1,3Gal.^{45,46}
- Knock-out de α-1,3-galactosiltransferasa i possiblement altres gens porcins, per aconseguir reduir el nombre d'antígens.⁴⁷⁻⁴⁹
- La supressió de gens pro-coagulants o pro-inflamatoris, per tal d'inhibir l'activació de les cèl·lules endotelials.³⁸
- La depleció transitòria d'anticossos xenoreactius, per tal d'induir l'acomodació de l'empelt.^{43,50,51}

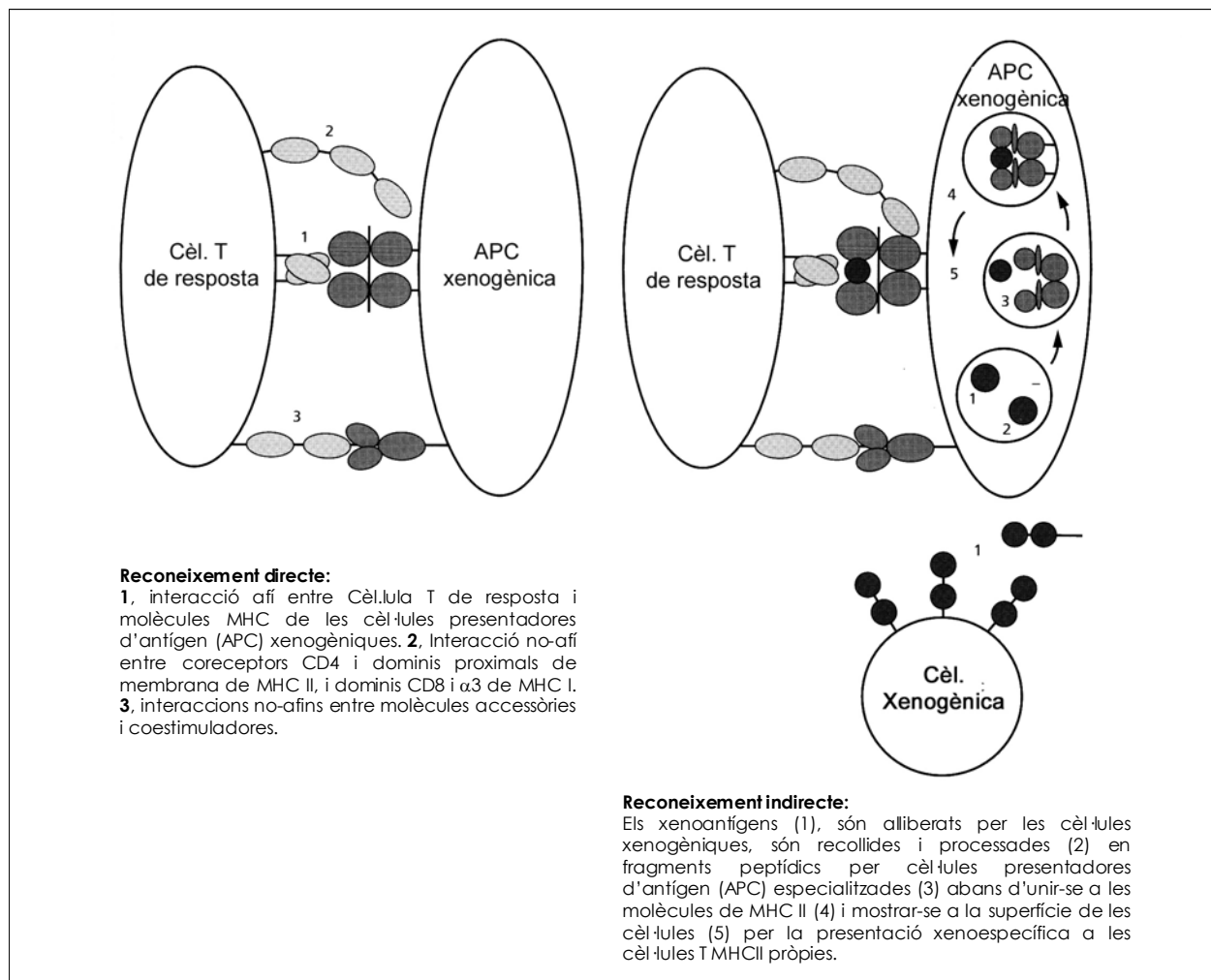
1.1.2.3 Rebuig cel·lular xenogènic.

Un cop s'han superat el rebuig hiperagut i el rebuig vascular agut, probablement esdevé una resposta mitjançada per cèl·lules, amb les variacions pròpies de cada òrgan. Era d'esperar que la resposta immune cap al xenoempelt fos més forta que cap a l'alloempelt tot i que quan es valorava la seva activitat *in vitro* s'observava que les cèl·lules T reaccionaven poc⁴⁵. Aquests experiments feien pensar que la resposta mitjançada per cèl·lules no suposaria una barrera pel xenotrasplantament. Posteriorment, contràriament a l'esperat, s'ha pogut demostrar que aquesta resposta pot ser molt més severa que en els alloempelts. Mentre que l'alloresposta va dirigida principalment contra els antígens expressats pel MHC de l'empelt, els principals antígens de l'òrgan xenogènic són reconeguts pel sistema immunitari del receptor i pot incloure un repertori més divers de proteïnes. A més a més la resposta cap al xenoempelt mitjançada per cèl·lules pot ser molt amplificada per la resposta humoral. Per exemple, la unió d'anticossos a un endoteli estrany i l'activació del sistema del complement porta a l'activació de cèl·lules presentadores d'antígen⁵², secreció de citocines⁴² i l'increment de la permeabilitat dels vasos sanguinis. Aquestes respostes inflamatòries promouen la diferenciació i activació de les cèl·lules T i la seva entrada a l'empelt.

Una altra diferència entre la resposta cel·lular immunològica dels xenoempelts respecte els alloempelts, i la qual pot explicar la diferència paradoxal entre la resposta a l'estimulació xenogènica *in vitro* i *in vivo*, és el mecanisme pel qual les cèl·lules T del receptor reconeixen les cèl·lules estranyes. En l'allotrasplantament, les cèl·lules T són activades directament pel contacte amb els antígens MHCII expressats a les cèl·lules estranyes, és a dir que el receptor "confon" la molècula de MHCII estrangera amb una de pròpia presentant un pèptid estrany. Aquest tipus de reconeixement anomenat reconeixement directe (figura 4), permet una resposta ràpida i vigorosa contra les cèl·lules estranyes, es dona en cèl·lules en cultiu, on va ser detectada. En canvi cèl·lules xenogèniques poden fallar en desenvolupar aquesta resposta en cultiu, perquè diverses molècules d'adhesió i senyals generats per cèl·lules diana estranyes, i que són necessàries per l'activació de cèl·lules T, són incompatibles amb les cèl·lules T i no es dona l'activació⁵³. Encara que aquesta incompatibilitat impedeix la resposta *in vitro* no té perquè impedir la resposta *in vivo* perquè en aquest cas els antígens estranys poden ser recollits i processats per les cèl·lules presentadores d'antígen pròpies, les quals llavors poden presentar l'antígen a les cèl·lules T i activar-les (figura 4).

Així doncs en el xenotrasplantament és poden donar tant les respostes directes com les indirectes.

Figura 4: Representació del xenoreconeixement directe i indirecte.



Donada la força de la resposta cel·lular T en el xenotrasplantament i la importància dels anticossos específics, s'ha suggerit que l'èxit del xenotrasplantament pot dependre de la capacitat d'induir tolerància immunològica⁴⁵.

Al rebuig mitjançat per cèl·lules també hi poden tenir un paper important les cèl·lules NK. Aquests limfòcits citotòxics no tenen un receptor específic de l'antígen però poden reconèixer algunes cèl·lules estranyes, cèl·lules infectades per virus, provocar l'alliberament de citocines inflamatòries i fins i tot matar directament cèl·lules marcades. Cèl·lules NK humanes presenten diversos receptors que poden regular a l'alça l'activitat contra el xenoempelt. Poden trencar i activar l'endotelí porcí⁵⁴. Encara no està ben determinada quina és la seva contribució en el rebuig del xenoempelt i quina seria l'estratègia terapèutica a seguir. S'ha vist que tenen molta importància en models de trasplantament en receptors atímics⁵⁵.

1.1.2.4 Rebuig tardà del xenoempelt.

El rebuig tardà del xenoempelt, LXR, de l'anglès Late Xenograft Rejection, és el tipus de rebuig que es dona quan a un xenoempelt concordant de llarga supervivència, se li retira el tractament immunosupressor. Presenta característiques similars al rebuig vascular agut (AVR), o també anomenat rebuig retardat del xenoempelt (DXR), descrit en combinacions discordants, però a diferència d'aquest el LXR es controlable amb fàrmacs com la Ciclosporina A o el Tacrolimus. Els efectors que desencadenen el rebuig tardà del xenoempelt sembla que poden ser una combinació de xenoanticossos, macròfags, productes de secreció d'aquestes cèl·lules i trombosi.^{56,57}

Chong et al.⁵⁸, en xenotrasplantament cardíac heterotòpic van descriure que els anticossos produïts durant la fase de LXR podrien estar sintetitzats per una subpoblació de cèl·lules B diferent de la que produeix els anticossos naturals durant la fase de Rebuig Vascular Agut (AVXR). Segons aquests autors aquesta resposta cel·lular B és T-independent, i pot ser controlada amb immunosupressors que inhibeixen la IL-2, així aquest tractament induiria l'acomodació.

El model en que més s'ha estudiat aquest tipus de rebuig és en la combinació hámster-rata, i principalment en trasplantament cardíac heterotòpic. En aquest model s'han descrit característiques diferents d'aquest tipus de rebuig depenent de quin és l'òrgan trasplantat. Així doncs, s'ha considerat que el rebuig dels empelts cardíacs estava mitjançat principalment per anticossos i el dels empelts hepàtics per cèl·lules. Aquest tipus de rebuig no apareix immediatament després de la retirada de la immunosupressió sinó que ho fa de 6 a 18 dies, depenent dels autors,^{57,59} en el cas del xenotrasplantament cardíac i de 30 a 40 dies en xenotrasplantament hepàtic⁵⁹. La caracterització histològica de xenoempelts cardíacs que han patit LXR es caracteritza per un elevat nombre de macròfags, dipòsits de IgM, edema, hemorràgia i necrosi dels miòcits. En canvi en els xenoempelts hepàtics Molleví et al.⁵⁹ destaquen un infiltrat limfocitari als espais portals i periportals, hemorràgia i necrosi hepatocitària.

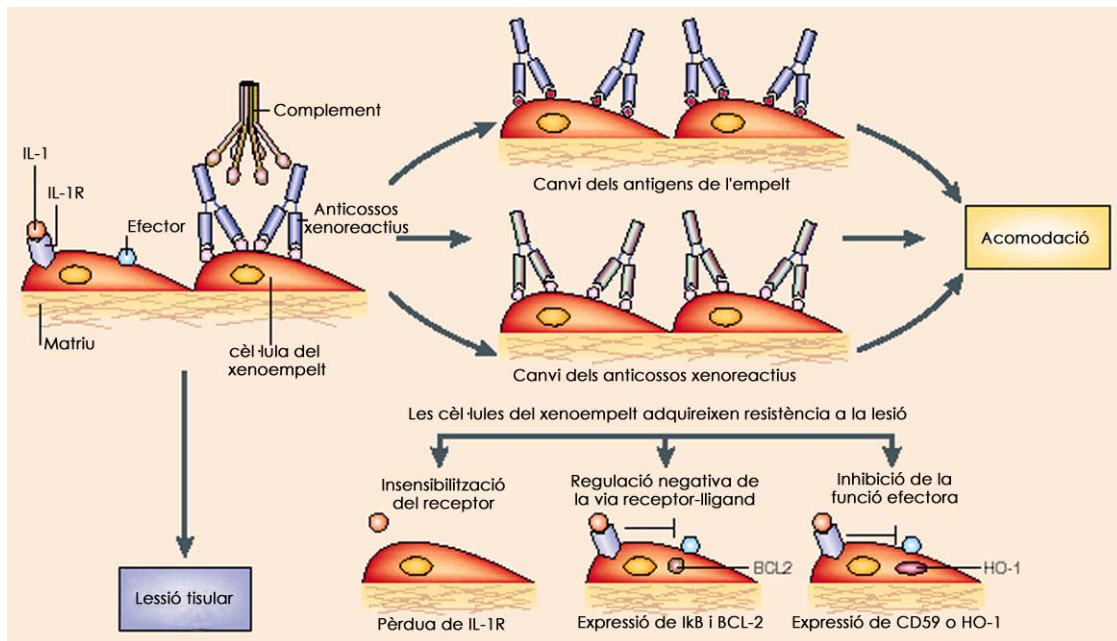
1.1.3 Acomodació

Òrgans trasplantats protegits del rebuig hiperagut per depleció del xenoanticossos o inhibició del complement, alguns cops poden continuar la seva funció tot i que torni a haver-hi anticossos anti-donant o bé els nivells de complement siguin iguals als d'abans del trasplantament. Aquest fenomen l'anomenem Acomodació. En xenotrasplantament va ser descrit per Platt et al el 1990⁶⁰ i per Bach et al el 1991⁶¹.

La primera idea d'acomodació va sorgir de que al·loempelts trasplantats a receptors amb sistemes ABO i HLA incompatibles⁶². Malgrat aquestes incompatibilitats n'hi havia que continuaven funcionant.

Encara ens trobem lluny de conèixer amb certesa quins són els mecanismes que fan possible que es doni l'acomodació. Platt i Bach van ser els primers en proposar tres mecanismes que podien explicar aquest fenomen⁶⁰ (figura 5):

1. Els xenoanticossos que retornen a la circulació després de la depleció podrien tenir una afinitat o especificitat diferent d'aquells que han estat eliminats.
2. Els epítops de les cèl·lules endotelials pels xenoanticossos poden haver estat alterats d'alguna manera mentre els anticossos estaven deplecionats.
3. Les cèl·lules endotelials de l'empelt poden haver-se tornat més resistents al dany per xenoanticossos o bé pel complement, patint una reacció activa, protectora i repressora que evitaria l'aparició del rebuig. Aquest mecanisme podria ser conseqüència d'un o més dels següents processos⁶³:
 - a. Desensibilització o pèrdua dels receptors agonistes de la inflamació.
 - b. Interrupció de l'activació cel·lular o de passos efectors, inhibició de $\kappa\beta$ ($I\kappa\beta$) o de Bcl-2.
 - c. Producció de proteïnes com CD59 o hemoxigenasa (HO-1) que reparen o bloquegen els efectes destructors dels agonistes que poden induir el dany tissular.

Figura 5: Esquema dels mecanismes que poden portar a un procés d'acomodació de l'òrgan trasplantat.

Actualment s'estan utilitzant models experimentals en rosegadors per a l'estudi de l'acomodació, un dels més utilitzats és trasplantament cardíac de hámster a rata amb el receptor presensibilitzat, ja que així tot i ser un model concordant es dona el rebuig hiperagut. En estudis fets en aquest model s'ha descrit un "fenotip d'acomodació" que consta de l'*up-regulation* de l'expressió d'alguns gens en les cèl·lules endotelials. Aquests gens són Bcl-2, Bcl-xl i A20, i desvien la resposta humoral antiempelt cap a la producció de subtipus que no fixen complement i un patró de secreció de citocines Th-2-like per part dels limfòcits infiltrants⁶⁴. Encara que amb aquesta última característica no hi estan d'acord tots els investigadors⁶⁵.

1.1.4 Tolerància

1.1.4.1 Generalitats.

Quan ens referim a "tolerància" de l'empelt parlem del procés que implica la inducció i el manteniment d'una no-reacció específica vers l'empelt en absència d'un tractament immunosupressor. Aconseguir la tolerància de l'empelt actualment és un dels principals objectius en el trasplantament clínic. El fetge té característiques que el diferencien dels altres

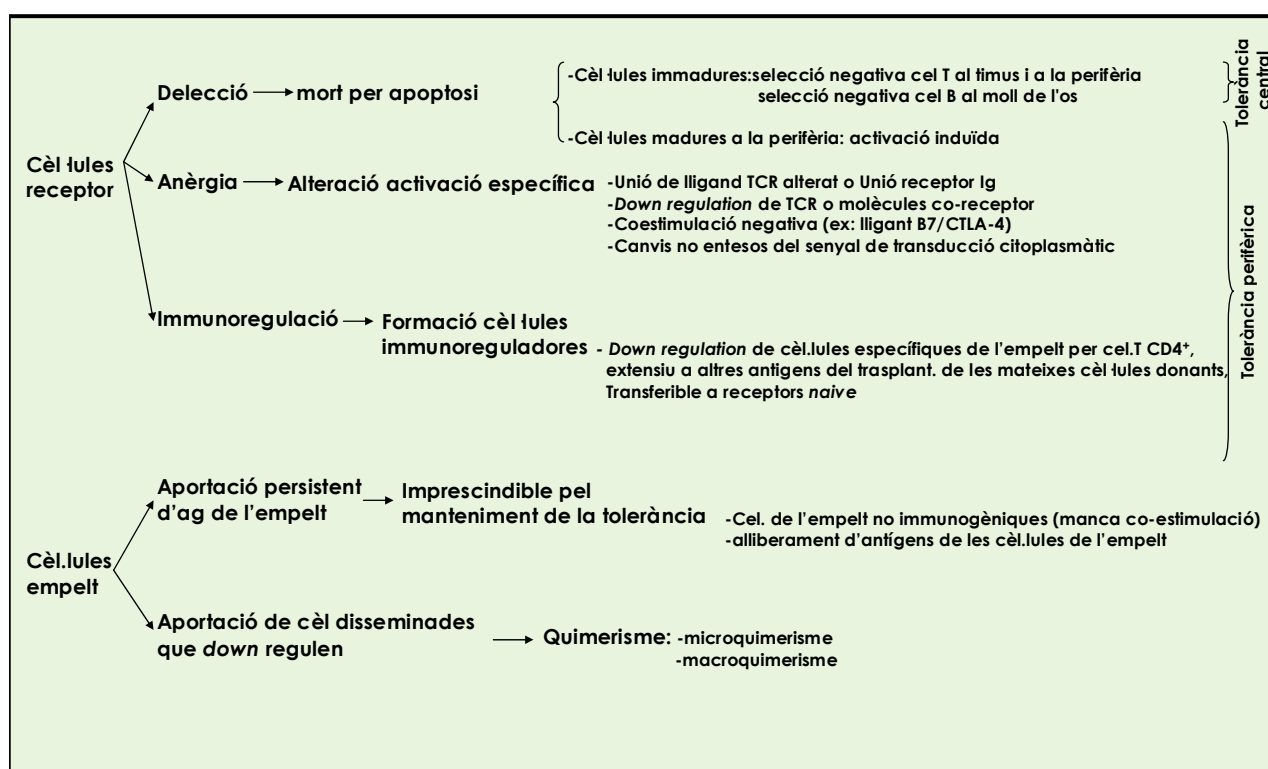
òrgans, com hem explicat anteriorment, que el presenten com a primer candidat a que la tolerància de l'empelt hepàtic pugui ser una realitat clínica.

