

De los trasplantes a los xenotrasplantes: la alternativa al déficit de órganos

*José Luzardo Estrada MVD, PhD
E-mail: estradaj@iupui.edu

Resumen

El trasplante de órganos en los humanos ha venido a ser la alternativa de vida o muerte para ciertos pacientes con problemas localizados en un órgano y que no tienen solución por los sistemas terapéuticos tradicionales. Los trabajos pioneros de Starz y de Barnard quienes generaron los primeros alo trasplantes (humano a humano) exitosos a mediados del siglo pasado, han abierto las puertas a un desarrollo científico muy grande alrededor de los factores que causan el rechazo inmunológico entre pacientes, los agentes inmunosupresores y el trasplante de órganos y tejidos entre especies. A pesar de todo el éxito científico alcanzado con los trasplantes entre humanos, este se ha visto limitado por la baja disponibilidad de órganos para ser transplantados. Esto ha hecho que se recurra a otras especies animales como donantes de órganos para los humanos. Inicialmente los primates no humanos fueron el objeto de investigación como donantes de órganos para humanos, pero luego por razones éticas y prácticas en cuanto a la disponibilidad de animales, la atención de los científicos se volvió hacia el cerdo para resolver el grave problema del déficit de órganos para los humanos. Sin embargo, el rechazo inmunológico por parte del humano, a los órganos de cerdo, ha hecho que estos tengan que ser genéticamente modificados. Grandes avances se han dado en este sentido hasta el punto de tener supervivencias de más de un año en órganos de cerdos transplantados a primates no humanos. Igualmente, ya se tiene una línea de cerdos genéticamente modificados menos susceptibles a la citotoxicidad del suero humano que los primates no humanos. Aunque mucho trabajo está por hacer, los positivos resultados obtenidos

Recibido el 12 de Noviembre de 2014 Aprobado el 12 de Diciembre de 2014

*Investigador y Docente Universidad de Indiana, USA

De los trasplantes a los xenotrasplantes: la alternativa al déficit de órganos

José Luzardo Estrada

hasta el momento, nos hacen pensar en que una evaluación clínica en humanos se podría dar en muy corto tiempo.

Palabras clave: xenotransplante, transplante, CMAH, GAL, CDs, cerdo, primates no humanos.

Abstract

Organ transplant in humans has become the final option for many patients with organ failure which cannot be solved by using conventional therapeutic ways. In spite of the great success obtained in allotransplantation (human to human), there is a limitation in the number of human organs available for transplant. This fact has forced scientists to look for alternative organ sources to compensate for the bleak number of available transplant organs for humans. The successful pioneering organ transplants done by Starz and Barnardin the last century propelled the research around the driving factors involved in the immunological rejection of transplanted organs, as well as the development of the immunosuppressant medications. The scope of this research was expanded to include organ and tissue transplant between species. The first trials were done using non-human primates as organ donors; however, ethical reasons and the low availability of these animals have pushed scientists to look for other animal species as organ donors for humans. The anatomical and physiological similarities between human and pigs have made the latter the ideal candidate to provide organs for xenotransplantation. However, there are immunological incompatibilities between humans and pigs that need to be addressed before pig organs can be used in humans. Genetic modifications introduced in the pig genome have reduced the immunological rejection of pig organs to human antibodies. In fact, organs from pigs genetically modified have successfully survived for more than a year in non-human primates. There is also a genetic line of pigs with very low sensibility to the cytotoxic effect of human serum. Although there is still a lot of work to do; the positive results already obtained, make us believe that a clinical trial in humans could happen in a very short term.

Key words: xenotransplant, transplant, CMAH, GAL, CDs, pig, non-human primates

Introducción

La posibilidad de que ciertos tejidos crezcan en sitios diferentes a los originales, como transplante de piel dentro del mismo individuo, data de siglos antes de la Cristiandad. De la misma manera, la mitología está llena de ejemplos de quimeras formadas por humanos y animales. El antiguo

Egipto, India y Grecia tienen ejemplos de estos símbolos desde los cuales se vislumbraba la posibilidad de que un organismo humano pudiera tener partes de otros humanos o de animales. Sin embargo, el gran auge en la era moderna se da con los transplantes de riñón y de corazón, especialmente este último hecho por Christian Barnard en Sudáfrica en 1967 (Deschamps et al 2005).

