

Perspectivas del xenotrasplante cardíaco

RAUL ALFREDO BORRACCI

Clínica del Sol

Trabajo recibido para su publicación: 4/96 Aceptado: 8/96

Dirección para separatas: Dr. Raúl Alfredo Borracci, Carranza 2370, 5° "D", (1425) Buenos Aires, Argentina.

El desarrollo actual de la biología molecular y de la ingeniería genética permiten vislumbrar la posibilidad de fabricar xenoinjertos compatibles con características moleculares semejantes a las humanas. Un enfoque para la construcción de un xenoinjerto cardíaco a partir de una especie filogenéticamente distanciada (cerdo) consiste en reducir la densidad del epítotope α -galactosil de la superficie celular por medio de la transferencia y sobreexpresión en el cerdo del gen de la fucosiltransferasa humana, lo que permitiría al animal producir un epítotope semejante al antígeno H humano.

La estrategia simultánea de eliminar el epítotope α -galactosil porcino y bloquear la acción del sistema complemento (factores reguladores de la actividad del complemento), asociada o no al uso de inmunosupresores, sería suficiente para prevenir los rechazos hiperagudo y agudo. La transferencia y expresión de estos genes podría realizarse *ex vivo* en órganos porcinos perfundidos artificialmente o por medio de la creación de animales transgénicos a partir de la línea germinal. El volumen de conocimientos acumulado hasta el momento permite plantear bases teóricas claras para la fabricación de xenoinjertos compatibles. *REV ARGENT CARDIOL* 1997; 65 (5): 505-513.

Palabras clave Trasplante cardíaco - Xenotrasplante - Biología molecular

El sólo hecho de pensar en un xenotrasplante plantea el extraordinario escollo de superar las poderosas reacciones inmunológicas de rechazo que acontecen entre diferentes especies. La idea inicial supuso que los animales más emparentados con el hombre, desde el punto de vista evolutivo, podían servir para intentar el trasplante con perspectivas de éxito. Algunos monos del antiguo continente, como los babuinos (*Choeropithecus anubis*) y los chimpancés (*Pan troglodytes*), fueron los primeros candidatos con los que se realizaron algunos infructuosos y controvertidos xenotrasplantes. Aunque desde el punto de vista inmunológico estas especies puedan ser las más adecuadas, existen claras objeciones éticas para su uso, así como también un alto costo de crianza y la posibilidad de transmisión de enfermedades virales a las que el hombre pudiera ser susceptible. Pero aunque la comprensión de los mecanismos inmunológicos del rechazo o la aparición de inmunosupresores eficaces hicieran posible el xenotrasplante cardíaco, sólo para EE.UU. se requerirían anualmente 43.000 órganos. Y considerando que el chimpancé es una especie en peligro de extinción, y que la colonia de babuinos cauti-

vos más grande del mundo (*Southwest Foundation for Biomedical Research* en San Antonio) alberga solamente 2.700 monos, (1) la posibilidad de usar esta estrategia se torna poco viable.

El desarrollo actual de la biología molecular y de la ingeniería genética nos permite repensar el problema de los xenotrasplantes. En algunos casos, como con el corazón, con funciones esencialmente mecánicas, sería posible fabricar un órgano con características moleculares similares o por lo menos semejantes a las humanas. Esta idea de usar alguna especie animal modificada genéticamente, que otorgase una compatibilidad de tejidos adecuada permitiría prescindir del uso de primates. Por ello, recientemente, se ha considerado al cerdo como un animal potencialmente útil para la fabricación de un xenoinjerto, dado su tamaño concordante, su cómodo desarrollo en cautiverio y el hecho de poder ser criado en ambientes libres de patógenos específicos.