L'evolució cap a la tolerància dels al·loantígens donants *in vivo* és un procés dinàmic que implica una xarxa de mecanismes que hi contribueixen a diferents nivells. La persistència d'al·loantígens és pensa que és essencial per a la majoria de mecanismes que hi estan implicats. En l'absència dels al·loantígens, la tolerància es perd immediatament o bé de manera gradual depenent de quin és el mecanisme principal que està implicat en aquest procés.

De tota la xarxa de mecanismes implicats podem diferenciar els que afecten a les cèl·lules dels receptors i els que impliquen a les cèl·lules de l'empelt.

Quan ens referim a les cèl·lules del receptor podem parlar de dos tipus de tolerància: central i perifèrica. Es coneix com a "tolerància central" el procés pel qual les cèl·lules T reactivs tant bon punt es produeixen al timus són eliminades. Qualsevol cèl·lula T reactiva restant que abandoni el timus és inactivada pel procés que anomenem "tolerància perifèrica".

Figura 6: Xarxa de mecanismes implicats en el procés de tolerància.



Aquestes cèl·lules es veuen afectades per diferents mecanismes (figura 6):

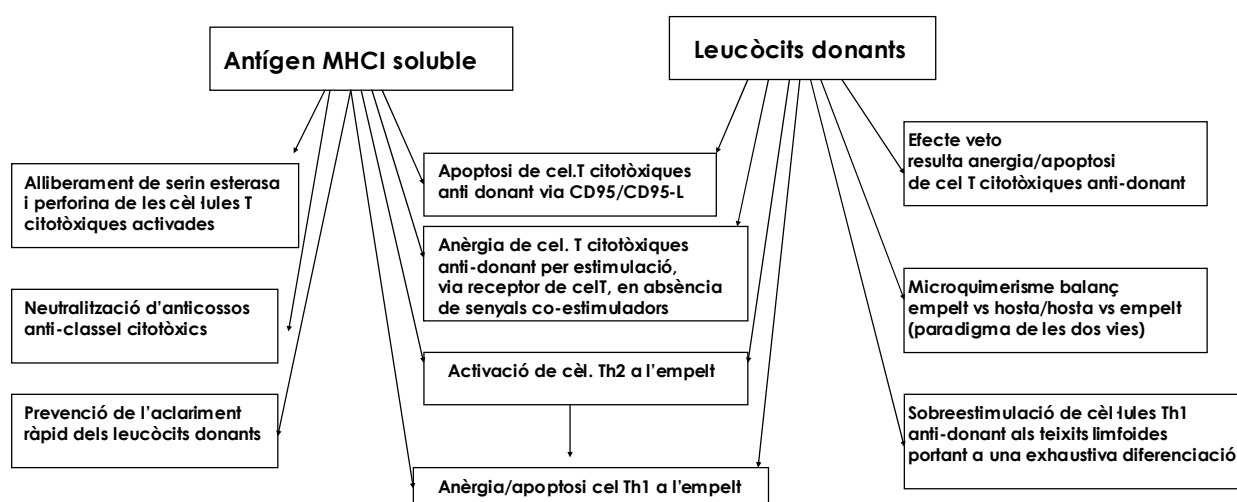
- **deleció per mort per apoptosi de cèl·lules immadures:** limfòcits T al timus i en teixits perifèrics, de limfòcits B a la medul·la òssia i de cèl·lules madures a la perifèria.
- **Anèrgia o alteració específica de l'activació:** és una inactivació funcional de la resposta de les cèl·lules T causada per una reestimulació per part dels antígens. Algunes formes d'anèrgia de cèl·lules T també resulten del desenvolupament d'activitats reguladores, i possiblement hi ha un espectre de condicions que es poden presentar depenent de la naturalesa de la primera trobada amb l'antigen⁶⁶. És un mecanisme reversible per exemple amb IL-2⁶⁷, àmpliament estudiat *in vitro* però no es coneix molt bé el seu funcionament *in vivo*. Aquesta alteració de l'activació pot ser perquè estigui alterada la unió del lligant amb el receptor de la cèl·lula T (TCR)⁶⁸ o la unió d'immunoglobulines al seu receptor. També pot ser deguda a la *down regulation* del receptor de cèl·lula T o de les molècules coreceptores⁶⁸. A una coestimulació negativa o bé a canvis, no massa coneguts, de la transducció de senyal citoplasmàtic.
- **Immunoregulació:** és un procés actiu mitjançant el qual una població de cèl·lules controla o regula l'activitat d'una altra població de cèl·lules. Ha estat descrit que diverses poblacions de leucòcits tenen la capacitat de controlar la manca de resposta cap a la estimulació dels antígens, tant en la resposta immunològica innata com en l'adaptativa⁶⁶.
- **Esgotament clonal:** té lloc com a resultat d'una estimulació crònica per antígens amb condicions subòptimes. La conseqüència és una deleció o una inactivació funcional de cèl·lules que estan responenent a antígens del donant. L'esgotament clonal es pot donar després del trasplantament hepàtic, on un elevat nombre de cèl·lules presentadores d'antigen del donant migren del fetge cap als teixits limfoides i desencadenen aquest tipus de resposta.

Les cèl·lules de l'empelt juguen un paper molt destacat en el procés de tolerància. Hi participen:

- **Aportant de forma continuada antígens:** aquesta aportació és imprescindible per al manteniment de la tolerància, per una banda perquè aporten cèl·lules no immunogèniques per manca de coestimulació, i per l'altra pels antígens que es desprenen de les cèl·lules de l'empelt.
- **quimerisme o aportació disseminada de cèl·lules down-regulades.**

Els antígens responsables de la tolerància sembla que són els MHC de classe I. El fetge és un òrgan gran, amb molta massa parenquimal, i per tant pot alliberar una elevada quantitat d'antígens. Yamaguchi et al.⁶⁹ descriuen que els hepatòcits expressen poca quantitat de MHC I, però es dona un increment d'aquesta expressió després del trasplantament⁷⁰. A més a més l'endoteli vascular, els ductes biliars i les cèl·lules de Kupffer també alliberen aquests antígens. A més a més s'ha descrit un alliberament continu d'antígens MHC I solubles, que es detecten a la circulació del receptor durant les primeres 24 hores posttrasplantament i que persisteixen fins que dura l'empelt. Aquest alliberament important d'antígens pot neutralitzar els anticossos citotòxics anti-MHCI del donant. No sembla que sigui l'únic mecanisme a que podem relacionar aquest alliberament d'antigen⁷¹, podem veure més accions a les que sembla que hi estan implicades a la figura 7.

Figura 7: Possibles mecanismes mitjançant els quals els antígens solubles de MHC de classe I originaris del donant i els leucòcits del donant que provenen de l'empelt hepàtic poden fomentar un procés de tolerància després d'un trasplantament hepàtic ortotòpic.



El fetge trasplantat és una font important de leucòcits del donant. Estudis experimentals han demostrat la necessitat d'una certa quantitat de cèl·lules del donant a la perifèria del receptor per poder aconseguir una millor acceptació de l'empelt. Les funcions a les que semblen associats aquests leucòcits les veiem a la figura 7⁷¹.

Com que tenim un doble origen de leucòcits podem parlar de quimerisme. Depenent de en quin tipus de cèl·lules ens fixem i d'on es troben s'anomena macroquimerisme, microquimerisme o bé quimerisme de l'empelt⁷².

Macroquimerisme: leucòcits passatgers transferits al receptor juntament amb l'empelt. Aquests poden ser detectats en sang perifèrica durant aproximadament 3 setmanes després del trasplantament. Aquestes cèl·lules desapareixen del torrent sanguini, possiblement degut a una resposta immunològicament activa del receptor.

Microquimerisme: quan s'estudia el receptor a llarg termini, es detecten als òrgans perifèrics com la melsa cèl·lules del donant. La majoria han estat produïdes a partir de *stem cells* trasplantades juntament amb l'empelt.

Quimerisme de l'empelt: amb aquest terme ens referim a la coexistència de leucòcits del donant i del receptor dins de l'empelt. La presència de cèl·lules presentadores d'antígen com són les cèl·lules dendrítiques i les cèl·lules de Kupffer amb el mateix fenotip però de diferent origen sembla tenir un paper important en la inducció de la tolerància. Sembla que a l'empelt hi té lloc l'intercanvi complet dels leucòcits donants, així doncs sembla que el quimerisme de l'empelt sigui un fenomen a curt termini.

El grau de macro i microquimerisme del receptor aparentment depèn del tipus d'empelt, del seu contingut en leucòcits passatgers i en *stem cells* hematopoètiques. Tanmateix el grau de quimerisme de l'empelt que presenta l'empelt hepàtic sembla una propietat única d'aquest òrgan. Meyer et al.⁷², recentment, han descrit en estudis amb rosegadors, la mort per apoptosi de limfòcits CD8⁺ que té lloc durant la inducció de tolerància després del trasplantament hepàtic. Aquest procés sembla exclusiu del fetge. Si la persistència de les cèl·lules presentadores d'antígen del donant presents a l'empelt hepàtic promouen aquest fenomen sembla que la pèrdua de factors co-estimuladors⁷³ o bé amb la presència de CD40 a la seva superfície⁷⁴ siguin possibles estratègies per a la inactivació o l'apoptosi de cèl·lules T que poden dur a la tolerància perifèrica permanent.

Ha estat molt debatut si el microquimerisme és essencial per aconseguir la tolerància de l'empelt⁷⁵. S'ha argumentat que és imprescindible un quimerisme persistent quan el que es pretén és aconseguir tolerància a través d'una deleció central dins del timus. D'altra banda, sembla que un quimerisme persistent no sigui imprescindible per aconseguir tolerància a través de mecanismes immunoreguladors perifèrics⁷⁶. Per aquest últim procés és suficient una aportació continua d'antígen per part de l'empelt que pugui ser processat per les cèl·lules presentadores d'antígen⁷⁷. Indirectament el processament de l'antígen és suficient per mantenir la dominància de les cèl·lules T reguladores. En algunes circumstàncies, teòricament, no és necessari el microquimerisme del donant. El treball de Schlitt et al. demostra que encara que les cèl·lules hematopoètiques del donant són necessàries per

aconseguir tolerància en un model de trasplantament cardíac en rates⁷⁸, no és essencial el microquimerisme. Aquestes troballes suggereixen que la presentació directa d'antigen del donant per les cèl·lules hematopoiètiques és necessària per a la inducció de tolerància d'antígens MHC expressats en els teixits donants i la eliminació o reducció de cèl·lules T que mostren al·loreactivitat directa podria facilitar que el sistema immunitari esdevingui tolerant als antígens del donant, els quals són reprocessats per les cèl·lules de l'hoste⁷⁹ (presentació indirecta).

1.1.4.2 Mecanismes per induir tolerància:

- Bloqueig de les senyals co-estimuladores.
- Modulació de les citoquines.
- Deleció dels limfòcits responsables de la resposta.
- Altres:
 - bloqueig de la migració de leucòcits
 - bloqueig d'antígens específics mitjançant teràpies basades en pèptids
 - l'ús de cèl·lules i teixits manipulats genèticament per inactivar els limfòcits patògens.

1.1.4.2.a Bloqueig de les senyals co-estimuladores.

Una de les possibilitats d'induir tolerància intervenint a nivell dels senyals co-estimuladors és bloquejant la interacció CD4-MHCII, mitjançant l'administració d'anticossos monoclonals anti-CD4. Tot i que el mecanisme no és del tot conegut s'ha aconseguit induir supervivències a llarg termini d'al·loempelts cardíacs i d'illots pancreàtics en ratolí i rata^{80,81}. En al·loempelts renals realitzats en *Cynomolgus*, l'administració d'anticossos monoclonals anti-CD4 humana perllonga la supervivència de l'empelt significativament^{82,83}. Aquests no són els únics estudis que s'han fet amb aquest propòsit sinó que també s'han utilitzat altres anticossos com l'anti-CD154 en combinació amb l'antigen CTLA4-Ig⁸⁴. S'ha posat un interès especial en el CD2, CD30 o el 4-1BB, en molècules d'adhesió com ICAM i VLA i en vies de senyalització intracel·lular per l'activació de cèl·lules T com CD45 i ZAP-70. Amb anticossos contra LFA i ICAM-1 s'ha demostrat que indueixen la permanència d'al·loempelts cardíacs i que perllonguen la supervivència dels de pell^{85,86}. Aquests anticossos han estat pensats per inhibir la migració de les cèl·lules immunes de l'hosta cap a l'empelt, concretament els dirigits contra el CD45 ja que hi juga un paper central en la senyalització de cèl·lules T⁸⁷.

En estudis de xenotrasplantament s'ha vist que moltes de les senyals co-estimuladores i de les proteïnes d'adhesió entre cèl·lules T humanes i cèl·lules estimuladores porcines semblen ser funcionals^{88,89} i es dóna un reconeixement directe de les cèl·lules presentadores d'antígen per part de les cèl·lules T humanes^{90,91}. El bloqueig d'aquests senyals no semblen ser suficients per a la inducció de tolerància en el trasplantament porc-humà.

1.1.4.2.b Modulació de citoquines.

El descobriment dels subtipus de limfòcits T *helper* que difereixen amb el patró de citoquines que alliberen i en les seves funcions efectores ha proporcionat un model de regulació dels processos immunològics i inflamatoris per citoquines. Els limfòcits Th1 produeixen IL-2, INF- γ i limfotoxina mentre que els limfòcits Th2 alliberen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13. S'ha postulat que les citoquines derivades de les cèl·lules Th1 mitjancien el rebuig i les Th2 protegeixen del rebuig. No es coneix amb certesa quina és la causa d'un determinat perfil de citocines, sembla que sigui resultat de: 1) d'un estat de tolerància induït per diferents mecanismes, 2) d'un suport auxiliar per al manteniment de la tolerància, o bé 3) es presenten independentment de que es doni un procés de tolerància. No està clar de que el perfil de citocines tingui un paper principal en la supervivència de l'empelt. Intentos de modificar el perfil de citoquines per induir tolerància han fracassat. L'administració o expressió de IL-10 i IL-4, la inhibició de citoquines Th1 i la inducció de citoquines Th2 pel bloqueig de IL-12 no indueix tolerància⁹². La manca de consistència dels diferents intents d'induir tolerància per la modulació de les citoquines podria ser el resultat de la redundància de les famílies de citoquines i la naturalesa pleiotròpica de les citoquines individualment. Aquestes característiques han frenat l'entusiasme inicial de la manipulació de les citoquines com a un mecanisme viable per induir la tolerància de l'empelt.

1.1.4.2.c Deleció dels limfòcits.

La deleció específica de subgrups de limfòcits específics, és una estratègia molt estudiada actualment. Teràpies com és l'administració d'anticossos monoclonals, per exemple l'anti-CD3, aconseguen evitar el rebuig de forma efectiva però tenen una vida curta i per tant presenten una multitud de possibles complicacions que poden posar en perill la supervivència de l'empelt. S'ha desenvolupat una nova teràpia com a forma alternativa per actuar directament sobre el CD3, és una immunotoxina deplecionada⁹³. És construïda conjugant el lloc d'unió mutat de la toxina de la diftèria a un anticòs monoclonal dirigit contra CD3 de macac (*rhesus macacus*). Aquesta teràpia ha estat utilitzada per induir supervivències llargues d'alloempelts de ronyó i de pell, administrat en combinació amb

injeccions intratímiques de limfòcits donants⁹⁴. Aquest protocol sembla que regula a la baixa l'activitat del limfòcits T citotòxics mentre que és manté l'activitat dels limfòcits T *helper* i de les cèl·lules B. Tanmateix s'han trobat limitacions a llarg termini associades al seu ús com són: rebuig crònic, nefritis intersticial i una inexplicable malaltia debilitant.

Una línia de recerca en la deleció de limfòcits utilitza la via Fas-Fas-ligant per l'activació/inducció de mort cel·lular⁹⁵. L'anàlisi de les vies apoptòtiques als limfòcits ha demostrat un paper essencial dels membres de la superfamília del receptor Fas/TNF en el control de la resposta immunitària. S'han realitzat intents de manipular genèticament les cèl·lules donants i les cèl·lules presentadores d'antígen perquè expressin Fas-ligant per tal d'eliminar selectivament les cèl·lules que interaccionin amb les cèl·lules donants. Un exemple és el trasplantament d'illots pancreàtics cotrasplantats amb mieloblasts singènics manipulats genèticament que expressaven Fas lligant⁹⁶. Van aconseguir una glicèmia normal durant més de 80 dies. El potencial d'aquesta proposta encara no està ben establert perquè hi ha incerteses associades amb els efectes proinflamatoris del Fas lligant i en l'efecte de la unió d'aquesta molècula amb les cèl·lules donants.