Los avances en materia de transplante de órganos, si bien han cerrado la brecha en materia de salud, también han encontrado un nuevo problema para la medicina; la demanda de órganos supera en gran medida la oferta de los mismos y el número de pacientes que muere esperando un órgano es muy alto. Se estima, que en solo Estados Unidos 14 pacientes mueren diariamente en espera de que les sea transplantado un riñón (National Kidney Foundation, 2014).

Se hace entonces necesario buscar en los animales, la posibilidad de subsanar este déficit de órganos para los humanos. Los primates en un comienzo fueron usados como donantes, pero luego, por los riesgos inherentes a la transmisión de enfermedades y los problemas éticos y de conservación de estas especies, fueron descartados con este propósito, y solo pueden utilizarse en ensayos preclínicos para evaluar órganos de otras especies o en nuevos desarrollos técnicos para transplantes.

Los avances en manipulación embrionaria y muy particularmente en clonación a partir de células somáticas (Wilmut et al 1997), el conocimiento del genoma del cerdo y los descubrimientos de las endonucleasas de restricción, han hecho que las modificaciones genéticas en el cerdo sean mucho más eficientes y rápidas hoy en día. Por estas razones y otras de tipo fisiológico, anatómico y reproductivo, el cerdo está considerado como un modelo ideal para producir los órganos para los humanos (Estrada y Peters, 2005).

Sin embargo, existen grandes incompatibilidades inmunológicas que deben resolverse, antes de que los órganos del cerdo puedan ser transplantados exitosamente a los humanos. Varios genes del cerdo bloqueados y otros tantos genes humanos transferi-

dos exitosamente al genoma del cerdo, abren un abanico esperanzador en el uso de los órganos del cerdo transplantados al humano.

El propósito de este artículo es hacer una reseña del transplante de órganos en humanos y su evolución a través de los años y los desarrollos científicos que se han dado para hacerla más eficiente en la solución de un delicado problema de salud humana.

Historia de los transplantes de órganos:

A través de la historia de la humanidad, el hombre ha estado interesado en la remoción de tejidos de un sitio y su transferencia a otro sitio, primero dentro del mismo organismo y más tarde entre organismos diferentes. Así, existen documentos en la India, que datan de 2500-3000 años AC que describen el uso de pedazos de piel cortada y moldeada de glúteos o mentón de los pacientes para reconstruir narices mutiladas. El médico chino Pien Chiao intercambiaba corazones de hombres muy fuertes físicamente pero de espíritu débil con corazones de hombres frágiles físicamente pero con un espíritu fuerte, para darle un balance a cada hombre (Linden, 2009). Como estos, son muchos los ejemplos sobre transplantes de tejidos y órganos en humanos y en otras especies. Inclusive ejemplos de transplante de piezas de cráneo de un perro a un humano en el siglo XVII.

A finales del siglo XIX y comienzos del siglo XX, los avances logrados en cirugía y particularmente en suturas para anastomosis vascular, le dan un gran impulso al transplante de órganos. Alexis Carrel reimplantó un riñón de perro en el cuello del mismo animal (Hossein S, 2001). Sin embargo, la gran limitante surgió cuando

los trasplantes se trataron de hacer entre individuos. En estos casos, los rechazos fueron evidentes. Algunos estudios hechos con piel de bovino, mostraron que el rechazo era mayor cuando el animal era sometido a trasplantes sucesivos y que el rechazo era menos fuerte entre gemelos idénticos. Estos hallazgos marcaron el inicio de los estudios de rechazo inmunológico con el patrón clásico de sensibilización, memoria y tolerancia.

Después de varios intentos fallidos para transplantar riñones entre humanos, el grupo de Merrill y Murray en Boston, logro exitosamente transplantar riñones entre gemelos idénticos en 1956 (Murray et al 2001). Al trasplante de riñón, le siguieron el trasplante de hígado en la década de los 60 en la Universidad de Colorado (Starzl, 2000) y el primer trasplante de corazón, realizado por Christian Barnard en 1967. Vinieron luego los trasplantes de pulmón y páncreas. Sin embargo, el factor común en estos trasplantes fue el corto tiempo de supervivencia de los pacientes debido a los problemas de rechazo.