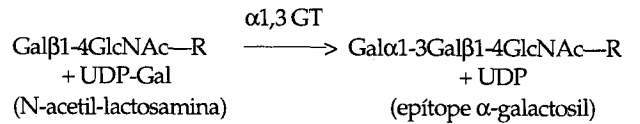
Los xenotrasplantes realizados con órganos de especies filogenéticamente distanciadas de los humanos producen una respuesta de *rechazo hiperagudo*,

en minutos u horas, causado por dos clases de anticuerpos presentes en la circulación. Después del nacimiento, el ser humano produce espontáneamente dos tipos de inmunoglobulinas (IgM e IgG) que al interactuar rápidamente con el endotelio vascular del xenoinjerto provocan la activación del sistema complemento y de la cascada de coagulación, lesionando el sistema vascular del órgano. Estos anticuerpos, llamados *anti-Gal*, interactúan con la porción carbohidratada de algunas glicoproteínas y glicolípidos de membrana que contienen residuos de galactosa denominados *epítopes α-galactosil* y que se encuentran en gran cantidad en las células de mamíferos no primates. Algunas estimaciones sugieren que hasta el 1% de las IgG presentes en los humanos tiene especificidad por este epítipo. (2)

Se conocen hasta el momento tres mecanismos diferentes y complementarios que interactúan en el rechazo hiperagudo. El más importante es el ya descrito de la unión del anticuerpo natural (en este caso IgM anti-Gal) al epítipo y la subsecuente fijación y activación del complemento. (3) El segundo mecanismo es una vía independiente del complemento que utiliza la IgG anti-Gal unida por un lado al antígeno α-galactosil y por su extremo Fc al receptor homólogo presente en algunos tipos de macrófagos humanos. La última vía corresponde a la activación directa del complemento en ausencia de anticuerpos, (4) siendo éste uno de los mecanismos más controvertidos.

Los residuos carbohidratados sobre los que actúan los anticuerpos naturales anti-Gal se incorporan a las macromoléculas por medio de la **glicosilación**. Este proceso no sólo es importante por sus consecuencias estructurales sobre las proteínas sino también porque colabora en el transporte de las mismas a través de la célula, lo que les permite encontrar su localización definitiva en los distintos compartimientos celulares. Generalmente, la glicosilación de proteínas ocurre sobre residuos de asparagina, y más raramente sobre serinas o treoninas. La síntesis de estos residuos de carbohidratos complejos requiere la presencia de varias glucosidasas y glicosiltransferasas que incorporan diferentes azúcares a las cadenas en crecimiento. Se han descrito hasta el momento alrededor de 100 transferasas de este tipo en mamíferos. Las transferasas constan de aproximadamente 360 a 380 aminoácidos, de los cuales los 6

aminoterminales se hallan en el citoplasma, los 16-20 siguientes atraviesan la membrana del aparato de Golgi y los restantes (dominio catalítico) se encuentran en la luz del Golgi. (5) Como se mencionó, los anticuerpos naturales humanos anti-Gal interactúan con residuos de galactosa de las proteínas y lípidos de la membrana celular del xenoinjerto. La presencia de estos residuos α-galactosil resultan del proceso de glicosilación de proteínas por la enzima **α1,3 galactosiltransferasa (α1,3 GT)** de acuerdo con el siguiente esquema:



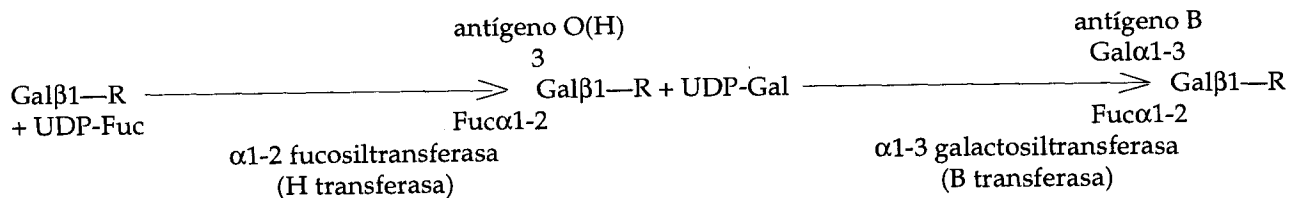
En la Tabla 1 se muestra que esta enzima está presente en los mamíferos no primates y no lo está en los humanos; por lo tanto la distribución de los anticuerpos anti-Gal se encuentra en relación inversa.