1.1.4.2.d Inducció de quimerisme.

Una estratègia per a la prevenció del rebuig és el quimerisme hematopoètic. El sistema hematopoètic de l'hosta és parcialment eliminat i substituït pel del donant mitjançant un trasplantament de medul·la òssia. Aquest sistema és pensat per generar un estat de tolerància robust i segur. Per tal de poder aconseguir quimerisme derivat del moll d'os del donant es requereix la depleció de cèl·lules T del sistema limfohematopoètic del receptor.

Hi ha estudis que estan utilitzant anticossos policlonals anti-timòcits i/o mecanismes mieloablatius com la radiació, per eliminar la majoria de les cèl·lules T del receptor i crear espai suficient pel nou empelt de moll d'os⁹⁷. El fet de poder disposar de mecanismes d'eliminació específics i d'anticossos monoclonals per bloquejar les cèl·lules T, ha servit als investigadors per definir el paper dels diferents subtipus de cèl·lules T per separat, la quantitat i qualitat del moll d'os donant necessari i el grau de mielosupressió que es requereix. A més a més aquests reactius permeten que passin amb l'empelt suficients *stem cells* per a la inducció de tolerància. Un altre atractiu per aquesta estratègia és que s'ha aconseguit tolerància en models preclínic travessant les barreres d'histocompatibilitat més estrictes⁹⁸. El trasplantament de moll d'os del donant ha estat utilitzat com a teràpia adjuvant per tal d'incrementar el quimerisme en models de trasplantament renal, hepàtic, cardíac i pancreàtic⁹⁵. Basant-se en les observacions fetes en models murins es van realitzar al·lotrasplantaments renals amb micos (*Cynomolgus monkeys*) amb diferents MHC⁹⁸. Van

deplecionar les cèl·lules T i van utilitzar un règim de condicionament no-mieloablatiu per tal d'induir quimerisme i tolerància. Van realitzar 13 trasplantaments amb aquest protocol i 11 dels quals van aconseguir quimerisme de diferents línies ; 9 receptors van aconseguir llarga supervivència (el període més llarg va ser de 5 anys). No obstant aquests resultats la possibilitat de posar-ho a la pràctica clínica de l'allotrasplantament és força llunyana. Els empelts s'han de trasplantar tan ràpid com sigui possible i això ajusta molt la finestra en que es poden dur a terme els protocols citats.

Un altre fet que cal remarcar és que no tots els investigadors coincideixen amb la idea de que la persistència del quimerisme sigui imprescindible com ja hem citat anteriorment. S'ha suggerit que el quimerisme de forma continuada es requereix només per tal d'aconseguir tolerància central, dins el timus, i que no és necessari de forma persistent per induir tolerància a nivell perifèric. Altres autors han argumentat que la tolerància després del trasplantament de moll d'os és, de fet, una altra forma de deleció clonal⁹⁹. En aquest mecanisme, les cèl·lules reactives de l'empelt estan fortament activades, i aquesta forta activació porta a una deleció clonal.

1.1.4.2.e Altres estratègies.

A més a més de les exposades hi ha altres estratègies per induir tolerància, una d'aquestes és la utilització de pèptids per tal de disminuir la resposta. Aquest procés es centra en la presentació indirecta de l'antígen ja que les cèl·lules presentadores d'antígen no poden presentar-los per la via directa. Pèptids de MHC de classe I i II han estat utilitzats amb èxit per induir tolerància en models amb rosegadors tant si s'han utilitzat sols com juntament amb ciclosporina¹⁰⁰.

Una altra tècnica per a la inducció de tolerància és la injecció intratímica d'antígen soluble. S'ha utilitzat aquesta tècnica per induir tolerància en rosegadors receptors d'empelts de pell cor fetge i ronyó¹⁰¹. El protocol inicial s'ha estès amb la injecció intratímica de DNA. S'hi veuen implicats tant processos de deleció clonal com de supressió perifèrica. Tanmateix no s'ha descrit la inducció de tolerància en animals grans mitjançant aquesta tècnica. D'altra banda, la involució progressiva del fimus que patim els humans amb l'edat, pot representar un altre inconvenient per a la utilització d'aquesta tècnica.

Els fàrmacs immunosupressors intervenen en diversos mecanismes per induir tolerància dels citats anteriorment, i per tant pot ser una altra possible estratègia per aconseguir dit estat immunològic. Recentment s'ha vist que la IL-2 és necessària per a la supervivència dels alloempelts a llarg termini¹⁰² i la senyalització per part d'aquesta citoquina és important per al funcionament de les cèl·lules T reguladores¹⁰³ i la inducció de tolerància. Tanmateix, dir

que els fàrmacs anticalcineurínics són inhibidors de la inducció de tolerància és una asseveració incorrecta ja que receptors d'alloempelts de donant viu tractats amb Tacrolimus en la fase inicial després del trasplantament han aconseguit tolerància¹⁰⁴. Starzl et al. han descrit el manteniment dels empelts tot i haver discontinuat la immunosupressió¹⁰⁵.

Malgrat l'entusiasme que han aportat les noves descobertes en la immunologia del trasplantament, està clar que el sistema immunitari humà és molt complicat i amb mecanismes redundants que no permet que es saltin les seves funcions bàsiques. A més a més tampoc està clar quines de les diferents tècniques disponibles poden ser capaces d'induir tolerància d'una manera segura.

1.2 ASPECTES NO IMMUNOLÒGICS.

No tots els problemes implicats en el xenotrasplantament són de tipus immunològic, ja que el fet de ser espècies diferents porta amb altres barreres que s'han de superar com:

- Barreres anatòmic-fisiològiques
- Barreres metabòliques
- Xenozoonosis
- Aspectes ètics

1.2.1 Barreres anatòmic-fisiològiques.

La mida dels animals i la seva postura natural són dos trets que poden ser decisius per poder utilitzar un animal com a donant. Les diferències anatòmiques impedeixen tècniques quirúrgiques satisfactòries. Un altre tret important és la grandària dels òrgans. Així doncs els òrgans han de ser de mida semblant ja que si un òrgan és massa gran estarà predisposat a ser comprimit dins del receptor; i en el cas contrari, que l'òrgan sigui massa petit augmentarà de mida de manera no fisiològica per edema o hemorràgia.

Només l'home, els primats i els cangurs s'han adaptat a una posició erecta permanent, i això ha fet que les seves característiques anatòmiques siguin força diferents de les dels

mamífers de mida semblant però de recolzament horitzontal. La posició humana erecta pot influir en l'èxit de trasplantaments amb òrgans d'animals de recolzament horitzontal ja que la majoria d'òrgans parenquimatosos depenen dels batecs cardíacs rítmics o del to muscular per produir una pressió tissular adequada.

La postura també influeix en la circulació sanguínia, un exemple és el pulmó humà que degut a la postura erecta de l'home, presenta tres zones indistingibles amb pressions diferents i la pressió dels vasos sanguinis és més pulsàtil. Aquests factors, junt amb les diferències específiques de cada espècie en relació a la resistència de la barrera sang-gas, hemoglobines diferents i viscositat sanguínia variable fa que el transport de gasos es podria veure alterat si els pulmons o el cor d'animals de posició horitzontal fossin trasplantats a un individu de recolzament vertical.

Hi ha altres paràmetres fisiològics que podrien influenciar com: el pH, l'osmolalitat, el flux sanguini dels òrgans i la despesa cardíaca. Entre espècies relacionades filogenèticament aquests aspectes sembla que no tindrien massa impacte en un hipotètic xenotrasplantament donat que presenten rangs de valors similars.

Si no consideréssim els problemes immunològics i acceptéssim que la tolerància immunològica en el xenotrasplantament es pugui aconseguir algun dia, encara no sabem si els mecanismes fisiològics seran compatibles.

1.2.2 Barreres metabòliques.

Les vies metabòliques d'un individu estan controlades pel contacte cèl·lula a cèl·lula. Les molècules missatgeres secretades han de ser compatibles amb el receptor diana. Aquest concert humoral implica a innumerables molècules de senyalització, essent la majoria d'aquestes proteïnes específiques d'espècie. Ens podem trobar amb diferències importants com en la taxa de metabolisme del fetge. Aquestes incompatibilitats poden ser de diferents tipus, i portar a acúmuls o manca de metabolits:

- Que no es doni la interacció entre molècules o bé que es doni de forma ineficaç, un exemple són les proteïnes reguladores del complement¹⁰⁶. També es dona una incompatibilitat d'aquest tipus amb la trombomodulina que té un paper central en la iniciació de les cascades anticoagulants. En un sistema xenogènic *in vitro* s'ha descrit que la trombomodulina porcina té molt poca afinitat per la trombina humana. Aquesta interacció condueix a una activació de proteïna C de només un 1% respecte a una situació normal en un sistema 100% porcí¹⁰⁷. En relació al metabolisme

renal l'eritropoietina porcina presenta incapacitat d'estimular els precursors sanguinis en la medulla òssia del primat. En un estudi que es va realitzar, per corregir l'anèmia administraven eritropoietina recombinant humana. Un altre exemple és la renina, que controla la pressió arterial. L'alliberen els ronyons quan hi ha baixades de la pressió arterial. Sembla que la renina porcina és incapaç de convertir l'angiotensinògen humà en angiotensina. Això podria significar una fallida a llarg termini d'aquest important sistema de control en el cas del xenotrasplantament renal.

- Les incompatibilitats moleculars poden canviar les condicions sota les quals una reacció té lloc. Això passa amb el factor vWF, que si que interacciona amb el seu receptor, gplb, als òrgans porcins però mentre que en humans ho fa dependent d'un estímul d'estrès, en els òrgans porcins ho fa de forma constitutiva¹⁰⁸.
- Existeixen moltes citocines que no funcionen entre espècies diferents. Un exemple són INF- γ i IL-1 β , que no actuen sobre les cèl·lules endotelials porcines, tot i que aquest exemple en concret beneficia la supervivència de l'empelt.

Les incompatibilitats metabòliques poden presentar-les els enzims i suposar una problemàtica greu. Tots els éssers altament desenvolupats posseeixen numerosos enzims proteolítics que interaccionen de manera específica d'espècie. Un fetge d'un mamífer pot sintetitzar uns 2.500 sistemes enzimàtics¹⁰⁹ que són alliberats majoritàriament com a molècules precursors o proenzims que han de ser activats per altres enzims actius, hormones o pèptids. Degut a la seva especificitat pot ser que no funcionin en un òrgan trasplantat o a l'inrevés, que al haver estat sintetitzades per un òrgan d'una espècie no funcionin a la resta de teixits diana. Es desconeix en quina mesura aquests mecanismes afecten als receptors. De tota manera, estudis realitzats sobre el sistema renina-angiotensina mostren que aquestes cascades enzimàtiques son incompatibles entre espècies. Per tant l'efecte d'enzims estranys sobre la circulació i el metabolisme d'un animal de moment no el podem preveure.

En un estudi realitzat en el nostre grup de recerca, hem vist els canvis que experimenta el perfil lipídic després del xenotrasplantament hepàtic ortotòpic de hàmmster a rata¹¹⁰. En aquest estudi es mostra clarament com el receptor de llarga supervivència adquireix el perfil lipídic del donant, que en aquest model és considerablement diferent. En la combinació utilitzada no s'observen problemes fisiològics però això no descarta que en puguin donar a més llarg termini després del trasplantament o bé en puguin donar en altres combinacions on les diferències entre les espècies siguin més grans; així doncs sabem que els nivells de colesterol en sèrum humà són de 200 mg/dl aproximadament, mentre que en sèrum de porc són de 45 mg/dl, i que els nivells de lipasa i apolipoproteïnes també són substancialment diferents.

Unes altres molècules que no hem de passar per alt són les hormones. L'espectre d'hormones esteroidees sembla igual per a tot els mamífers però es troben a concentracions diferents, i les proteïnes a les que s'uneixen no estan presents a totes les espècies, són molècules de transport específiques¹¹. El cas de les hormones peptídiques és diferent ja que l'espectre d'aquestes és molt variat i podem dir que encara no es coneixen totes ni l'estructura del seu receptor. Un exemple de la complexitat que pot suposar aquest tipus d'hormones és el cas de l'oxitocina i la vasopresina, ambdues hormones tenen 9 aminoàcids, dels quals 5 posicions són idèntiques i a més presenten un grup amida terminal. En canvi, aquestes hormones tenen una acció força diferent.

La forma en que hormones estranyes podrien afectar els xenoempelts a llarg termini podria ser inferida amb la utilització d'animals trangènics.

Veiem que les incompatibilitats metabòliques poden ser moltes i si l'òrgan xenotrasplantat és el fetge encara més ja que és un òrgan on es sintetitzen una quantitat molt important de proteïnes i enzims. Així doncs potser, en el cas d'aquest òrgan, el plantejament del xenotrasplantament haurà de ser diferent i valorar la possibilitat d'estudiar espècies més properes filogenèticament que el porc.

1.2.3 Xenozoonosis.

La infecció dels receptors per microorganismes de l'empelt sempre és una complicació potencial en el trasplantament i aquest risc rutinari podria veure's reduït en el cas del xenotrasplantament. Molts agents poden ser eliminats de l'animal donant amb cures escrupoloses del lloc, el menjar i l'aigua. Però en el xenotrasplantament poden aparèixer agents nous, principalment virus que poden ser transmesos als receptors. Aquest risc és una de les principals preocupacions del xenotrasplantament. No coneixem com eliminar el risc de transmissió de virus que tenen el seu DNA integrat al de les cèl·lules del possible donant, com és el cas dels retrovirus porcins endògens (PERVs). Es té una dilatada experiència utilitzant vàlvules i insulina porcines en el tractament de malalties sense generar complicacions infeccioses; però aquestes són situacions de cèl·lules lliures. Estudis realitzats *in vitro* mostren que els retrovirus porcins poden infectar cèl·lules humanes¹¹. D'altra banda estudis realitzats *in vivo* en 160 pacients que han estat exposats a cèl·lules vives o teixits porcins no han mostrat cap evidència de transmissió de PERVs, així doncs podem pensar que com a mínim seria un efecte estrany o poc freqüent¹².

Un dels avanços més recents ha estat la identificació d'una línia de porcs singènics que sembla que no poden transmetre retrovirus a cèl·lules humanes encara que secreten el virus intacte¹¹³. Si això es converteix en una fallada de la transmissió in vivo significarà l'avanç més important realitzat en la línia dels PERVs.

Hi ha encara un problema de desconeixement ja que no han estat identificats els virus o agents infecciosos i no és conegut si el risc d'infecció entre espècies ha d'anar acompanyada d'un canvi de comportament de l'organisme o de mutacions¹¹³.

Una altra qüestió és si el receptor serà capaç d'erradicar les infeccions intracel·lulars del xenoempelt. Aquest fet pot requerir la interacció directa de les cèl·lules citotòxiques del receptor amb les cèl·lules infectades de l'empelt i donat que les cèl·lules T del receptor interaccionen poc amb les cèl·lules xenogèniques del donant pot ser que sigui un mecanisme poc eficient. Una altra qüestió pot ser que la inducció de la immunotolerància pot fer disminuir la ja de per si limitada capacitat del receptor per eliminar organismes portats per l'empelt.

La pregunta més destacada és si l'agent infecciós pot passar als humans exclusivament a causa del xenotrasplantament o bé també ho pot fer d'altres maneres.

El risc de transmissió d'agents infecciosos associat al xenotrasplantament ha de ser valorat, tant a nivell personal, fent balanç del risc de l'infecció-benefici de la intervenció, com des del punt de vista del risc per a la població de la possible propagació d'un nou agent infecciós.

1.2.4 Aspectes ètics.

Els problemes ètics que planteja el xenotrasplantament estan relacionats amb l'experimentació humana i animal en una societat com la nostra, considerada ètica i culturalment plural i amb una creixent sensibilitat envers els temes ètics i bioètics.

Els aspectes que poden suscitar més problemes des del punt de vista ètic i que s'han de tenir en especial consideració són la sensibilitat de la població envers la utilització d'animals en l'experimentació i sobretot hi juga un paper important el lloc que ocupen aquests animals en l'escala filogenètica i la seva manipulació genètica per al benefici de l'home. D'altra banda pot ser difícil d'entendre per la població el fet de sacrificar un animal per salvar una vida humana, però el que pot suposar una problemàtica real és la manera d'entendre el quimerisme per part del possible receptor d'un xenoempelt i per la gent que

l'envolta, així com la por al desenvolupament de malalties infeccioses que puguin aparèixer. Un altre punt a tenir en compte són els aspectes religiosos, particularment si és el porc, que tot sembla indicar que és l'animal més idoni per al xenotrasplantament clínic. Així doncs poblacions com la musulmana i la jueva, que les seves religions els impedeixen menjar porc, poder ser reticents a aquesta pràctica clínica¹¹⁴.

Dins de les consideracions ètiques també cal fer referència a que el fet de tenir una disponibilitat limitada d'òrgans podria plantejar si seria èticament acceptat dur a terme xenotrasplantaments a malalts mentals, drogoaddictes o bé a pacients d'edat avançada. I una altra qüestió, no menys important, és qui es faria càrrec d'aquests procediments tant costosos¹⁰⁹.

Així doncs és necessari adoptar una extrema cautela i rigor científic, així com una acurada anàlisi ètica, tot determinant els valors que requereixen protecció jurídica.