Estos rechazos tempranos de los órganos, comenzaron a darle una nueva dirección a la investigación en los trasplantes de órganos. Esta fue dirigida hacia los factores envueltos en la reacción inmunológica y la manera de disminuirla (inmunosupresión).

Varios tratamientos se han intentado tratando de disminuir el rechazo inmunológico por parte del organismo receptor, estos incluyen corticoides, ciclofosfamida, metotrexate y sus combinaciones. Sin embargo, el impacto más grande se da con el descubrimiento de la ciclosporina A por el grupo de Borel et al (1976). El uso de la ciclosporina ha incrementado

considerablemente la supervivencia de los órganos transplantados. Luego vinieron otras drogas buscando el mismo efecto inmunosupresor de la ciclosporina A, entre estas, el tacrolimus y el sirulimus. También se desarrollaron anticuerpos monoclonales que deprimen la acción de los linfocitos; el Campath 1H que combinado con dosis bajas de ciclosporina A son efectivos en el mantenimiento de la inmunosupresión (Calne et al 1999).

El descubrimiento y uso clínico de los agentes inmunosupresores, ha hecho que hoy, en forma rutinaria se hagan trasplantes de órganos en diferentes sitios del mundo. Los trasplantes de órganos como riñón, corazón, hígado, páncreas, pulmón, complejos multiviscerales, y mas recientemente los trasplantes de complejos tisulares como cara, mano y otras estructuras complejas (Wu et al, 2007), se realizan en la mayoría de los grandes hospitales del mundo. Sin embargo, a pesar de los avances médicos y el éxito obtenido en materia de trasplantes, la comunidad médica se encontró con una limitante muy grande para el trasplante de órganos en humanos: la baja oferta de órganos comparada con la gran demanda de los mismos. En solo Estados Unidos se estima que la oferta actual no cubre más allá del 20% de la demanda en la mayoría de órganos (National Kidney Foundation, Mayo 2014). Esta deficiencia ha terminado no solo en la muerte de los pacientes en lista de espera sino en actividades ilícitas o al menos no éticas como el llamado turismo de los trasplantes.

La solución a este problema es la generación de órganos no humanos inmunológicamente compatibles con los humanos, lo que se conoce como xenotrasplantes (trasplante de órganos o tejidos entre especies diferentes).

Los primeros pasos hacia los xenotransplantes. Los primates no humanos.

Los xenotransplantes, que son los trasplantes de órganos entre animales de diferentes especies, tienen una historia de muchos años. Los primeros ensayos datan de finales del siglo XIX y comienzos del siglo XX. Inicialmente fueron transfusiones de cordero a humano y posteriormente trasplantes de tejidos y órganos de conejo, cerdo, perro y cabra a humanos (Deschamps et al 2005). Los fracasos en los primeros trasplantes condujeron al concepto de que “los trasplantes entre especies posiblemente crean condiciones que promueven la coagulación de la sangre, lo cual no ocurre con los alotrasplantes” (Jaboulay, 1909 en Deschamps, 2005). Esta falta de éxito en los primeros trasplantes hizo que estos experimentos fueran interrumpidos por cerca de 60 años. La reactivación de los mismos se dio con el advenimiento de las drogas inmunosupresoras.

Posteriormente, teniendo en cuenta la cercanía genética entre los humanos y los simios, se comenzó a trabajar con estos últimos como los donantes ideales de órganos para los pacientes humanos. Igualmente los primates no humanos comenzaron a ser usados como receptores de órganos de otras especies, previo a cualquier trasplante a los humanos (Calne et al 1955). A mediados de la década de los 60, del siglo pasado, se hicieron varios trasplantes de riñón de rhesus y de chimpancés que acompañados de inmunosupresión permitieron supervivencias de los pacientes hasta 9 meses después del trasplante. En 1992, Thomas Starzl trasplantó un hígado de Baboon a un hombre con falla hepática y hepatitis C, el paciente sobrevivió 70 días (Starzl et al, 1993). Sin embargo, las controversias desencadenadas por el caso Baby Fae, el bebe