Tabla 1
Distribución de anti-Gal y epítipes α-galactosil en mamíferos

Especie	Expresión de epítipo α-galactosil	Producción de anti-Gal
Mamíferos no primates	+	-
Prosimios (lemures)	+	-
Monos del Nuevo Mundo	+	-
Monos del Viejo Mundo	-	+
Monos antropomorfos	-	+
Humanos	-	+

Modificado de Galili U. Immun Today 1993; 14: 480.

Como se comprende, la α1,3 GT promueve la síntesis del epítipo α-galactosil y por lo tanto constituye un punto clave para la manipulación genética de un xenoinjerto. El cDNA (DNA complementario) de la α1,3 GT ha sido clonado para el ratón, (6) vaca (7) y cerdo, (8) encontrándose el gen de este último en la región 1q2.10-q2.11 del cromosoma I. De la misma forma se ha encontrado, por hibridación cruzada, un seudogén no funcional de la misma enzima en el genoma humano. (9) A este respecto, el epítipo α-galactosil es similar al grupo sanguíneo B humano, excepto por una fucosa adicional en unión α(1,2) con la galactosa subterminal: (10)



La presencia del residuo de fucosa, añadido por la H transferasa, es un prerrequisito para la incorporación de la galactosa terminal por la B transferasa. Tanto el pseudogén de la α 1,3 GT y el gen de la B transferasa se encuentran ubicados en loci cercanos del cromosoma 9 humano, hecho que hace pensar en un origen evolutivo estrechamente relacionado. (11) En la Figura 1 se observa la homología de secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de la α 1,3 GT del cerdo y de la B transferasa humana.

cerdo	DWFNPEKRPEVVTITRWKAPVWEGTYNRAVLNYYAKQKITVGLTVFAV
humano	KVLT.CRK-D.LVV.P.L..I.....F.IDI.NEQFRL.NT.I.....I
cerdo	GRYIEHYLEEFLISANTYFMVGHKVI FYIMVDDISRMPLELGPLRSFKV
humano	KK.VA-F.KL..ET.EKH.....R.HY.VFT.QPAAV.RVT..TG.QLS.
cerdo	FEIKSEKRWQDISMMRMKTIGEHLAHLIQHEVDFLPCIDVDQVFNQNGV
humano	L.VGAY.....V..R..EM.SDFCERRFLS...Y.V.V...ME.RDHV...
cerdo	ETLGQSVLQAWWYKAHPDEFTYERRKESSAYIPFGQGFYHAAIFGG
humano	.I.TP.FGT.HPSF.GSSREA.....PQ.Q...KDE.....MG.F...
cerdo	TPTQVLNITQECFKGILQDKENDIEAEWHDESHLNKYFLNKPTKILSPE
humano	SVQE.QRL..RA.HQAMMV.QA.G...V.....L.RS.....V.....
cerdo	YCWYDHI-GMSVDIRIVKIAWQKKEYNLVRNN
humano	.L..QQLL.WPAVL.KLRFTAVP.NHQA...P

Fig. 1. Comparación de secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de la α 1, 3 GT porcina y de la B transferasa humana. Ref.: código de una letra para aminoácidos; punto (.) para idéntico aminoácido. Aproximadamente 40% de homología.