1.3 FÀRMACS IMMUNOSUPRESSORS.

1.3.1 MMF.

Aquest és un profàrmac de l'àcid micofenòlic, un morfoetil éster de l'àcid micofenòlic, que és un producte de la fermentació de diferents espècies de *Penicillium*. El Micofenolat Mofetil quan s'administra per via oral s'absorbeix ràpidament i intacte en el tub intestinal, un cop arriba al fetge per la hidròlisi del grup éster es converteix en àcid micofenòlic lliure.

L'àcid micofenòlic inhibeix de forma no competitiva, reversible i molt potent l'enzim inosina monofosfat deshidrogenasa (IMDH). Aquest és el principal enzim involucrat en la síntesi *de novo* de les purines; la seva inhibició produeix una depleció dels nucleòtids de guanina. Els limfòcits deplecionats d'aquests nucleòtids es queden aturats a la fase S del cicle cel·lular i no poden proliferar. Per tant, el micofenolat mofetil inhibeix de manera selectiva la proliferació dels limfòcits, ja que els limfòcits depenen més que els altres tipus cel·lulars de la síntesi *de novo* de purines (figura 8).

A més a més de bloquejar la proliferació de limfòcits T i B disminueix la formació de molècules d'adhesió (VLA-4) als limfòcits, fet que causa una disminució al lligant VCAM a les

cèl·lules endotel·lials activades. També inhibeix la síntesi d'anticossos naturals i la resposta proliferativa de fibroblasts i cèl·lules endotel·lials. No inhibeix la producció de IL-1 ni la de IL-2, tampoc evita l'expressió del receptor d'IL-2 ni la síntesi de RNA missatger de la IL-2.

El Micofenolat mofetil utilitzat com a monoteràpia evita l'aparició del rebuig de l'empelt en trasplantaments experimentals d'intestí, fetge, illots pancreàtics, ronyó i cor. Però el seu efecte immunosupressor és més gran quan s'associa a Ciclosporina o Tacrolimus, aquesta associació presenta efectes immunosupressors additius, ja que el micofenolat actua en una fase més tardana del cicle cel·lular i per un mecanisme totalment diferent de la síntesi de les citoquines

1.3.2 Tacrolimus.

Generalitats:

Aquest fàrmac és un macròlid lactona de 822 kilodàltons que s'obté del fong *Streptomyces tsukubaensis*. Té unes propietats immunosupressores similars a les de la ciclosporina, però és aproximadament 100 cops més potent. En humans es pot administrar per via intravenosa i per via oral.

El seu mecanisme d'acció fa que sigui un fàrmac específic de limfòcits T, que bloqueja la divisió calci dependent de les cèl·lules T entre la fase de repòs (G0) i la fase d'activació (G1) del cicle cel·lular.

El Tacrolimus actua com un profàrmac que s'activa quan s'uneix al seu receptor intracel·lular. S'uneix a una immunofilina que anomenem FKBP (de l'anglès *FK binding protein*), aquest complex s'uneix a la calcineurina, fosfatasa dependent de calci i calmodulina. La calcineurina és un pas limitant per a la transducció de senyals cap al nucli. La calcineurina és necessària per defosforilar el factor de transcripció de la IL-2 (NF-AT). El NF-AT defosforilat pot entrar en el nucli i activa el gen de la IL-2 en els limfòcits T activats. Els complexos FK506-FKBP s'uneixen a la calcineurina i inhibeixen l'entrada del factor de transcripció NF-AT (figura 9).

Figura 8: Via que utilitza el fàrmac inhibidor de la calcineurina Tacrolimus.

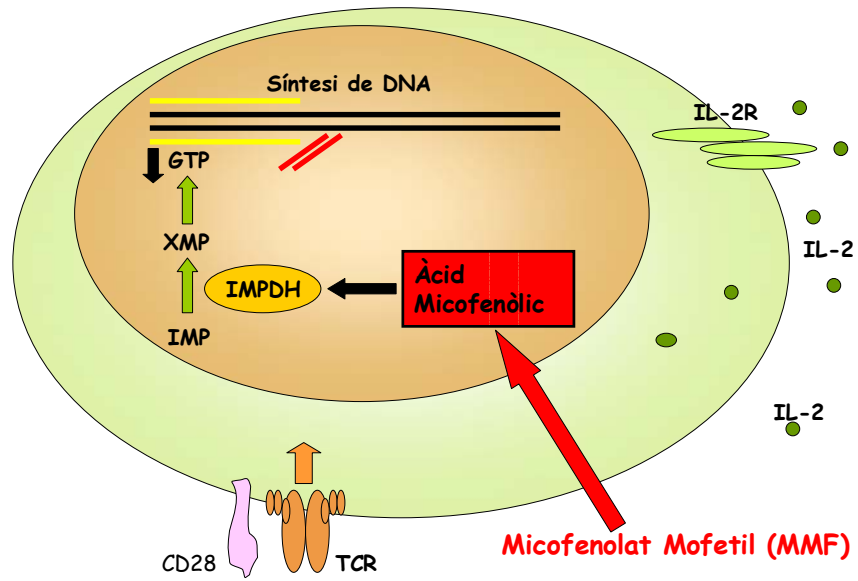
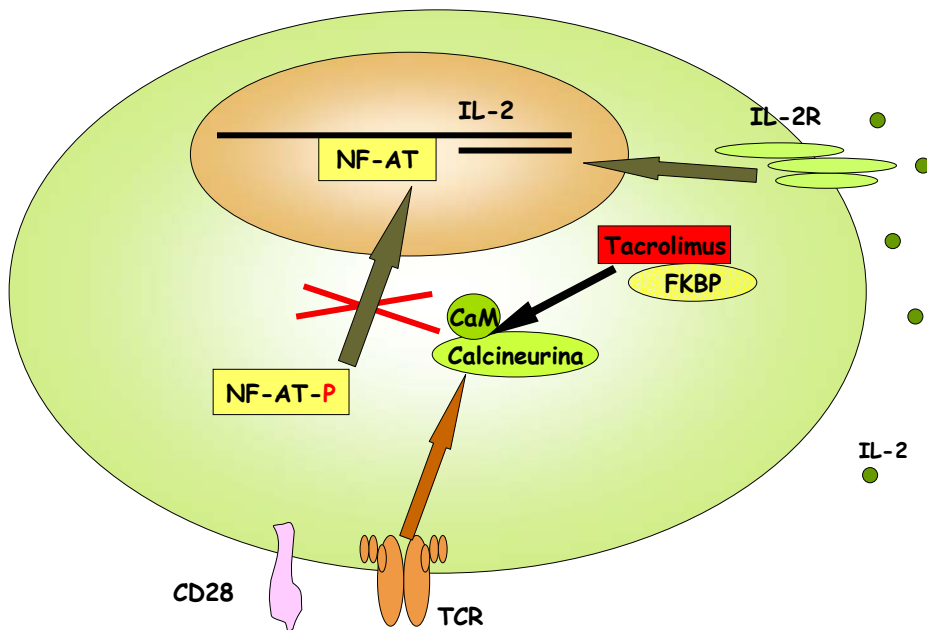


Figura 9: Via que utilitza l'àcid Micofenolat Mofetil.



1.4 TRASPLANTAMENT HEPÀTIC.

1.4.1 El fetge: generalitats.

És sabut que el fetge és una finestra per la qual un pot mirar moltes de les funcions del cos. Per conèixer i entendre les funcions d'aquest òrgan s'ha de saber molt de fisiologia i de malalties. La fallada del fetge implica alteracions a moltes altres funcions fisiològiques i per tant està estretament relacionat amb el correcte funcionament dels altres òrgans.

El fetge és l'òrgan sòlid més gran del cos, constitueix aproximadament entre el 2% i el 5% del pes d'un adult i el 5% en un noutat. L'òrgan es diferencia en sectors i segments amb aportació sanguínia aferent i eferent i canals biliars, sense circulació colateral entre els segments. Aquesta organització estructural li permet realitzar la funció de "guàrdia" entre l'aparell digestiu i la melsa i la resta de l'organisme. Aquest paper el fa gràcies a la doble aportació sanguínia que rep, d'una banda li arriba la sang de la vena porta i per l'altra té la seva pròpia vascularització per l'artèria hepàtica.

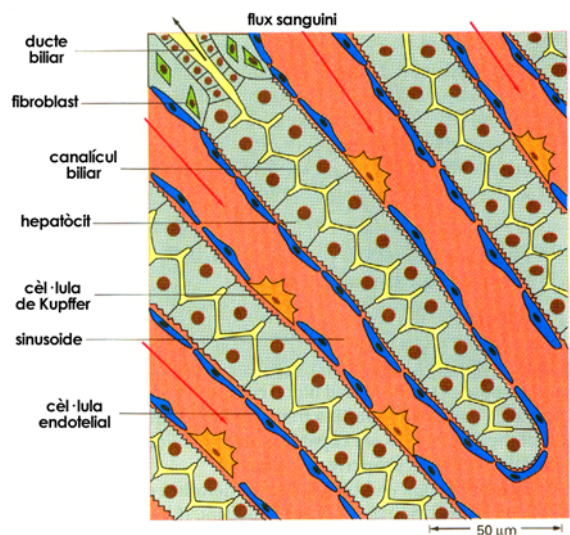
La principal funció del fetge és captar aminoàcids, carbohidrats, lípids i vitamines, el seu emmagatzemament, conversió metabòlica i alliberament a la sang i a la bilis. Igual d'important és la transformació que es realitza en aquest òrgan, el qual converteix substàncies hidrofòbiques en derivats seus solubles en aigua i que així poden ser excretats a la bilis o a l'orina. Encara que la biotransformació també tingui lloc en altres òrgans com el ronyó o l'intestí, el fetge en realitza la major part. Podem interpretar-ho com que és l'òrgan "més capitalista" del cos. Per la seva gran quantitat de funcions metabòliques i secretores. També té una funció de defensa contra macromolècules externes i partícules com bacteris, les cèl·lules del llit de capil·lars hepàtics és el lloc idoni per a la fagocitosis de material particulat. A més a més l'estructura de gran capacitat vascular del fetge fa que serveixi com a reservori en la regulació del volum sanguini i del flux corporal.

A nivell metabòlic podem dir que el fetge és un òrgan clau en les funcions següents:

- Proporcionar i regular l'aportació energètica de l'organisme.
- Proporcionar els components essencials pel creixement i per viure: biosíntesi i catabolisme.
- Metabolisme de ions inorgànics com el ferro.
- Té un paper clau en l'eliminació d'elements residuals.

Histològicament podem dir que: els hepatòcits s'organitzen en làmines plegades de cara a espais plens de sang que s'anomenen sinusoides. La sang es separa de la superfície dels hepatòcits per una monocapa de cèl·lules endotelials aplanades que cobreixen les làmines d'hepatòcits i on entremig de les quals es troben algunes cèl·lules de Kupffer. Aquesta estructura facilita les funcions del fetge en les quals és molt important l'intercanvi de metabòlits entre el fetge i la sang. Al costat de l'intercanvi de materials amb la sang, els hepatòcits formen un sistema de canaliculs biliars als quals secreten la bilis i que acaben aportant-la a l'intestí mitjançant els conductes biliars¹⁵(figura 10).

Figura 10: Estructura dels sinusoides hepàtics¹⁶.



El fetge juga un paper central en proporcionar fonts d'energia als teixits perifèrics¹⁷. El centre d'aquest procés és la regulació homeostàtica dels nivells de glucosa en la sang perifèrica, particularment durant el dejuni. En aquest òrgan hi té lloc la gluconeogènesi i l'emmagatzemament de glicògen i aminoàcids dels teixits musculars que aporten substàncies essencials per a aquests processos. El metabolisme dels lípids i de les proteïnes és mantenen per interconnexions molt properes pels seus magatzems al múscul i altres teixits perifèrics. Quan el fetge no funciona correctament es desenvolupa un estat catabòlic.

La relació del fetge amb el sistema nerviós central és deguda a que aquest no pot funcionar si el fetge no es capaç de mantenir els nivells de glucosa. A més a més alteracions de la funció cerebral s'associen a malalties hepàtiques cròniques degut al paper que aquest

té en la "detoxificació" dels grups NH_3 resultants, principalment, del metabolisme de les proteïnes.

Els òrgans endocrins també estan molt lligats a la funció hepàtica ja que els estrògens i andrògens són metabolitzats al fetge, i per tant participa en la regulació de la seva funció biològica.

El fetge juga un paper clau en la regulació de la cascada de la coagulació, sintetitzant tots els factors de la coagulació i regulant els seus nivells plasmàtics. Així doncs processos hemorràgics sovint estan associats a una fallada hepàtica.

Durant el desenvolupament fetal el fetge té funcions hematopoiètiques i, tot i que en la vida adulta aquesta funció la té la medul·la òssia, la gran quantitat de cèl·lules de Kupffer que es troben als sinusoides hepàtics tenen la funció d'alliberar mediadors inflamatoris que a la vegada regulen la funció hepàtica. Sovint les disfuncions hepàtiques s'associen a alteracions hematopoiètiques com a resultat del seu paper tant en els efectes metabòlics de la maduració dels elements formats en la medul·la òssia com en la fagocitosis de cèl·lules sanguínies en la melsa a conseqüència de la hipertensió portal i esplenomegàlia.

També està relacionat amb el funcionament del ronyó, ja que l'angiotensinogen, precursor de la renina que és un important regulador del flux sanguini renal, és sintetitzat al fetge. Té un paper excretor i és important en la regulació del pH per a la utilització de bicarbonat per a la síntesi d'urea. Així doncs una fallada hepàtica va seguida d'una fallada renal.

El fetge també és necessari per a la formació dels ossos ja que la vitamina D necessària per a la matriu òssia és hidroxilada al fetge, excretada a la bilis i després es reabsorbeix. L'absorció de calci també necessita una secreció normal de bilis que li permet solubilitzar-se dels greixos de la dieta.

Finalment, el fetge també influeix en el funcionament del sistema immunitari. La gran quantitat de macròfags (cèl·lules de Kupffer) presents al fetge, no només treu els bacteris de la circulació portal sinó que també actua com a sistema presentador d'antígens per facilitar la resposta immunològica. Quan no hi ha una correcta funció hepàtica la circulació portal és parcialment desviada a la circulació sistèmica i organismes aliens, toxines i proteïnes escapen a la vigilància immunològica i desafien la resposta immunològica als nòduls limfàtics perifèrics i a altres teixits.

1.4.2 Trasplantament hepàtic clínic.

El trasplantament de fetge el podríem definir com la extirpació del fetge malalt del pacient i la seva substitució, en la mateixa localització anatòmica, per un altre de sa procedent d'un donant cadàver o d'un donant viu¹¹⁸.

El primer trasplantament de fetge amb èxit es va realitzar el 1963 pel cirurgià Thomas Starzl. Durant els primers anys es realitzava de forma esporàdica i només en tres centres. Es considerava un procediment experimental, indicat clínicament en pacients terminals, ja que tenia una taxa de supervivència a l'any inferior al 30%. A partir de l'any 1980, coincidint amb la introducció de la ciclosporina, els resultats van millorar, aconseguint-se taxes de supervivència superiors al 70%, a l'any del trasplantament.

Actualment la tècnica ha avançat molt, les indicacions i contraindicacions estan definides i la taxa de supervivència ha incrementat molt. A Catalunya, tenint en compte tots els trasplantaments realitzats des de l'inici del programa l'any 1984 fins el 2001, es parla d'una supervivència als 5 anys de 67% i d'un 56% als 10 anys. La taxa de supervivència als 5 anys actualment és del 73%. Conseqüència dels bons resultats del trasplantament hepàtic i de l'avanç en la recerca mèdica, de la conscienciació social i la bona tasca de coordinació que han augmentat les donacions (figures 11 i 12). Malgrat tot han incrementat les indicacions de trasplantament i s'ha generat una diferència més gran entre la quantitat de pacients en llista d'espera i els òrgans disponibles (figura 13). Malgrat els bons resultats, els esforços encara no són suficients (figura 14).

El nombre dels receptors potencials està incrementant per diverses raons:

- Hi ha un millor coneixement dels beneficis del trasplantament hepàtic i per tant més pacients són valorats per a ser tributaris d'un trasplantament hepàtic.
- Les tècniques quirúrgiques i d'anestèsia han millorat fet que complicacions que abans eren una contraindicació per al trasplantament han deixat de ser-ho, per exemple la trombosi de la vena porta o la síndrome hepatopulmonar.
- Els bons resultats obtinguts fins al moment fan que incrementi el rang d'edats en que es pot indicar un trasplantament, cada cop es realitzen trasplantaments en pacients pediàtrics més petits i en pacients d'edat més avançada.