humano que sobrevivió 20 días a un trasplante de corazón de Baboon en 1984, desencadenó una serie de protestas que limitaron considerablemente el uso de los primates no humanos para xenotransplantes (Remy, 2009). En la actualidad el uso de primates como donantes de órganos ha sido suspendido por razones éticas, fisiológicas (tamaño de los órganos) y de salud por el riesgo de transmisión de enfermedades especialmente retrovirus (Allan, 2003). Sin embargo, los trabajos con primates usados no como donantes sino como receptores de órganos, antes de cualquier ensayo clínico en humanos, han permitido avanzar ostensiblemente en la evaluación de las modificaciones genéticas hechas en otras especies, particularmente el cerdo.

Los cerdos como donantes de órganos

Con las limitaciones inherentes al uso de los primates no humanos como donantes de órganos para los trasplantes a humanos, se tuvo que acudir a otra especie animal para suplir esta necesidad. Las similitudes anatómicas y fisiológicas del cerdo con el humano, la prolificidad de los porcinos y el hecho de estar en la cadena alimenticia (menos presiones éticas y de sostenibilidad) han hecho que sea la especie más investigada en el mundo para donar órganos a los humanos (Estrada y Peters, 2005). Sin embargo, las incompatibilidades inmunológicas entre las dos especies han hecho imposible el trasplante de órganos directamente del cerdo en su estado natural al humano. Por lo tanto, ha sido necesario trabajar en la modificación genética de los cerdos para hacerlos inmunológicamente más compatibles con el humano.

En general, son varias los problemas que se deben abordar para resolver la incompatibilidad entre los órganos donados por cerdos y los humanos:

1. La reacción hiper aguda (HAR) que es causada por la presencia de anticuerpos preformados contra antígenos del cerdo (particularmente α -1-3-Gal), esto desencadena una reacción del complemento y subsecuentemente la destrucción del endotelio vascular, hemorragia intersticial y edema, coagulación intravascular y trombosis e infiltración de leucocitos polimorfonucleares en los tejidos (Shimizu et al, 2006), el rechazo del órgano ocurre en aproximadamente 24 horas después del trasplante. 2. La reacción humoral aguda (AHXR), que es producida por la generación de anticuerpos contra los antígenos no-gal del cerdo. Chen et al (2005) demostraron que cuando se bloquea el antígeno Gal en el cerdo, otros anticuerpos preformados o formados de Novo crean una nueva respuesta inmunológica que si bien genera lesiones parecidas a la HAR, el daño es causado por el complemento y el componente celular del sistema inmune (células NK y macrófagos); esta respuesta ocurre días o semanas después del trasplante del órgano. 3. Desregulación de la coagulación, la deposición de fibrina y la acumulación de plaquetas lleva a la formación de trombos en los vasos sanguíneos del órgano transplantado. Este cambio en los vasos sanguíneos de un estado anticoagulante a uno pro-coagulante podría estar asociado al daño vascular que se presenta por la respuesta inmunológica (Ekser y Cooper, 2010).

Los grandes avances en biología molecular, genómica, proteómica y tecnologías embrionarias, han hecho posible acercarse a la solución de estos problemas. La clonación de un mamífero adulto a partir de células somáticas (Wilmot et al 1997) abrió un universo de posibilidades en la modificación genética de los animales. En la actualidad se tienen cerdos a los cuales se les han bloqueado varios genes importantes en la inducción de la re-

puesta inmunológica por parte del humano. El gen de la enzima α -1-3 Galactosil-transferasa (GAL), considerado el antígeno más comprometido en la respuesta inmunológica hiperaguda, ha sido bloqueado y su expresión completamente suprimida (Waghmare et al 2010, Reyes et al 2012). Como se esperaba, el bloqueo del gen GAL resulto exitoso en la supresión de la reacción hiperaguda, como ha sido demostrado en trasplantes de riñón y corazón de este modelo de cerdo a primates no humanos (Hisashi et al 2008, Griesemer et al 2009). Otros genes como el de la citidina monofosfato acido neuramínico hidroxilase (CMAH) han sido también bloqueados (Lutz et al, 2013). La Universidad de Indiana genero un modelo que tiene bloqueada la expresión de los dos genes CMAH y GAL. Este modelo genético ha resultado muy prometedor, a tal punto que el nivel de citotoxicidad del suero sanguíneo humano es más bajo en tejidos de este cerdo genéticamente modificado que en tejidos de primates no-humanos. Este mismo modelo ha sido utilizado para evaluar su potencial como donante de sangre para transfusiones en humanos.

Otros genes humanos reguladores del complemento han sido insertados en el genoma del cerdo. El CD55 (proteína regulatoria del complemento-55) CD46, CD59 y otras proteínas regulatorias del complemento han mostrado efectos positivos en la supervivencia de los órganos transplantados del cerdo a los primates no humanos (Miyagawa et al 2010, McGregor et al 2012). Estas inserciones genéticas, aunadas al bloqueo de la α -1-3 galactosiltransferase en el genoma del cerdo (Cozzi et al, 2000, McGregor et al 2005, Yamada et al 2005, Thompson et al 2011), abren la posibilidades de entrar en una etapa de investigación clínica en humanos.

Otros mecanismos que están relacionados con la incompatibilidad de los órganos de cerdos para los primates son la inflamación y los desarreglos en la coagulación sanguínea. La microangiopatía trombocitopenica está caracterizada por trombocitopenia progresiva, elevación del tiempo de coagulación, coagulación intravascular dentro del órgano transplantado, trombosis y finalmente falla total del órgano (Gock et al 2011). En este sentido, se han producido cerdos con modificaciones para trombomodulina que es un regulador del ciclo de la proteína C (Miwa et al 2010), el factor Willebrand (vWF) envuelto en coagulación (Cantu et al 2007), hemoxigenasa-1 (HO-1) relacionado con efecto antiinflamatorio (Yeom et al 2012, Park et al 2014).

Más recientemente, Mohiuddin et al (2014) publicaron un gran avance en la supervivencia por más de un año de un corazón de cerdo deficiente en α -1-3 gal (reacción inmunológica) y transgénico para el CD 46 (inhibición de la activación del complemento) y el gen de la trombomodulina (prevención de la coagulación) humana, el cual fue transplantado heterotróficamente a un baboon. La combinación de múltiples modificaciones genéticas y tratamientos inmunomoduladores incrementan significativamente la supervivencia de los órganos xenotransplantados. Estos resultados marcan un hito sin precedentes en la historia de los xenotransplantes y nos hacen creer que los ensayos clínicos en humanos estarían más cerca de lo que se pensaba.

Otros avances en materia de xenotransplantes usando el modelo porcino, tienen que ver con la generación de órganos humanos en el cerdo a través de la generación de quimeras. Estos modelos de quimeras se basan en los trabajos de Maturani et al (2013) quienes produjeron un cerdo apañ-

creático por transferencia de núcleos y luego regeneraron el páncreas mediante complementación de blastocitos utilizando embriones sin esta deficiencia. Estos trabajos que fueron hechos inicialmente en ratones usando complementación dentro de especies fueron posteriormente revalidados entre especies por complementación de los órganos de ratas y ratones (Kobayashi et al 2010). Otros trabajos han usado células humanas transferidas a embriones de cerdo antes de su implantación (Estrada et al 2011).

Son varios los grupos y muchas las ideas que se están trabajando en el mundo alrededor de la solución de la deficiencia de órganos para los transplantes a humanos. Los resultados, ya sea con la modificación de la genética de los cerdos o con la producción de órganos "humanizados" en el cerdo muestran que se tienen opciones para resolver el mismo problema desde diferentes ángulos.

Zoonosis

Uno de los temores que se tiene con el uso del cerdo como donante de órganos para es la transmisión de enfermedades, especialmente de origen retroviral (PERV). Los PERVs están presentes en todas las razas de cerdos e incluyen los beta y gama retrovirus (PERV A, PERV B and PERV C). El gran riesgo con los PERV es que si se transmitieran a los humanos in vivo, no solo afectarían a los pacientes que recibieron el trasplante sino a otros individuos que estuvieran en contacto con el paciente. Sin embargo, a pesar de que se ha encontrado transmisión de estos retrovirus a células de otras especies en cultivos in vitro (Denner 2003), no se ha podido comprobar la transmisión de los PERV del cerdo a los humanos en estudios hechos transplantando tejido pancreático in vivo (Valdés-González et al 2007, Wynyard et al 2014). La mis-

ma observación fue hecha por Hwang et al (2014) en primates no humanos transplantados con corazón de cerdo.