Figura 11: mostra el nombre total anual de donants i de trasplantaments a tot el territori espanyol:

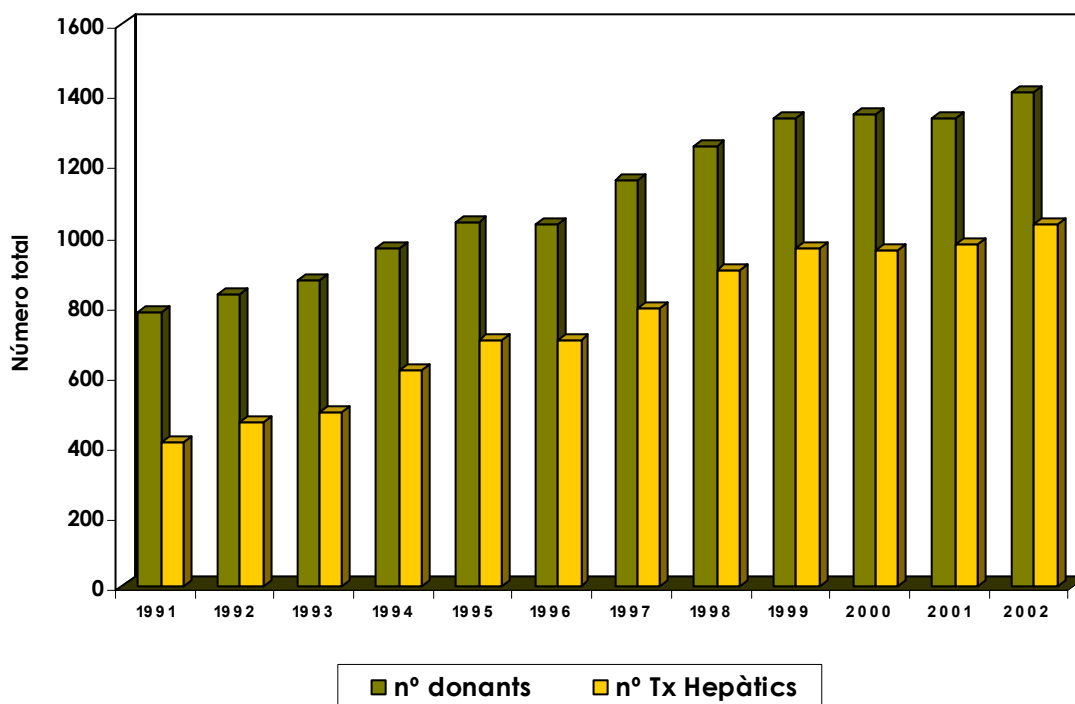


Figura 12: Mostra el nombre de donants i de trasplantaments per milió de població a diferents països d'arreu del món.

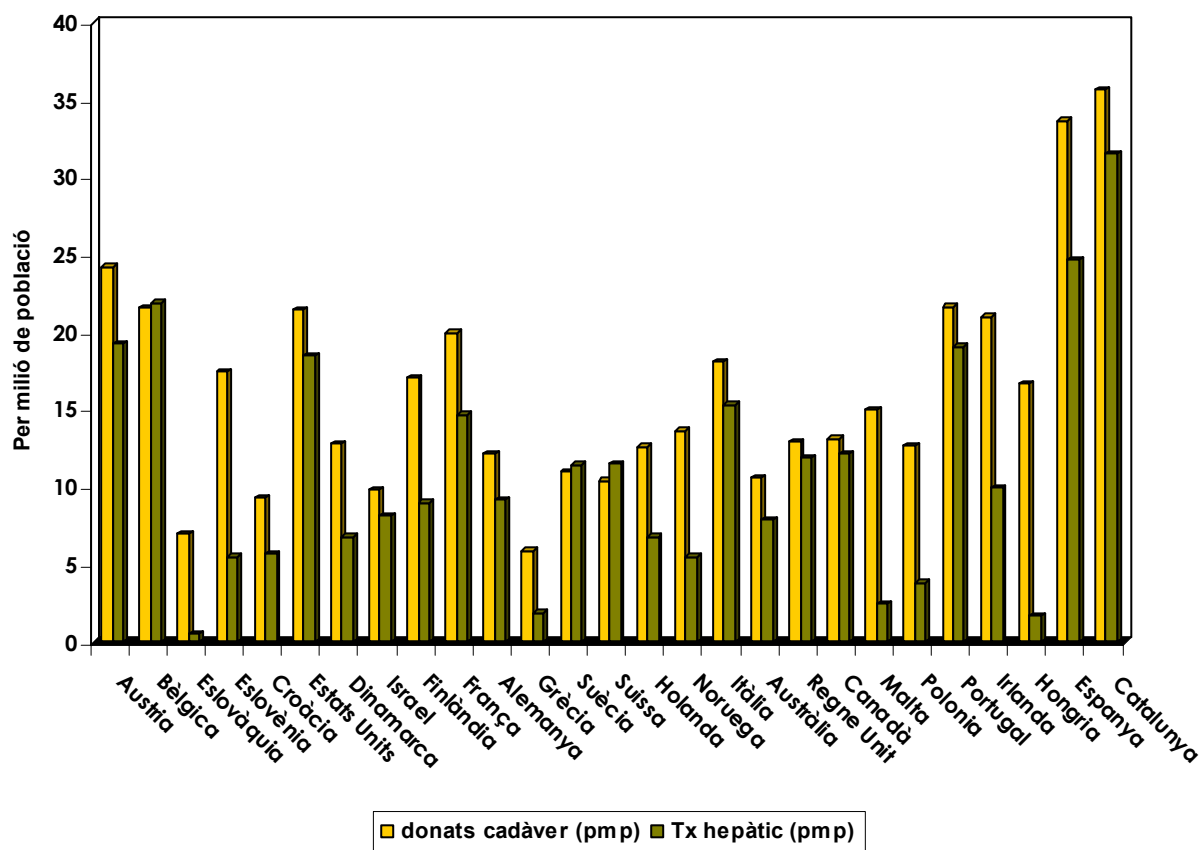


Figura 13: Mostra l'evolució de la llista d'espera, amb números totals, a l'estat espanyol durant la última dècada.

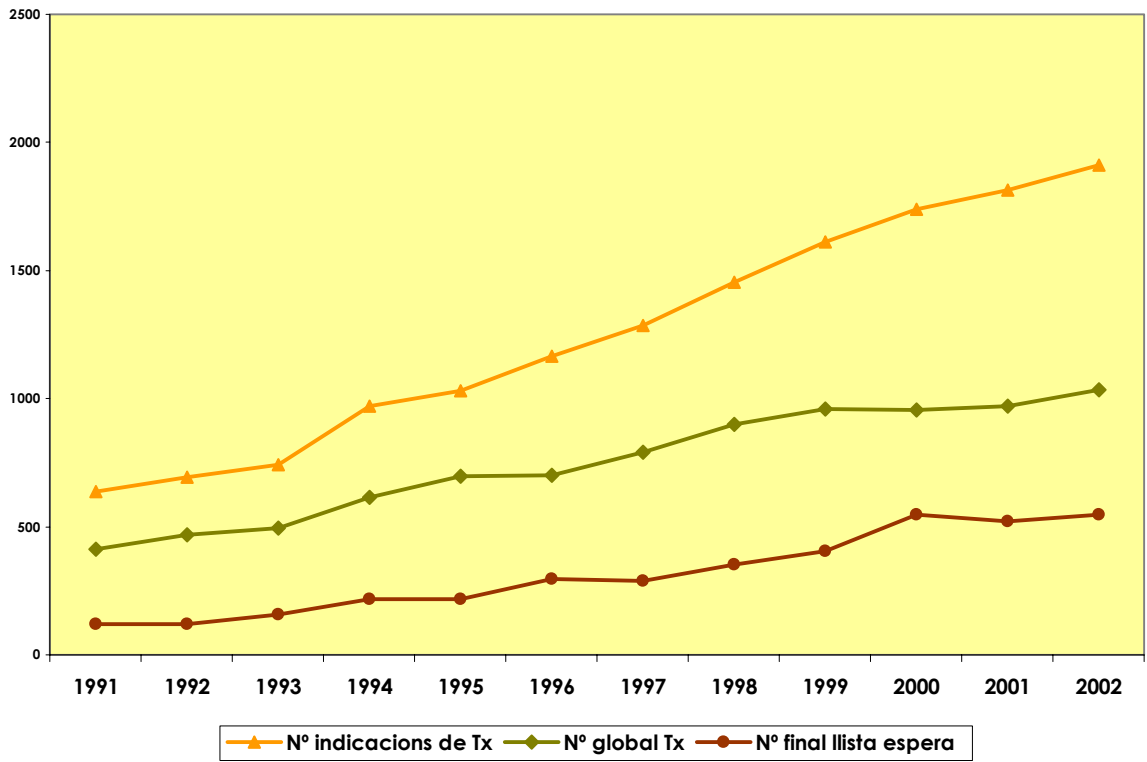
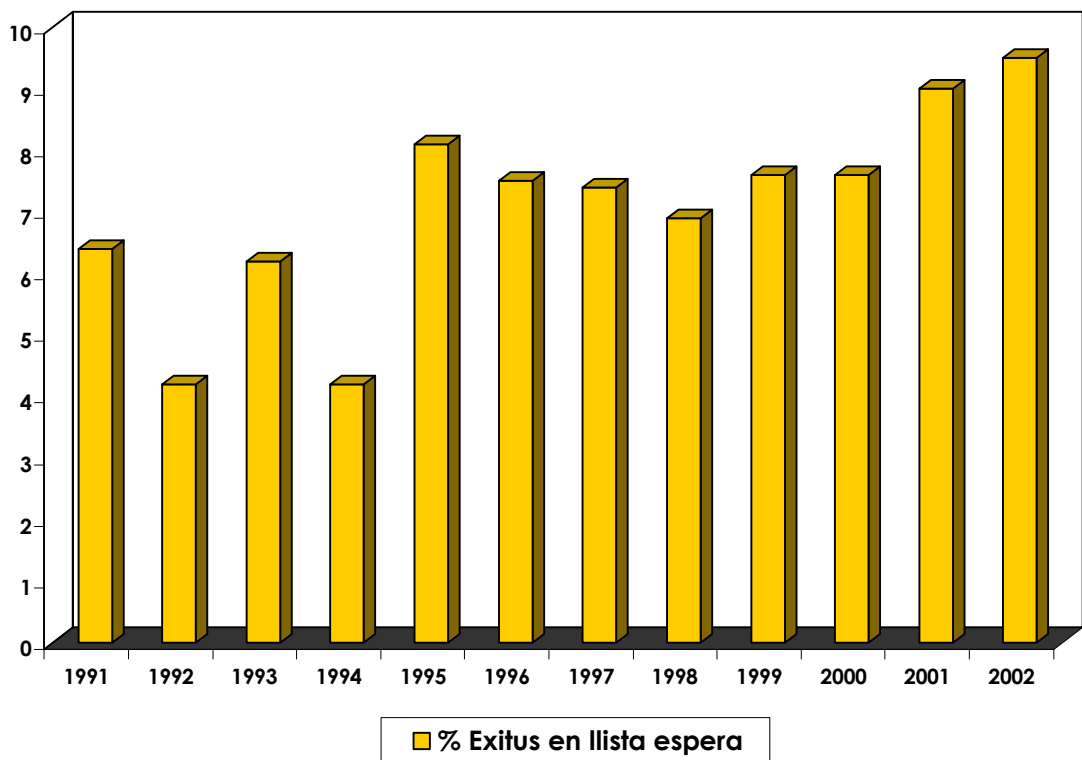


Figura 14: Reflecteix el % de mortalitat que es dona en llista d'espera.



Per tal de reduir les llistes d'espera i poder augmentar el nombre de tributaris d'un trasplantament hepàtic s'estan desenvolupant noves tècniques:

Tècnica de *Splitting livers*.

Consisteix en dividir el fetge perquè receptors més petits puguin rebre empelts de donants més grans. En alguns casos es pot utilitzar per a dos trasplantaments, un pediàtric, que rep el lòbul esquerre i un adult que rep el lòbul dret. Aquesta tècnica s'està utilitzant cada cop més en pediatria amb molt bons resultats. Actualment alguns centres estan estudiant la possibilitat d'utilitzar-la en adults però requereix un gran esforç per posar en marxa aquest programa ja que es necessiten professionals amb experiència i molt domini de la tècnica per a la divisió del fetge amb èxit, a més a més dos equips de trasplantament simultàniament.

Trasplantament de fetge en domino.

En algunes situacions poc comuns com la Polineuropatia amiloidòtica familiar, el fetge té un defecte metabòlic però és estructuralment i funcionalment normal. En aquesta situació el que es fa és trasplantar l'explant a un receptor d'edat més avançada o en una situació límit. L'experiència fins al moment mostra que és un procediment segur pel receptor tot i que encara manca experiència a més llarg termini.

Trasplantament de donant viu.

És, potser, el salt més gran que s'ha fet recentment en el trasplantament de fetge. Es veu com una solució a l'escassetat de donants. Els principals avantatges que presenta és que la cirurgia és pot fer de forma programada i quan el receptor està relativament en bon estat, abans no comencin complicacions com infeccions o edema cerebral i implica temps d'isquèmia de l'empelt més curts, fet que pot suposar una millor recuperació de la funció hepàtica de l'empelt.

Al voltant d'aquesta pràctica es mantenen moltes consideracions ètiques i morals. La intervenció del donant no es realitza exempta de risc i s'ha de pensar que no és pel benefici físic del pacient. En un estudi retrospectiu de 100 intervencions consecutives realitzat per Grewel et al.¹¹⁹ descriu que 13 pacients pateixen complicacions greus, en cinc casos per fístules a la via biliar, i complicacions lleus en 20. Cal destacar que amb una major experiència les complicacions també disminueixen. Fins al moment han estat descrites dues morts de donants.

Trasplantament d'hepatòcits.

Pot ser una solució per aquelles malalties metabòliques en que el fetge és estructuralment normal i la suplementació de la massa cel·lular defectiva amb un nombre adequat de cèl·lules solucionaria aquesta deficiència. Un exemple és l'experiment que es va realitzar amb conills Watanabe¹²⁰, un bon model de la hipercolesterolèmia familiar monogènica, malaltia causada per un defecte en els receptors de LDL. Les conseqüències d'aquesta deficiència és un increment de colesterol en sang i el desenvolupament d'arterioscleròsi. Del trasplantament d'hepatòcits mitjançant infusió portal en va resultar la reducció d'un 40% els nivells de colesterol en sèrum. Aquest fet pot ser indicatiu d'una interacció correcta entre les apolipoproteïnes B100 de les LDL dels conills i els receptors de LDL xenogènics. L'inconvenient d'aquest tractament és que els receptors haurien de rebre immunosupressió de forma continuada.

Així doncs els avenços en el camp de la teràpia gènica poden ser molt importants ja que aplicada als hepatòcits trasplantats pot substituir l'enzim perdut o inactiu, inactivar un gen inductor o sobreexpressar un gen normal.

Aquesta tècnica també podria aplicar-se en cas de fallada hepàtica, on no hi ha prou massa hepàtica funcionant, o bé després d'una resecció hepàtica.

Organogènesi.

És aquell procés, encara molt embrionari, de formació d'òrgans *de novo* a partir de cèl·lules primitives, teixits o *stem cells*. Si aquest procés podrà arribar a ser factible i produir òrgans fisiològicament competents encara no està clar. De mesènquima primitiu en cultiu s'ha pogut fer créixer teixit metanefrític de ronyó de ratolí^{121,122}. Però a les nefrones d'aquests òrgans els manca els vasos sanguinis necessaris per a la seva funció i *in vitro* només poden créixer fins a uns mil·límetres¹²². Per solucionar aquests problemes s'ha de realitzar el procés d'organogènesi *in vivo*. Hammerman ha descrit que ronyons fetals trasplantats a la càpsula renal de ratolins poden vascularitzar-se i realitzar algunes funcions¹²³. Si les capacitats tècniques permeten que l'organogènesi existeixi en humans, el procés podria durar mesos o bé anys, i per tant una mesura temporal, com pot ser el xenotrasplantament pot ser necessària per als òrgans vitals.

El procediment de trasplantament hepàtic actual està donant molt bons resultats i la supervivència ha incrementat molt. Aquest fet ha portat a que ara els clínics es trobin davant de problemes associats al trasplantament però a llarg termini. La susceptibilitat a infeccions i l'increment dels pacients que desenvolupen processos de malignitat, són alguns problemes als

que s'han d'enfrontar. Però els principals problemes amb els que es troben els clínics són la prevenció i el tractament de les malalties recurrents i els problemes renals derivats de l'administració ininterrompuda d'inhibidors de la calcineurina, fàrmacs que tenen com a efecte secundari el dany renal. El 80% dels pacients trasplantats de llarga supervivència pateixen disfunció renal i part d'aquests necessiten un trasplantament renal. Per aquest motiu el principal objectiu en el trasplantament hepàtic clínic és poder induir tolerància dels empelts i poder retirar la immunosupressió. Sembla que a un de cada sis pacients se li podria retirar la immunosupressió de manera segura però manquen les eines necessàries per poder-los identificar.

1.4.3 Immunologia del trasplantament hepàtic.

L'experiència clínica del trasplantament hepàtic ha anat avançant paral·lelament al coneixement de la immunologia del rebuig de l'empelt. S'ha fet evident que el fetge posseeix unes característiques úniques respecte a la supervivència d'aquest com a empelt. En moltes espècies, incloent els humans, les reaccions de rebuig en contra d'aquest òrgan són considerablement més dèbils que les que es donen en altres òrgans.

El rebuig humoral en empelts hepàtics no és freqüent, fins i tot quan es realitzen entre donants i receptors de diferents grups sanguinis¹²⁴, fet que ens porta a pensar que el fetge és un òrgan relativament resistent al rebuig mitjançat per anticossos. Encara no s'ha esbrinat del tot el que duu el fetge a tenir aquesta resistència¹²⁵, però és un òrgan amb algunes peculiaritats anatomohistològiques que pot ser que hi juguin un paper destacat. La microcirculació del fetge és diferent a la dels altres òrgans, enlloc de tenir artèries "finals" reals, està constituïda per sinusoides, aquests són fenestrats i no tenen làmina basal. Una altra particularitat és la doble aportació sanguínia, per la vena porta i per l'artèria hepàtica. Així doncs si una de les vies es veu compromesa l'altra pot incrementar el flux sanguini. Encara no és conegut el mecanisme que regula aquesta característica. El fet de que sigui un òrgan gran li dóna resistència quan és danyat. La seva mida sembla que també pot relacionar-se amb la capacitat dels empelts hepàtics per neutralitzar els anticossos citotòxics ja que pot ser que sigui alliberant gran quantitat d'antígens MHC o bé per una absorció massiva d'anticossos. Gugenheim et al.¹²⁶ descriuen una absorció específica d'anticossos limfocitotòxics per part del fetge. Una de les possibles explicacions teòriques que recolzen aquest fet és que l'alliberament d'antígens MHC de classe I a la circulació per part de les cèl·lules parenquimàtiques, produeix que els anticossos limfocitotòxics s'uneixin a aquests antígens i així eviten els seus efectes destructors¹²⁷. D'altra banda els sinusoides hepàtics estan recoberts per un elevat nombre de

macròfags, cèl·lules de Kupffer, els quals tenen una gran capacitat d'unir-se als anticossos preformats o als immunocomplexes. A més a més les cèl·lules del donant revestides d'anticossos s'uneixen ràpidament a les cèl·lules de Kupffer i aquestes són eliminades. Això pot permetre la selecció de "leucòcits passatgers", així es disminueix la immunogenicitat dels empelts hepàtics¹²⁸. D'altra banda, el bloqueig de les cèl·lules de Kupffer porta a una disminució de les propietats protectores dels empelts hepàtics¹²⁶.