De cualquier manera, se está trabajando en la modificación de estos genes en el cerdo, mediante técnicas de edición genética. Dieckhoff et al (2008) y Ramsoondar et al (2009) produjeron cerdos que expresan un RNA de interferencia contra el PERV. Estos animales mostraron una expresión estable del RNA de interferencia y una disminución significativa en la expresión de los PERV. Otra alternativa que se puede explorar es la inmunización de los pacientes contra los PERV, en este caso los pacientes se inmunizarían antes del trasplante; un ensayo preliminar muestra que esto podría ser factible (Fiebig et al 2003).

La agencia de control de alimentos y drogas de los Estados Unidos (FDA, 2003), la Asociación internacional para xenotransplantes (IXA, Hering et al 2009) y la Organización mundial de la salud (WHO, 2005) han publicado guías que describen los patógenos que deben ser excluidos de las Unidades o Granjas involucradas en xenotransplantes. Según estas guías, los cerdos utilizados para xenotransplantes deben provenir de piaras especificadas como libres de patógenos (SPF).

La consistencia en los resultados con los estudios hechos en los modelos clínicos in vivo tanto en humanos como en otros primates y las modificaciones genéticas que se han hecho contra la expresión de los PERV en cerdos son alentadoras. Sin embargo, nuevos estudios clínicos y un cuidadoso monitoreo de los pacientes tendrá que hacerse para garantizar que los xenotransplantes no constituyen un riesgo epidemiológico.

Conclusiones y perspectivas

En resumen, las nuevas tecnologías que han emergido en el presente siglo y más específicamente en los últimos cinco años, tienen la habilidad de modificar genéticamente los animales más rápidamente, más fácilmente y más económicamente. Esto ha hecho que las posibilidades en la generación de los animales con las modificaciones genéticas requeridas sean casi ilimitadas.

La supervivencia de más de un año de un corazón de cerdo en Baboon, el bloqueo de los genes GAL y CMAH, muestra que la generación órganos inmunológicamente compatibles con los humanos, a partir de cerdos con múltiples modificaciones genéticas está muy cerca de ser la solución a un problema médico bastante complicado.

Con los grandes avances mostrados anteriormente, no solo en el campo del desarrollo científico hacia la modificación genética de los cerdos sino en el conocimiento de los factores que están incidiendo en el rechazo de los órganos, se puede mirar con optimismo la utilización de los xenotransplantes para resolver la gran deficiencia de órganos para los humanos.

Se espera que en los próximos años el trabajo este enfocado en cuatro frentes principales: 1. Evaluación de otros genes insertados o bloqueados que están afectando la respuesta inmunológica aguda y los problemas de coagulación sanguínea 2. La evaluación in vitro y en primates no humanos de los cerdos que tengan múltiples combinaciones genéticas. 3. Evaluación de otras alternativas diferentes a modificación genética de los cerdos, órganos "humanizados", regeneración celular en modelos avasculares 4. Estudios preclínicos de los modelos más promisorios generados en los numerales 1 y 2