1.4.4 Models experimentals en trasplantament.

Els models experimentals han estat molt importants per tal de poder posar a punt els coneixements necessaris perquè el trasplantament d'òrgans sigui avui dia una realitat clínica. El desenvolupament de tècniques quirúrgiques per tal de dur a terme trasplantaments en rosegadors ha servit per poder conèixer millor el sistema principal d'histocompatibilitat (MHC) i entendre la resposta immunològica d'un organisme enfront d'un empelt d'espècie diferent. En el cas concret del trasplantament de fetge, els models en rosegadors han permès examinar detalladament els esdeveniments immunològics que sembla que són específics d'aquest òrgan.

Un dels avantatges que suposa poder realitzar models de trasplantament en rosegadors és la disponibilitat d'animals isogènics, amb la mateixa informació genètica, que redueixin la variabilitat de resposta. A més a més hi ha diversitat de soques fet que permet induir diferents tipus de rebuig que el seu estudi ens pot aportar una valuosa informació des del punt de vista immunològic. Així doncs amb la combinació d'aquestes soques podem tenir el rebuig de l'empelt hepàtic als pocs dies de la intervenció o bé després de setmanes o bé podem tenir una acceptació total de l'òrgan a llarg termini.

Un altre aspecte on els models en rosegadors han estat molt útils és l'estudi i desenvolupament de fàrmacs immunosupressors i de solucions de preservació.

El primer en establir la tècnica de trasplantament hepàtic en rata va ser S. Lee¹²⁹ l'any 1966 utilitzant el mètode de trasplantament heterotòpic en el qual tant l'òrgan donant com el receptor eren subjectes a una hepatectomia del 70%. Korto et al.¹³⁰ i Hess et al.¹³¹ van descriure modificacions d'aquest model de trasplantament heterotòpic. Els primers en descriure el model de trasplantament hepàtic ortotòpic van ser S. Lee et al.¹³² l'any 1973 utilitzant un *shunt* extracorpori. Dos anys més tard van descriure el mateix model però sense la utilització del *shunt*¹³² i la vena porta era anastomosada *end-to-end* utilitzant sutura continua, i

el ducte biliar era implantat directament al duodè del receptor. Aquest model modificat per Zimmermann et al.¹³³ i per Kamada i Calne¹³⁴, en els dos models la via biliar era anastomosada *end-to-end* amb un tutor en el primer i amb dos tutors en el segon.

En models d'animals superiors l'aportació sanguínia de la vena cava inferior i de la vena porta a la vena cava superior durant la fase anepàtica era imprescindible però en el model amb rata si la fase anhepàtica era inferior a 26 minuts no era necessari el *shunt*, però era extraordinàriament difícil de realitzar l'anastomosi de la vena porta en aquest temps o controlar els *shunt* i sovint era la causa de la fallada hepàtica. La introducció per Kamada et al. de la tècnica del *cuff* per substituir l'anastomosi de la vena porta va suposar l'eliminació de la principal complicació. Així doncs aquesta tècnica amb algunes modificacions ha quedat com a model per al trasplantament hepàtic ortotòpic en rata.

Aquest model no contempla la rearterialització de l'òrgan i la majoria de grups no ho fan però alguns autors ho proposen, K. Ulrichs et al.¹³⁵ o E. Ramos¹³⁶, per tal d'aconseguir un model més fisiològic.

Els models amb rosegadors també s'han utilitzat en xenotrasplantament⁶⁸. Els més utilitzats són el hámster-rata com a model concordant, el de ratolí a rata i en el cas del trasplantament de ronyó també s'han fet trasplantaments de llebre a conill. Com a model discordant més utilitzat és el de conill perquè a rata. La tècnica quirúrgica que s'utilitza és la de Kamada et al amb alguna modificació.

1.4.5 Xenotrasplantament hepàtic.

El xenotrasplantament, fins al moment, no s'ha pogut plantejar com una possible aplicació a nivell clínic. Les dificultats sorgides en els intents que fins ara s'han dut a terme són prou importants per no portar-lo a la clínica tot i que els especialistes no les consideren insalvables.

L'experiència en xenotrasplantament hepàtic, degut a la seva complexitat, a nivell clínic és força reduïda, amb òrgans com el ronyó l'experiència és lleugerament superior (figura 15).

Figura 15: Recull les diferents experiències clíniques en xenotrasplantament amb diferents òrgans.
On "h" és trasplantament heterotòpic i "p" perfusió.

Experiència clínica en xenotrasplantament					
Any	Cirurgia	Donant	Òrgan	nº	Supervivència
1906	Jaboulay	porc	ronyó (h)	1	3 dies
1906	Jaboulay	cabra	ronyó (h)	1	3 dies
1909	Unger	humà	ronyó	1	18 hores
1909	Unger	macac	ronyó (h)	1	3 dies
1910	Unger	cabra	ronyó (h)	1	3 dies
1923	Neuhof	ovella	ronyó (h)	1	9 dies
1964	Reemtsma	ximpancé	ronyó	12	< 9 mesos
1964	Reemtsma	simi	ronyó	1	10 dies
1964	Hitchcock	babuí	ronyó	1	5 dies
1964	Starzl	babuí	ronyó	6	< 2 mesos
1964	Hume	ximpancé	ronyó	1	1 dia
1964	Traeger	ximpancé	ronyó	3	2 mesos
1965	Goldsmith	ximpancé	ronyó	2	4 mesos
1966	Cortesini	ximpancé	ronyó	1	1 mes
1964	Hardy	ximpancé	cor	1	2 hores
1968	Cooley	ovella	cor	1	minuts
1968	Ross	porc	cor (h)	1	minuts
1968	Ross	porc	cor (p)	1	minuts
1969	Marion	ximpancé	cor	1	minuts
1977	Barnard	babuí	cor (h)	1	5 hores
1977	Barnard	ximpancé	cor (h)	1	4 dies
1984	Bailey	babuí	cor	1	20 dies
1992	Religa	porc	cor	1	24 hores
1966	Starzl	ximpancé	fetge	1	9 dies
1969	Starzl	ximpancé	fetge	1	1 dia
1974	Starzl	ximpancé	fetge	1	14 dies
1992	Starzl	babuí	fetge	1	70 dies
1992	Starzl	babuí	fetge	1	26 dies
1993	Makowka	porc	fetge (h)	1	30 hores

Els primers xenotrasplantaments hepàtics es van realitzar a la segona meitat dels anys seixanta de la ma del cirurgià T. Starzl. Van utilitzar ximpanzés com a donants i van aconseguir supervivències de 1 i 9 dies. L'any 1974 el mateix equip en va realitzar un altre amb la mateixa espècie donant, i aquest cop la supervivència va ser de 14 dies.

Després d'aquests intents hi va haver un període durant el qual el xenotrasplantament es va deixar una mica de banda degut als bons resultats de l'al·lotrasplantament i a que es van poder reduir les llistes d'espera, ja que a partir del moment en que es va aprovar el reconeixement de la mort cerebral, es va incrementar notablement la disponibilitat d'òrgans. Com a contrapartida a aquest èxit en va resultar una nova escassetat d'òrgans que va revifar l'interès pel xenotrasplantament. Els anys 1992 i 1993, l'equip del Dr. T. Starzl van realitzar nous intents de xenotrasplantament, aquest cop els donants eren babuïns. Amb aquests anys la immunosupressió havia avançat i això va suposar que s'aconseguissin supervivències més llargues. En el primer d'aquest dos casos el pacient va viure 70 dies i en el segon 26⁸. La causa de la mort va ser per infeccions a diferència del que es pensava *a priori*. Possiblement l'alta

immunosupressió administrada va ser el causant d'aquestes infeccions. L'anàlisi de l'empelt mostrava molt pocs símptomes de rebuig, però no s'ha d'oblidar que els dos pacients van presentar disfunció renal. El fet més inquietant era que l'empelt hepàtic no proporcionava una funció adequada. El misteri era la disparitat entre els pocs signes de rebuig que presentava l'empelt, el qual era molt encoratjador, i el descoratjador i inesperat eren les deficiències funcionals d'aquests empelts, aquests fets suggereixen un control incomplet del rebuig dels xenoempelts. La impressió que el Dr. Starzl diu que en treu d'aquestes dues experiències és que la barrera del xenoempelt és més vulnerable del que molta gent es pensa.

Com ja hem comentat anteriorment el fetge és un òrgan d'una gran complexitat per la seva participació en múltiples funcions de l'organisme. Aquest fet, sovint, ha fet dubtar de la possibilitat de que el xenotrasplantament hepàtic pugui arribar a ser una realitat clínica. Per aquest motiu diversos grups de recerca han pensat en la possibilitat del xenotrasplantament hepàtic com a "òrgan pont", en una solució temporal en pacients amb una fallada hepàtica que necessiten algun tipus de suport per poder esperar la disponibilitat d'un òrgan humà. Ye et al.¹³⁷ van realitzar estudis "d'òrgan pont" entre diferents espècies animals per tal de conèixer si el fet de realitzar un primer trasplantament amb una altra espècie predisposava al receptor a rebutjar al que havia de ser l'òrgan definitiu. Els seus resultats, que no coincideixen amb altres anteriors que hi ha a la literatura^{138,139}, van ser que la utilització d'un òrgan com a suport metabòlic durant un període de temps variable no predisposava al rebuig del següent òrgan trasplantat.

L'any 1993 l'equip del cirurgià Makowka¹⁴⁰ va realitzar un xenotrasplantament hepàtic heterotòpic a una pacient amb hepatitis fulminant amb la intenció d'aportar-li recolzament metabòlic temporal fins al moment de poder realitzar un trasplantament d'un donant humà. Aquest empelt heterotòpic era de porc. Abans de realitzar el trasplantament es van eliminar de la circulació sanguínia els anticossos naturals preformats amb la tècnica de plasmaferesi i la perfusió *ex vivo* de ronyons de porc. Es va aconseguir treure més del 90% dels xenoanticossos circulants, malgrat tot els nivells d'anticossos van tornar a augmentar ràpidament i es van associar al rebuig mitjançat per anticossos i complement de l'òrgan donant. La pacient va morir a les 34 hores del xenotrasplantament heterotòpic per un dany cerebral irreversible.

La informació d'aquest cas va ser important per renovar l'interès que pot tenir el xenotrasplantament hepàtic com a "òrgan pont".

Després de 5 anys, l'any 1998, es van realitzar dos intents més de xenotrasplantament hepàtic com a òrgan pont¹⁴¹. En aquests intents van posar a punt un sistema de perfusió extracorporea amb un fetge de porc transgènic pels gens humans CD55 (hDAF) i CD59. No van utilitzar cap sistema per eliminar els xenoanticossos circulants. El temps que va ser necessari utilitzar aquest sistema extracorpori va ser més reduït que en l'intent anterior, 6,5

hores en un dels intents i 10 hores en l'altre. Els dos intents van tenir èxit i ambdós pacients, afectes d'hepatitis fulminant, van poder rebre un empelt humà. Així doncs aquests dos casos han donat una nova alenada d'esperança per a poder utilitzar aquest sistema d'òrgan pont.

Xenotrasplantament hepàtic hámster-rata.

La combinació hámster-rata ha estat àmpliament utilitzada en el camp del xenotrasplantament ja que és un model *in vivo*, fàcil de treballar-hi ja que són animals petits i dels que és té molta informació ja que s'han estat utilitzant durant molt de temps en molts tipus d'estudis diferents. El tipus de trasplantament més utilitzat ha estat el trasplantament cardíac heterotòpic, ja que és un model assequible quirúrgicament, amb característiques de rebuig humoral i de fàcil seguiment. Amb aquest model autors com N Murase¹⁴², HN Sankary¹⁴³ AS Chong¹⁴⁴ o F Xiao¹⁴⁵ entre altres han realitzat estudis de fàrmacs immunosupressors on s'han estudiat les seves propietats administrats com a monoteràpia o bé en combinació amb altres fàrmacs amb mecanismes d'acció diferents (anticalcineurínics i antiproliferatius). Potser en els estudis on aquest model ha tingut més importància és en coneixement del sistema immunitari i en els processos que aquest pot desenvolupar davant d'un òrgan d'una espècie diferent. Així doncs conceptes com tolerància¹⁴⁶, acomodació ^{147,148}, el coneixement de les diferents subpoblacions limfocitàries així com el seu comportament ¹⁴⁸ i un millor coneixement del rebuig humoral^{149,150} han estat desenvolupats en aquest model.

Amb aquesta combinació d'animals també s'han realitzat estudis de xenotrasplantament hepàtic. Degut a la dificultat quirúrgica, a la complexitat funcional del fetge i a les particularitats immunològiques d'aquest òrgan els estudis realitzats amb aquest model són molt menys nombrosos. Els primers en descriure aquest model van ser Monden i Valdivia l'any 1987^{151,152}. Igual que en el model de cor la majoria dels estudis es centren en el coneixement de les característiques del rebuig. La majoria d'estudis amb aquest model han estat realitzats pel grup del doctor T. Starzl (Pittsburg) i concretament pel doctor Valdivia i els seus col·laboradors. L'any 1991 Valdivia et al.¹⁵³ van descriure les diferències en la supervivència de xenoempelts cardíacs i hepàtics, preveien un mecanisme de rebuig diferent. L'any 1993 Murase et al. ¹⁵⁴ descriuen supervivències llargues d'empelts de hámster tant cardíacs com hepàtics amb una combinació de fàrmacs antiproliferatius, durant un curt període de temps i d'anticalcineurínics, Tacrolimus, de forma continuada. A aquests estudis els van succeir altres on es descrivien les característiques del tipus de rebuig que es dona en aquest model^{155,59}, altres que es centraven en la protecció que el fetge dona a altres òrgans xenotrasplantats degut a les seves característiques immunològiques^{156,157} i altres que mostraven

el paper del complement després del trasplantament hepàtic donat que la seva síntesi és principalment hepàtica¹⁵⁸⁻¹⁶⁰.

Tot i que no són abundants, s'han fet alguns estudis per valorar les incompatibilitats metabòliques que pot suposar el xenotrasplantament d'un òrgan tant complex com és el fetge malgrat realitzar-se entre espècies concordants. S'ha vist que les proteïnes sèriques adopten el fenotip del donant^{161,162}, un altre exemple és l'estudi que van realitzar Molleví et al.¹⁰⁹ sobre el canvi del perfil lipídic que experimenten les lipoproteïnes després del xenotrasplantament hepàtic a mig termini. Així doncs s'ha vist que aquesta combinació ens proporciona la possibilitat d'estudiar els processos implicats en aquest camp a llarg termini.

1.5 FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETES.

El factor activador de plaquetes (PAF) o 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina és una molècula de naturalesa fosfolípídica produïda per múltiples tipus cel·lulars. Es sintetitza a partir de fosfolípids de les membranes plasmàtiques de plaquetes, leucòcits polimorfonuclears, monòcits, cèl·lules endotelials i cèl·lules de Kupffer entre altres¹⁶³⁻¹⁶⁶. Té propietats vasoactives¹⁶⁷⁻¹⁶⁹, proinflamàtiques¹⁷⁰ i hemostàtiques¹⁷¹ mitjançades per receptors específics. Per la seva manera d'actuar el podríem comparar amb les hormones, les citocines o les interleuquines^{163,164}. També sembla que actua a nivell intracel·lular com a segon missatger tal i com s'ha comprovat en leucòcits i cèl·lules endotelials a les que s'ha observat que quan s'utilitza antagonistes del receptor del PAF la síntesi d'eicosanoides i de radicals lliures d'oxigen també queda bloquejada. A nivell de cèl·lules endotelials actua de manera juxtacrina, evitant així una activació indiscriminada.

1.5.1 Síntesi i degradació del PAF.

S'han descrit dues rutes enzimàtiques diferents implicades en la síntesi del PAF^{163,172}:

- Via de síntesi per remodelació
- Via de síntesi *de novo*

Via de síntesi de PAF per remodelació (figura 16): aquesta via és la que utilitzen les cèl·lules endotelials per produir PAF de forma significativa. En aquesta via es produeix una modificació als lípids estructurals de la membrana plasmàtica que consisteix en que el grup acil passa a acetat. Així doncs el 1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfocolina, per l'acció de la fosfolipasa A₂ (o bé la transacilasa independent de CoA, quan aquest coenzim és absent) passa a 1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfocolina, molècula que anomenem lisoPAF. Aquesta molècula, un cop acetilada per la PAF acetilhidrolasa depenent de CoA¹⁷³ es converteix en PAF. Aquesta via no funciona de forma constitutiva, està relativament inactiva en cèl·lules en repòs, i s'activa davant de certs estímuls com són agents inflamatoris a cèl·lules com els limfòcits polimorfonuclears, monòcits i cèl·lules endotelials. És la via predominant en processos inflamatoris i al·lèrgics. Com hem dit, en aquesta via hi participa l'enzim fosfolipasa A₂ (PLA₂), aquest enzim també participa en la via que hidrolitza glicerofosfolípids i en resulten àcids grassos i lisofosfolípids. Un d'aquests àcids grassos és l'àcid araquidònic, precursor d'eicosanoids i prostanoids. Així doncs la producció de PAF per la via de la remodelació sempre va associada a la formació d'eicosanoids.