References

1. Allan JS. (2003). Understanding xenotransplantation risks from nonhuman primate retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 278:101-123.
2. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, et al. (1976) Biological effects of cyclosporine A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*. 6:468
3. Calne RY, Cantab MA, Lond MS, White HJ, Chir M, Herbertson BM, Durh MD, Path MC, Millard PR, Lond MB, Davis DR, Salaman JR, Samuel (1968). Pig-to-baboon liver xenografts. *The Lancet*. 291:1176 - 1178
4. Calne RY, Moffatt SD, Friend PJ, et al. (1999). Campath 1H allows low-dose cyclosporin monotherapy in 31 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation*. 68:1613
5. Calne R. (2004). Cyclosporine, a milestone in immunosuppression. *Transplant Proc* 36(Suppl 2):13S-5S.
6. Cantu E, Balsara KR, Li B, et al. (2007). Prolonged function of macrophage, von Willebrand factor-deficient porcine pulmonary xenografts. *Am J Transplant*. 7:66-75
7. Chen G, Qian H, Starzl T, Sun H, Garcia B, Wang X, et al. (2005) Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med* 11:1295-1298
8. Cozzi E, Bhatti F, Schmoeckel M, Chavez G, Smith KG, Zaidi A, et al. (2000) Long-term survival of non-human primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation* 70:15-21
9. Denner J. (2003) Porcine endogenous retroviruses (PERVs) and xenotransplantation: screening for transmission in several clinical trials and in experimental models using non-human primates. *Annals of Transplantation* 8:39-48
10. Deschamps JY, Roux FA, Sai P, and Guoin E. (2005). History of xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 12:91-109.
11. Dieckhoff, B., Petersen, B., Kues, W.A., Kurth, R., Niemann, H., Denner, J. (2008). Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. *Xenotransplantation*. 15:36-45.
12. Ekser B, Cooper DK. (2010) Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future. *Expert Rev Clin Immunol*. 6:219-230
13. Estrada JL and Petters RM. 2005. New Developments in Transgenic Livestock as Models of Human Disease: The Pig Model. *Transgenics*. 4:197-207
14. Estrada J, Li P, Mir B. (2011) Multiorgan engraftment of human somatic cells in swine fetuses after intra-blastocyst transplantation. *Reprod Domest Anim*. 46:630-635
15. FDA. (2003) US Food and Drug Administration. Guidance for industry: source animal, product, preclinical, and clinical issues concerning the use of xenotransplantation products in humans. Available at: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Guidance/Compliance-RegulatoryInformation/Guidances/Xenotransplantation/ucm074354.htm>, Accessed August 2014.

16. Fiebig U., Stephan O., Kurth R., Denner J. (2003). Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses (PERVs): Basis for a vaccine for xenotransplantation. *Virology* 307:406-413.
17. Gock H, Nottle M, Lew AM, d'Apice AJF, Cowan P. (2011). Genetic modification of pigs for solid organ xenotransplantation. *Transplantation Reviews* 25:9-20
18. Griesemer AD, Hirakata A, Shimizu A, Moran S, Tena A, Iwaki H, Ishikawa Y, Schule P, Arn JS, Robson SC, Fishman JA, Sykes M, Sachs DH, Yamada K. (2009) Results of gal-knockout porcine thymokidneyxenografts. *Am J Transplant.* 9:2669-2678
19. Hering BJ, Cooper DK, Cozzi E, Schuurman HJ, Korbutt GS, Denner J, O'Connell PJ, Vanderpool HY, Pierson RN 3rd (2009). The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes--executive summary. *Xenotransplantation.* 16:196-202
20. Hisashi Y, Yamada K, Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Houser SL, Robson SC, Schuurman HJ, Cooper DK, Sachs DH, Colvin RB, Shimizu A. (2008). Rejection of cardiac xenografts transplanted from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout (GalT-KO) pigs to baboons. *Am J Transplant.* 8:2516-2526
21. Kobayashi T, et al. (2010) Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocysts injection of pluripotent stem cells. *Cell* 142:787-799.
22. McGregor CG, Davies WR, Oi K, Teotia SS, Schirmer JM, Risdahl JM, et al. (2005) Cardiac xenotransplantation: recent preclinical progress with 3-month median survival. *J ThoracCardiovascSurg* 130:844-851
23. McGregor CG, Ricci D, Miyagi N, Stalboerger PG, Du Z, Oehler EA, et al. (2012) Human CD55expression blocks hyperacute rejection and restricts complement activation in Gal knockout cardiac xenografts. *Transplantation.* 93:686-692
24. Miwa Y, Yamamoto K, Onishi A, Iwamoto M, Yazaki S, Haneda M, Iwasaki K, Liu D, Ogawa H, Nagasaka T, Uchida K, Nakao A, Kadomatsu K, Kobayashi T. (2010) Potential value of human thrombomodulin and DAF expression for coagulation control in pig-tohuman xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 17: 26-37
25. Miyagawa S, Yamamoto A, Matsunami K, Wang D, Takama Y, Ueno T, Okabe M, Nagashima H, and Fukuzawa M (2010). Complement regulation in the GalT KO era. *Xenotransplantation.* 17:11-25
26. Mohiuddin MM, Singh AK, Corcoran PC, Hoyt RF, Thomas III ML, Lewis B, Eckhaus, Reimann KA, Klymiuk N, Wolf E, Ayares D and Horvath KA. (2014). One-Year Heterotopic Cardiac Xenograft Survival in a Pig to Baboon Model. *American Journal of Transplantation.* 14: 488-489
27. NKF. Organ donation and transplant statistics May 2014. <http://www.kidney.org/news/newsroom/factsheets/Organ-Donation-and-Transplantation-Stats.cfm>
28. Park S, Cho R, Koo OJ, Kim H, JT, SunghoonHuh, Kim SJ, Yeom HJ, Moon J, Lee EM, Choi JY, Hong JH, JangG, Hwang JI, Yang J, Lee BC, and Ahn C. 2014. Production and characterization of soluble human *TNFR1-Fc* and human *HO-1(H-MOX1)* transgenic pigs by using the F2A peptide. *Transgenic Research*23:407-419
29. Ramsoondar J, Vaught T, Ball S, Mendicino M, Monahan J, Jobst P, Vance A, Duncan J, Wells K, Ayares D. (2009). Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation* 16: 164-180.
30. Reyes LM, Estrada JL, Ivary B, Sidner RA, Paris LL, Tector AJ. (2013) Efficient selection of Gal-knockout pig cells for somatic cell nuclear transfer. *J Surg Res.* 184:e37-42
31. Shimizu A, Yamada K. (2006). Pathology of renal xenograft rejection in pig to non-human primate transplantation. *Clin Transplant* 20(suppl 15):46-52
32. Starzl TE, Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino IR, Doyle H, Zeevi A, Warty V, Michaels M, et al (1993). Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet.* 341:65-71.
33. Starzl TE. (2000). History of clinical transplantation. *World J Surg.* 24:759-82.
34. Thompsona P, Badella IR, Lowea M, Canoa J, Songa M, Leopardia F, Avilaa J, Ruhila R,

- Strobertc E, Korbuttb G, Rayatb G, Rajotteb R, Iwakoshia N, Larsena CP and Kirka AD (2011). Islet Xenotransplantation Using Gal-Deficient Neonatal Donors Improves Engraftment and Function American Journal of Transplantation 11: 2593–2602
35. Usui JI, et al. (2012) Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocysts complementation. *Am J Pathol* 180(6):2417–2426.
 36. Valdés-González RA, White DJG, Dorantes LM, Teraín L, Garibay-Nieto GN, Bracho-Blanchet E, Dávila- Pérez R, Evia-Viscarra L, Ormsby CE, Ayala-Summano JT, Silva-Torres ML, Ramírez- González B. (2007) Three-yr follow-up of a type 1 diabetes mellitus patient with an islet xenotransplant. *Clin Transplant* 21: 352–357
 37. Waghmare SK, Estrada J, Reyes L, Li P, Ivary B, Sidner RA, Burlak C, Tector AJ. (2011) [Gene targeting and cloning in pigs using fetal liver derived cells.](#) *J Surg Res.* 171:e223-9
 38. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810–813
 39. World Health Organization. Statement from the xenotransplantation advisory consultation. Geneva, April 2005.
 40. Wu S, Xu H, K. Ravindra K, and Ildstad ST. (2009) Composite Tissue Allotransplantation: Past, Present and Future—The History and Expanding Applications of CTA as a New Frontier in Transplantation *Transplantation Proceedings*, 41:463–465
 41. Wynyard S, Nathu D, Garkavenko O, Denner J, Elliott R (2014) Microbiological safety of the first clinical pig islet xenotransplantation trial in New Zealand. *Xenotransplantation* 21: 309–323.
 42. Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, Iwanaga T, Hisashi Y, Nuhn M, et al. (2005) Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboon through the use of alpha 1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of thymic tissue. *Nat Med* 11:32–34
 43. Yeom H-J, Koo OJ, Yang J, Cho B, Hwang J-I, et al. (2012) Generation and Characterization of Human Heme Oxygenase-1 Transgenic Pigs. *PLoS ONE* 7(10):e46646