Un altre agent que intervé en aquesta via és el Calci, ja que incrementa la síntesi de PAF a través de la PLA₂ pel pas de l'acil-PAF a liso-PAF i inhibint la reacetilació del liso-PAF¹⁷⁴

Via de síntesi *de novo*: aquesta via utilitza el precursor fosfolipídic 1-O-alkil-sn-glicero-3-fosfat. Després d'una acetilació i l'intercanvi de diferents elements (figura 16) acaba amb la incorporació de citidina 5'-difosfat-colina (CDP) i la formació d'una molècula de PAF. Aquesta via produeix PAF de forma constitutiva a teixits com el cervell i el ronyó però no s'utilitza com a font de PAF a les cèl·lules endotelials humanes^{175,176}.

A un dels passos de la via de formació de PAF per síntesi *de novo* hi actua una acetiltransferasa i es dóna la incorporació d'AcetilCoA, si enlloc de la incorporació d'AcetilCoA s'incorpora una altra molècula amb la mateixa estructura però amb més carbonis, es dóna una transformació de la via de formació del PAF donant una via secundària a la via de síntesi *de novo* que dóna alquilacilglicerofosfocolina i que té com a producte final 1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfocolina, substrat que s'incorpora a la via de remodelació donant la formació de liso-PAF.

La síntesi del PAF té lloc principalment en el reticle endoplasmàtic, tot i que no podem excloure la possibilitat de que també es sintetitzi a la membrana plasmàtica. Aquesta localització s'ha trobat a partir de treballs que situen la síntesi fosfolipídica de les cèl·lules de mamífer a aquest compartiment cel·lular¹⁷³. Descriuen la presència de l'enzim PAF-acetiltransferasa a microsomes de molts tipus cel·lulars. També recolza aquesta hipòtesi el fet que en leucòcits polimorfonuclears humans, tant l'activitat PLA₂ com l'acetiltransferasa, es troben a organel·les intracel·lulars i l'activitat l'acetiltransferasa a les fraccions granulars i

microsomal. S'ha observat que hi ha una localització semblant en organel·les intracel·lulars de cèl·lules endotelials humanes.

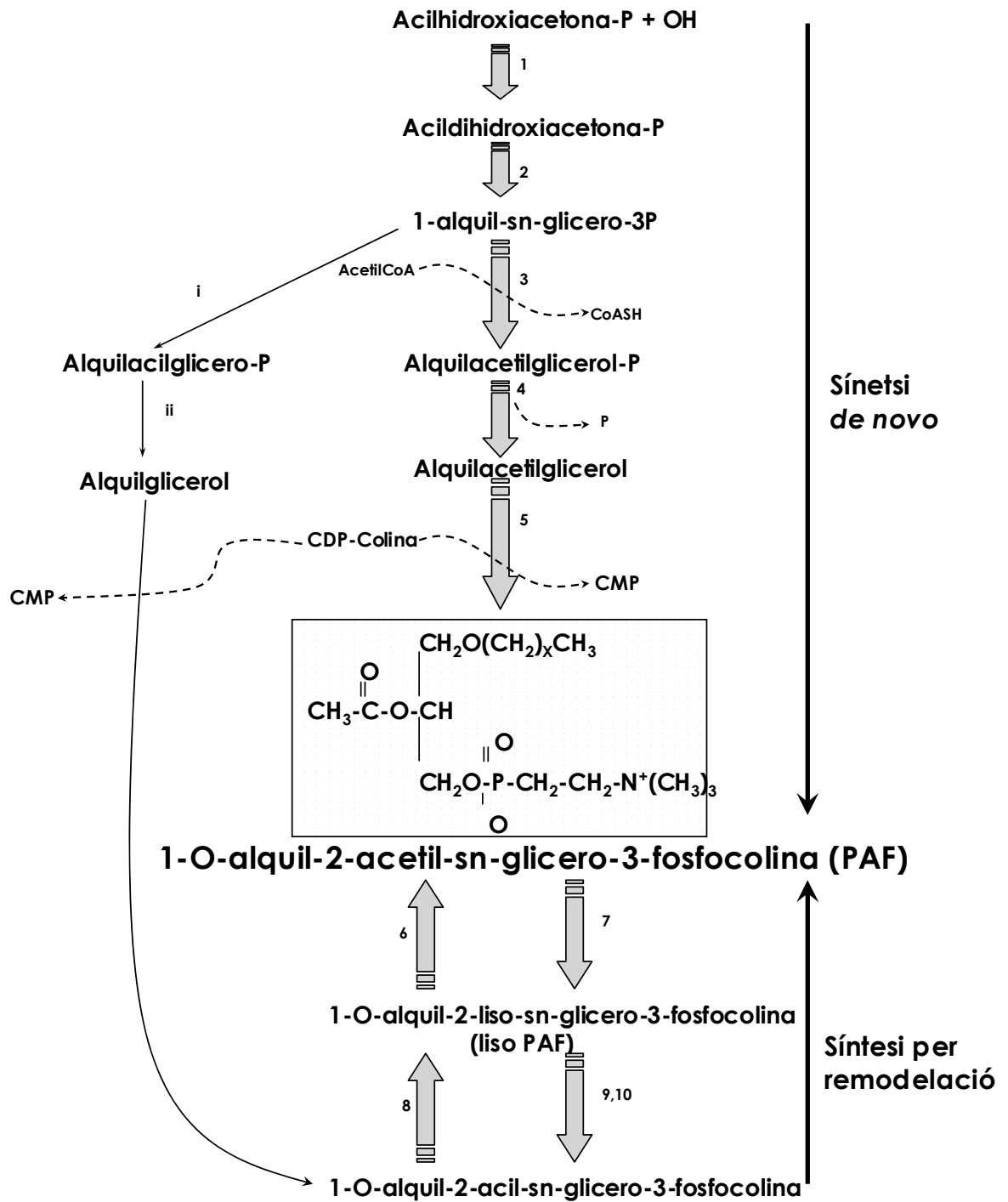
Els monòcits i eosinòfils humans sintetitzen PAF, i ho fan per mitjà de la via de la remodelació i el secreten¹⁶³. En canvi les cèl·lules endotelials, tot i que el sintetitzen per la mateixa via, el retenen a la membrana plasmàtica. No es coneix bé el mecanisme que s'utilitza pel transport intracel·lular i l'orientació específica de les molècules de PAF que es troben a la membrana plasmàtica de les cèl·lules endotelials. Tampoc es sap amb certesa com el PAF pot transferir-se intracel·lularment, si a través d'una proteïna o bé per un procés d'interconnexió entre les membranes intracel·lulars de vesícules que acaben fusionant-se amb la membrana plasmàtica¹⁷⁷.

La síntesi i acumulació de PAF dins la cèl·lula està molt ben regulada per l'enzim PAF-AH. Hi ha una interconnexió amb la síntesi d'altres mediadors inflamatoris com són els eicosanoids o l'expressió de proteïnes d'adhesió.

Degradació del PAF.

El PAF és una molècula d'una vida mitja molt curta, és de minuts o fins i tot de segons¹⁷⁸. La via per la qual el PAF es degrada el converteix en liso-PAF (figura 16). És una transformació ràpida a través de l'enzim PAF-acetilhidrolasa (PAF-AH). Aquest enzim és una molècula de la subfamília de la PLA₂ independents de Ca²⁺, que treu el residu sn-acetil del PAF, però no les cadenes llargues situades en aquesta mateixa posició. La PAF-AH, enzim clau en la degradació del PAF, hidrolitza molècules de PAF i formes de cadena curta de fosfatidilcolina oxidada transformant-les en liso-PAF i lisofosfatidilcolina, respectivament. Algunes isoformes de PAF-AH es poden trobar en plasma (la majoria associades a LDL en humans) i són sintetitzades pel fetge i per macròfags. Existeixen altres formes de l'enzim sintetitzades intracel·lularment^{178,179}. Els lipopolisacàrids, la IL-1 α , la IL-1 β i el TNF α inhibeixen l'expressió als macròfags de PAF-AH. També s'ha descrit que els radicals lliures d'oxigen indueixen la pèrdua de gran part de l'activitat de la PAF-AH en plasma humà i en LDL purificades. Només amb 10 minuts d'incubació amb radicals lliures d'oxigen la inactivació d'aquest enzim és irreversible. Així els radicals lliures d'oxigen poden potenciar i allargar els efectes proinflamatoris del PAF.

Figura 16: Aquest esquema ens mostra les dues vies de la síntesi del PAF així com la seva degradació cap a liso-PAF.



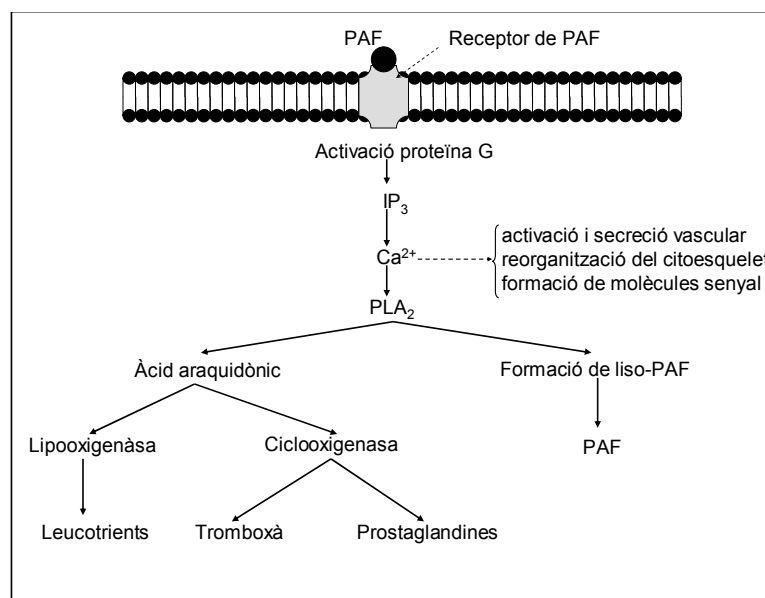
- | | | | |
|---|---|----|---|
| 1 | Alquil-DHAP sintasa | 6 | Acetil CoA: lisoPAF acetiltransferasa (PAF acetiltransferasa) |
| 2 | NADPH: alquil-DHAP oxidoreductasa | 7 | PAF acetilhidrolasa |
| 3 | AcetilCoA: alquil-lisoglicerol-P acetiltransferasa | 8 | Transacilasa independent de CoA |
| 4 | Alquilacetilglicerofosfat fosfolidrolasa | 9 | Fosfolipasa A ₂ |
| 5 | CDP colina: alquilacilglicerol colinafosfotransferasa no sensible a ditiotrièdral (DTT) | 10 | Transacilasa independent de CoA |

1.5.2 El receptor del PAF.

El PAF actua unint-se a un receptor específic del tipus receptor serpentina associat a proteïna G. És una proteïna amb set segments transmembrana, un domini que interacciona amb la proteïna una G i un domini citosòlic que es pot fosforilar de forma reversible. Ja ha estat clonada i es coneix la seva localització en el genoma humà^{181,182}.

El primer suggeriment de l'existència d'un receptor específic va ser el fet que només l'estereoisòmer natural D estimulava les diverses respostes del PAF. Altres fets que recolzaven la hipòtesi d'un receptor específic eren: el fet que el PAF tingués funcions biològiques a concentracions molt baixes, normalment inferiors a 0,1nM, que es donés una desensibilització específica després de l'exposició d'un teixit al PAF i que hi hagués una inhibició específica per part dels antagonistes del PAF.

Figura 17: Mecanisme que s'activa un cop el PAF interacciona amb el seu receptor, veiem les interrelacions amb la producció d'àcid araquidònic dins de la cèl·lula.



La unió del PAF al seu receptor indueix un ampli ventall de respostes intracel·lulars (figura 17). Mitjançant l'activació de la Proteïna G, activa o inhibeix altres enzims efectors i mecanismes de senyalització intracel·lular com l'increment de calci intracel·lular, l'activitat de

quinases com la proteïna quinasa C (PKC) i l'activació de la fosfolipasa C (PLC) responsable de la formació de fosfatidil inositol (PI₃). Aquests senyals es tradueixen en canvis en el citoesquelet, en l'activació de la quimiotaxi, en secreció granular i en sobreexpressió d'integrines com la CD11/CD18 dels neutròfils.

Hi ha alguns tipus cel·lulars que expressen de forma constitutiva el receptor del PAF com són els limfòcits polimorfonuclears, els monòcits o les cèl·lules limfoides. Tanmateix s'han descrit alguns estímuls que regulen la seva expressió gènica, per exemple INF- γ que implica un increment de la seva expressió en monòcits¹⁸³ o bé nivells alts d'AMPc que l'inhibeixen¹⁸⁴.

1.5.2 Efectes del PAF.

Les concentracions a les que actua el PAF són molt baixes, sembla que desenvolupa les seves funcions dins d'un rang de 10⁻¹² a 10⁻⁹ M.

L'efecte en que inicialment es va descriure el PAF, agregació de les plaquetes, ha quedat com un paper més de l'ampli ventall d'accions en les es troba implicada aquesta molècula. Amb l'administració endovenosa de PAF a diferents animals d'experimentació s'han pogut conèixer efectes sistèmics importants que produeix el PAF. Participa en processos d'hipotensió, hipertensió pulmonar, un increment de la resistència al flux aeri, broncoconstricció, increment de la permeabilitat vascular, trombocitopènia i neutropènia.

Si ens fixem amb diferents tipus cel·lulars podem veure les diferents accions que el PAF hi realitza:

Plaquetes: és l'agregant plaquetar més potent que es coneix. L'estimulació de les plaquetes mitjançant el PAF provoca canvis en la seva forma i agregació, estant relacionat amb l'alliberació d'histamina, serotonina i factor plaquetar¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

Cal fer referència a que les plaquetes de rata, *in vitro*, són refractàries al PAF, però *in vivo* provoca trombocitopènia i leucocitosi. D'altra banda es sap que produeixen liso-PAF que per manca de l'aciltransferasa no transformen en PAF i que per tant podrien actuar com a cèl·lules donants de liso-PAF i reaccionar davant del PAF format al seu voltant.

Leucòcits: tant neutròfils com monòcits, macròfags, mastòcits i eosinòfils són capaços de alliberar PAF quan són estimulats. A la vegada aquest mediador, a altes concentracions, és capaç d'activar els leucòcits produint leucopènia i marginació d'aquestes cèl·lules als vasos. La seva actuació *in vitro* provoca quimiotaxis, desgranulació, formació de ions superòxid i metabolits de l'àcid araquidònic. Provoca l'estimulació de macròfags i monòcits que fa que

aquests alliberin altres mediadors com IL-1, TNF, leucotriens i eicosanoides^{188,189}. Tanmateix el PAF a baixes concentracions sensibilitza les cèl·lules inflamatòries de manera que la seva resposta a un posterior estímul activador serà molt més vigorosa¹⁹⁰.

La secreció de PAF a les cèl·lules inflamatòries és un mecanisme de senyalització intercel·lular i d'amplificació del senyal. Així doncs les cèl·lules inflamatòries activades secreten PAF que pot activar altres cèl·lules i així amplificar la resposta inflamatòria local. També s'ha detectat que implica un increment de la producció de radicals lliures d'oxigen i de l'expressió de CD11 β .

Cèl·lules endotelials: són cèl·lules capaces de sintetitzar i alliberar PAF quan són estimulades per molècules com la trombina¹⁹¹. Altres substàncies com IL-1 i el TNF indueixen la alliberació de PAF i prostaciclina per aquestes cèl·lules i així afavoreixen l'adhesió dels leucòcits a aquestes cèl·lules^{192,193}. D'altra banda al PAF se li atribueix l'acció d'incrementar la permeabilitat vascular per l'acció directa sobre les cèl·lules endotelials^{194,195}.

Com a conseqüència de l'ampli ventall d'accions en que el PAF està implicat se'l relaciona amb molts processos patològics: trombosi, inflamació, asma, alteracions del sistema cardiocirculatori, rebuig agut de l'òrgan trasplantat, alteracions renals immunològiques, disfuncions del sistema nerviós central, alteracions de l'embaràs i implantació de l'òvul, shock endotòxic, ulceracions gastrointestinals, alteracions del sistema immunològic i en lesions d'isquèmia i reperfusió.

1.5.4 PAF i el rebuig d'òrgans trasplantats.

Hi ha estudis que descriuen la participació del PAF en el rebuig d'òrgans trasplantats, però pràcticament tots els estudis es centren en el rebuig hiperagut o bé en el rebuig vascular agut, però no en trobem que estudiïn la funció del PAF a llarg termini. La implicació de les plaquetes en els processos de rebuig va ser el detonant perquè es comencés a estudiar el PAF en aquest tipus de processos. En el primer procés de rebuig en que es va descriure la participació del PAF va ser en el rebuig renal hiperagut¹⁹⁶.

Malgrat es comencés a estudiar el paper del PAF degut a l'observació d'acumulacions de plaquetes en els òrgans rebutjats, sembla que la relació que pot tenir el PAF amb el rebuig no està estrictament relacionat amb les plaquetes ja que tot i l'administració d'antagonistes del PAF no s'evita la formació d'aquestes acumulacions, a més a més molts estudis s'han fet en rates i les plaquetes d'aquests animals són refractàries al PAF. Com a modulador de la resposta immune el PAF regula funcions limfocitàries de forma indirecta a través de la

producció de prostaglandines i leucotriens, que són potents moduladors de les funcions dels limfòcits, o bé de forma directa activant la proliferació limfocitària i la producció de IL-2¹⁹⁷. A més a més en el rebuig cel·lular, els limfòcits requereixen dues senyals per part dels macròfags per proliferar: la presentació de l'antígen aliè i IL-1. El PAF estimula els macròfags i aquests produeixen la IL-1, així doncs el PAF intervé de forma indirecta en el rebuig de l'òrgan trasplantat¹⁸⁹. Per aquest motiu els antagonistes del PAF van ser estudiats com a agents immunomoduladors sols o bé acompanyant a altres fàrmacs. En el cas del trasplantament hepàtic els macròfags residents o cèl·lules de Kupffer, són activats i com a conseqüència alliberen mediadors del tipus IL-1 i TNF α . Aquestes molècules indueixen l'expressió de proteïnes d'adhesió que participen en l'adhesió i transmigració dels leucòcits^{198,199}. Hi ha evidències que el PAF està implicat en aquest procés. També s'ha descrit que el PAF associat a la membrana actua com a molècula d'adhesió durant les interaccions inicials dels leucòcits amb l'endoteli²⁰⁰⁻²⁰².

1.5.5 Antagonistes del PAF.

No tenim un sol tipus de molècula que realitza aquesta funció sinó que hi ha un bon nombre de molècules que eviten que el PAF realitzi la seva funció. No tots actuen de la mateixa manera ni són de la mateixa naturalesa, n'hi ha que són productes naturals i altres són sintètics. Hi ha molècules que inhibeixen la síntesi del PAF, altres que són inhibidors no específics dels efectes del PAF i altres que són inhibidors específics dels receptors del PAF. Aquest últim tipus és el que compren més quantitat d'antagonistes del PAF.

Els antagonistes del receptor del PAF tenen alta afinitat pel receptor del PAF i per tant, inhibeixen competitiuament la unió de la molècula amb el seu receptor. Les tècniques més emprades per a valorar la potència inhibidora d'aquestes molècules són la valoració de la capacitat d'inhibir l'agregació de plaquetes de conill *in vivo* que provoca el PAF²⁰³ i la valoració de la capacitat d'inhibir la hipotensió induïda pel PAF, en rates²⁰⁴.

L'estructura química d'aquestes molècules pot ser molt diversa, poden assemblar-se al PAF, com és el cas del CV-3988 i el Ro-18-7953, o bé pot ser que no hi tinguin cap mena de semblança, com passa amb l'alprazolam i WEB-2086. Les vies per les quals arriben a inhibir l'acció del PAF també poden ser molt diferents però moltes conflueixen en la modulació de l'acció de la PAF-AH.

Moltes d'aquestes molècules s'han testat en cultius cel·lulars de molts tipus de cèl·lules diferents. Així doncs s'han utilitzat per veure la capacitat d'unió del PAF a plaquetes humanes,

per valorar la seva capacitat per variar les funcions dels limfòcits polimorfonuclears relacionades amb el PAF²⁰⁵ i per inhibir els efectes que produeixen aquests sobre la monocapa endotelial sotmesa a hipòxia i regeneració²⁰⁶. Altres models in vitro s'han utilitzat per veure el paper d'aquestes molècules en processos tant diferents com el part o el distrés respiratori^{207,208}.

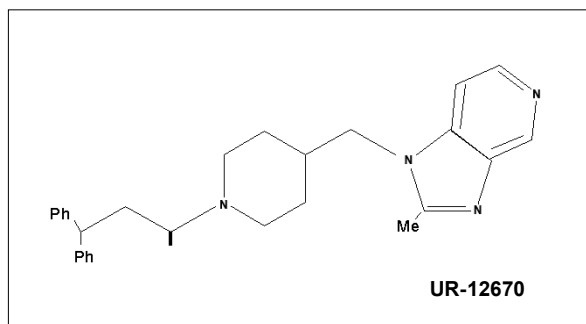
Els models animals també són una bona manera per conèixer les funcions d'aquests antagonistes del PAF, tant si són administrats per via oral com per via endovenosa. S'han utilitzat amb models d'isquèmia/reperfusió d'òrgans molt variats: cervell²⁰⁹, pulmó²¹⁰, intestí²¹¹, cor²¹², ronyó²¹³ o fetge²¹⁴. També s'han utilitzat models animals de trasplantament de diferents òrgans per conèixer el paper d'aquestes molècules en aquest camp. Altres patologies en que s'han provat aquests fàrmacs són l'asma²¹⁵, i és on s'han obtingut resultats més satisfactoris, la pancreatitis aguda²¹⁶ i la colitis ulcerosa²¹⁷.

En el camp del xenotrasplantament d'òrgans també s'ha descrit una participació del PAF en els processos inflamatoris que mitjancien el rebuig xenogènic, especialment el rebuig hiperagut. En diversos models experimentals de rebuig hiperagut s'ha demostrat que l'administració d'un antagonista del PAF millorava considerablement la histologia dels empelts i augmentava la supervivència^{218,219}. En un model de xenotrasplantament cardíac discordant *guinea pig-to-rat* es va demostrar que l'administració de l'antagonista del PAF Tulopafant augmentava la resistència capilar i perllongava la supervivència. S'observava una marcada disminució de l'hemorragia intersticial i la deposició de plaquetes amb granulòcits²²⁰. També s'ha demostrat que mitjançant l'administració de l'antagonista del PAF WEB2086BS es produïa una reducció en l'alliberació de TNF- α i prostanoids en un model ex-vivo de xenoperfusió d'un ronyó de porc amb sang humana²²¹. En el mateix model experimental, l'administració de l'antagonista del PAF BN-52021 produïa una disminució dràstica de l'hemorràgia intersticial i dels microtrombs vasculars. A més a més, el BN-52021 produïa una disminució de l'expressió de P-selectina glomerular i vascular i una disminució de l'activitat MPO en el teixit renal²²².

1.5.6 UR-12670.

Aquest és un antagonista del receptor del PAF, d'origen sintètic que prové de variacions realitzades a molècules de piperazides²⁰⁴. Estructuralment és diferent del PAF (figura 18). És més potent que alguns d'origen natural de la família dels ginkgolides com el BN52021 i amb menys efectes secundaris ja que el fet de ser un producte sintètic li confereix una major especificitat.

Figura 18: Estructura del fàrmac antagonista del receptor del PAF UR-12670.



L'experiència amb aquest fàrmac és reduïda. Dels estudis que podem relacionar amb el camp del trasplantament, s'ha pogut observar que l'administració del antagonista del PAF UR-12670 a rates uninefrectomitzades té un efecte protector a llarg termini sobre les lesions induïdes per la síndrome d'isquèmia reperfusió^{223,224}.

2.HIPÒTESIS I OBJECTIUS

El trasplantament d'òrgans és una pràctica clínica habitual que cada dia obté resultats més esperançadors. Tant la millora de les tècniques quirúrgiques, com la dels fàrmacs immunosupressors, com les solucions de preservació i la detecció precoç de malalties ha portat a un desequilibri entre el nombre d'òrgans necessaris i els disponibles i per tant un augment del temps en llista d'espera amb el corresponent risc que això suposa per als malalts. S'han desenvolupant tècniques per tal d'intentar reduir aquestes llistes d'espera, en el cas del trasplantament hepàtic podem parlar de la tècnica de *split*, el trasplantament de fetge en dominó i el trasplantament de donant viu com a tècniques que ja es troben en la pràctica clínica. Malgrat aquests esforços no és suficient per pal·liar la problemàtica exposada. Una alternativa a aquesta problemàtica seria el xenotrasplantament d'òrgans.

La idea del xenotrasplantament com a possible solució d'una patologia va sorgir abans que la de l'allotrasplantament, ja fa un segle. Així doncs la història del trasplantament clínic va sorgir amb la utilització d'òrgans d'origen animal. Que el xenotrasplantament arribés a ser una realitat clínica suposaria avantatges com una font inexhaurible d'òrgans i per tant assequibles a pacients que actualment estan exclosos de les llistes d'espera, poder ampliar els criteris d'inclusió, la possibilitat de manipular genèticament els empelts per tal de modificar les respostes de rebuig dels receptors, poder dur a terme pretractaments tant a donants com a receptors, programar les intervencions i evitar la recurrència de patologies específiques d'espècie. Com és ben sabut no tot serien avantatges sinó que també suposaria inconvenients com són problemes ètics, la transmissió de patògens del donant al receptor o del receptor a l'empelt (xenozoonosis), la possible aparició de soques virals emergents i

organismes xenotròpics dels que es desconeix la patogènia, possibles incompatibilitats metabòliques i problemes de rebuig vascular i cel·lular.

Intuïtivament quan pensem en la espècie idònia com a font d'òrgans ens ve al cap una espècie el més propera filogenèticament possible, però hi ha diverses raons perquè no sigui així i s'hagin centrat els estudis de xenotrasplantament en una espècie més llunyana com és el porc. Aquests motius, principalment són problemes ètics, derivats de l'elevada semblança amb l'home, els inconvenients relacionats amb la biologia dels simis i d'altra banda les possibles malalties infeccioses que se'n podria derivar de l'ús d'aquestes espècies més properes a l'home. Així doncs tot i que el porc ofereixi avantatges presenta obstacles molt importants a salvar abans no pugui acostar-se a la realitat clínica. Alguns d'aquests inconvenients són a nivell immunològic i altres, no menys importants, són barreres anatòmic-fisiològiques i metabòliques, xenozoonosis i aspectes ètics.

Per tal de poder superar la primera barrera que presenta el xenotrasplantament, el rebuig de l'empelt, és molt important el coneixement del funcionament del sistema immunitari, aquest és molt complex i amb mecanismes redundants que no permeten que es saltin les seves funcions bàsiques. La utilització de tècniques *in vitro* i d'animals d'experimentació poden ser molt útils per aprofundir en el coneixement d'aquest sistema. Els rosegadors són animals petits, que es reproduïxen amb facilitat, dels que és té molta informació i a més a més es disposa de soques isogèniques que poden ser molt útils per a l'estudi del sistema immunològic. Hi ha molts models de trasplantament d'òrgans posats a punt amb aquests animals i que amb l'administració de fàrmacs immunosupressors s'aconsegueixen supervivències llargues dels empelts fet que ens facilita l'estudi de canvis que es donen al sistema immunitari mentre o quan l'òrgan no és rebutjat i del rebuig a llarg termini; fet que no és possible amb animals grans, porcs-simis, ja que encara no s'ha superat el rebuig agut i només es poden fer estudis als pocs dies del trasplantament.

Un dels punts en que es centra la recerca en el camp del trasplantament avui dia és aconseguir la tolerància de l'empelt o la no reacció específica vers l'empelt en absència d'un tractament immunosupressor. L'interès que té aquest procés en l'altotrasplantament clínic és que els fàrmacs immunosupressors, tot i presentar molts avantatges porten implícits problemes a llarg termini com són nefrotoxicitat, infeccions i processos neoplàstics i pel que fa al xenotrasplantament, alguns autors ho plantegen com la principal esperança per a que pugui ser una realitat clínica.

Com a conseqüència del ràpid que avança la recerca biomèdica hi ha molts mecanismes que s'estan estudiant com a inductors de processos de tolerància. Un d'aquests pot ser la utilització de fàrmacs immunosupressors durant un període de temps variable després del trasplantament; posteriorment retirar-los i contribuir amb la inducció de tolerància amb altres fàrmacs immunomoduladors que no portin associats efectes secundaris com els

dels fàrmacs immunosupressors. Un dels tipus de fàrmacs als que se'ls hi atribueix aquesta funció immunomoduladora són els fàrmacs antagonistes del PAF.

El PAF o factor activador de plaquetes és una molècula fosfolipídica que es sintetitza a partir de fosfolípids de la membrana plasmàtica de plaquetes, limfòcits, leucòcits polimorfonuclears, monòcits, cèl·lules endotelials i cèl·lules de Kupffer entre altres. El paper que se li assigna al PAF en el rebuig dels òrgans trasplantats no està estrictament relacionat amb les plaquetes malgrat ser el primer procés en que es va descriure la participació d'aquesta molècula en el rebuig hiperagut. Així doncs, se l'associa a una regulació de les funcions limfocitàries de manera indirecta, a través de la producció de prostaglandines i leucotriens, que són potents immunomoduladors de les funcions limfocitàries o bé de forma directa activant la proliferació limfocitària i la producció de IL-2. A més a més estimula els macròfags i aquests produeixen IL-1, citoquina necessària per a la proliferació limfocitària. El coneixement d'aquestes funcions del PAF, entre l'ampli ventall de papers que desenvolupava, va ser el motiu pel qual es començaren a estudiar els fàrmacs antagonistes del PAF com a immunomoduladors. Un d'aquests fàrmacs és l'UR-12670, és un antagonista del PAF que actua sobre el receptor d'aquest de manera competitiva. És d'origen sintètic fet que li confereix més especificitat i per tant més potència i menys efectes secundaris que els d'origen natural derivats de la família dels ginkgolides com és el BN52021 entre altres.

Com és ben sabut la fallada hepàtica implica alteracions de moltes altres funcions fisiològiques ja que és un òrgan implicat en múltiples funcions metabòliques: proporciona i regula l'aportació energètica de l'organisme, aporta els components essencials pel creixement i per viure: biosíntesi i catabolisme, metabolisme de ions inorgànics com el ferro i té un paper clau en l'eliminació d'elements residuals. El fet de que el puguem definir com a la víscera més "capitalista" del cos el presenta com a l'òrgan més complicat davant del xenotrasplantament com a realitat clínica. Per aquest motiu ja s'han començat a fer estudis de les possibles incompatibilitats metabòliques que pot suposar aquesta possible modalitat terapèutica, un exemple és l'estudi realitzat amb rosegadors sobre els canvis que implica el xenotrasplantament hepàtic en el metabolisme lipídic procés en el que el fetge hi té un paper destacat. Un altre sistema en el que l'òrgan que ens ocupa hi desenvolupa una funció clau és la cascada de la coagulació, ja que la majoria dels seus factors són de síntesi hepàtica i podrien presentar característiques diferents al ser sintetitzats per un òrgan de diferent espècie. Poden presentar diferents nivells de síntesi o problemes d'interacció. Així doncs és important conèixer amb detall aquest sistema, que és molt important per a la supervivència del receptor.

Amb la realització dels estudis inclosos en aquesta tesi doctoral s'intenta mostrar la utilitat dels models en rosegadors per a l'estudi de les implicacions immunològiques i metabòliques del xenotrasplantament hepàtic.

2.1 HIPÒTESIS.

Els models de trasplantament hepàtic en rosegadors ens ofereixen l'oportunitat d'estudiar el canvis del sistema immunològic a diferents moments postrasplantament. La combinació concordant hámster-rata presenta supervivències a llarg termini amb l'administració de dosis baixes de fàrmacs anticalcineúrics. Es crea una situació protolerant de l'empelt hepàtic i per tant aquest no veurà alterades les seves característiques histològiques de forma significativa. El sistema immunològic pateix canvis graduals per tal d'adaptar-se a la nova situació.

El fetge és un òrgan amb múltiples implicacions metabòliques. Està estretament relacionat amb la cascada de la coagulació i existeixen diferències de diversos paràmetres d'aquesta via, ja conegudes, entre els hámsters Golden Syrian que s'utilitzen com donants i les rates de la soca Lewis que són les receptores. Per tant, tot i estar en una situació immunològicament estable, protolerant, les diferències es reflexaran en els receptors de xenoempelts hepàtics, de la mateixa manera que passa amb el perfil lipídic. Observarem alteracions de la cascada de la coagulació en els receptors de xenoempelts hepàtics a llarg termini .

Els fàrmacs immunosupressors porten associats efectes secundaris com toxicitat renal, infeccions i processos neoplàstics, per tant l'ideal és poder induir tolerància de l'empelt. L'administració de fàrmacs immunosupressors com a mecanisme per induir tolerància ha estat descrit amb anterioritat per altres autors. Amb l'administració de dosis baixes de Tacrolimus aconseguim una situació de supervivència indefinida de l'empelt, així doncs amb la retirada de la immunosupressió i l'administració d'un fàrmac immunomodulador sense efectes secundaris, l'UR-12670, induïrem la tolerància dels xenoempelts hepàtics en la combinació concordant de rosegadors hámster-rata.

2.2 OBJECTIUS.

1. Dissenyar una pauta immunosupressora el menys agressiva possible, que ens permeti obtenir supervivències indefinides del xenoempelt hepàtic en la combinació concordant hámster-rata.
2. Valoració dels canvis a llarg termini del sistema immunològic que es poden apreciar en sang perifèrica de receptors d'un xenoempelt hepàtic concordant i comparar-los amb els que es donen en una situació idèntica però d'al·lotrasplantament.
3. Caracterització histològica d'un xenoempelt hepàtic concordant a llarg termini.
4. Caracteritzar i valorar els canvis que experimenta la cascada de la coagulació de la rata a diferents moments després d'un trasplantament hepàtic ortotòpic on el donant és un hámster. Relacionar els canvis amb l'activació del sistema immunològic.
5. Un cop aconseguit un estat "protolerant" amb dosis baixes d'anticalcineurínics, redissenyar la pauta immunosupressora per tal de poder aconseguir la tolerància de l'empelt hepàtic amb l'administració d'un immunomodulador com és l'antagonista del PAF UR-12670.
6. Valoració de la resposta immunològica amb l'administració de la nova pauta immunosupressora i l'antagonista del PAF UR-12670.
7. Avaluació histològica de l'empelt hepàtic a llarg termini amb l'administració de la nova pauta immunosupressora i l'antagonista del PAF UR-12670.
8. Aprofundir en el coneixement dels antígens contra els que van dirigits els xenoanticossos.