Un primer enfoque para la construcción de un xenoinjerto compatible consiste en reducir la densidad de antígeno (epítipo α -galactosil) de la superficie celular. Para ello existen varias posibilidades teóricas. Por ejemplo, la transferencia y sobreexpresión en el cerdo del gen de la fucosiltransferasa humana, que compite con la α 1,3 GT por el mismo sustrato, permitiría al animal producir un epítipo semejante al antígeno H humano. (12) De esta forma es probable que la nueva molécula formada, Fuc α 1-2 Gal β 1-R, no funcione como sustrato para la α 1,3 GT porcina, o que, de funcionar, incorpore la galactosa terminal y se forme así el mismo antígeno B humano (Figura 2).

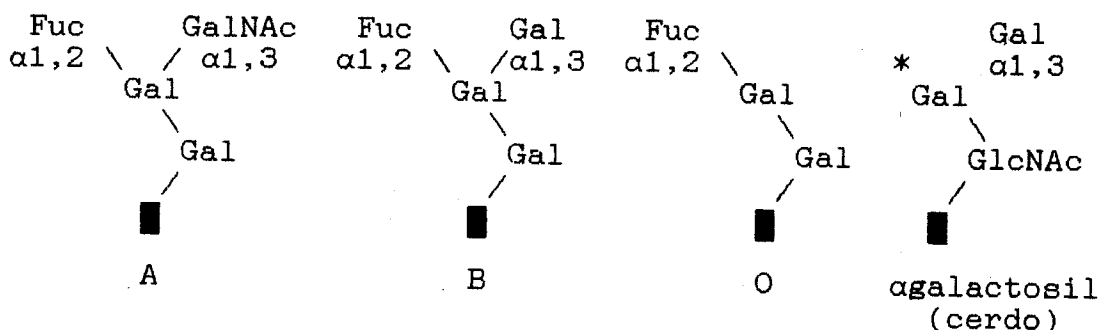


Fig. 2. Glicosilación terminal de proteínas y lípidos en humanos y cerdos. A, B y O: epítipes de grupos sanguíneos humanos. *: sitio de glicosilación para ducosiltransferasa (?). Gal: galactosil. Fuc: fucosil. GalNAc: N-acetil-galactosaminil. GlcNAc: N-acetil-glucosaminil.

Otra técnica consiste en expresar secuencias antisentido (*antisense*) o ribozimas diseñadas para hibridizar con la porción aminoterminal del mRNA de la α 1,3 GT porcina, con lo que se interrumpiría el proceso de traducción del mRNA a la proteína correspondiente (Figura 3). (13)

La transferencia y expresión de estos genes podría realizarse *ex vivo* en órganos porcinos perfundidos artificialmente, empleando diferentes vectores, o por medio de la creación de animales transgénicos a partir de la línea germinal. Esta última metodología se considera más efectiva (Figura 4). Habitualmente la construcción de estos animales transgénicos se logra mediante la técnica de microinyección en el embrión unicelular, pero la transferencia de genes también se puede obtener con la manipulación fetal directa *in utero*. (14) Es probable que el sistema más eficaz para la creación de un xenoinjerto compatible sea directamente la eliminación del epítipo α -galactosil a través de la inactivación de la α 1,3 GT. El *knockout* o eliminación por mutación a través de recombinación homóloga del gen de la α 1,3 GT sólo podría llevarse a cabo en cultivos de *stem cells* embrionarias de cerdo, pero hasta el momento dichos cultivos sólo se han logrado en ratones (Figura 5). Para el caso específico de la elección del promotor, dado que el epítipo α -galactosil se expresa en muchos tipos celulares, (2) no sería suficiente usar un promotor que se exprese exclusivamente en endotelio, sino que se requerirá un promotor de expresión más universal.

Queda como incógnita conocer si la eliminación del epítipo α -galactosil pudiera alterar el desarrollo embrionario del animal, habida cuenta de la eventual necesidad de este epítipo como señal intracelular para una correcta distribución celular de la proteína. Desde el punto de vista evolutivo, si se considera que la inactivación de este gen en los monos catarrinos dependió de una fuerte presión selectiva, es probable que el *knockout* del gen en los cerdos, altere procesos metabólicos importantes.

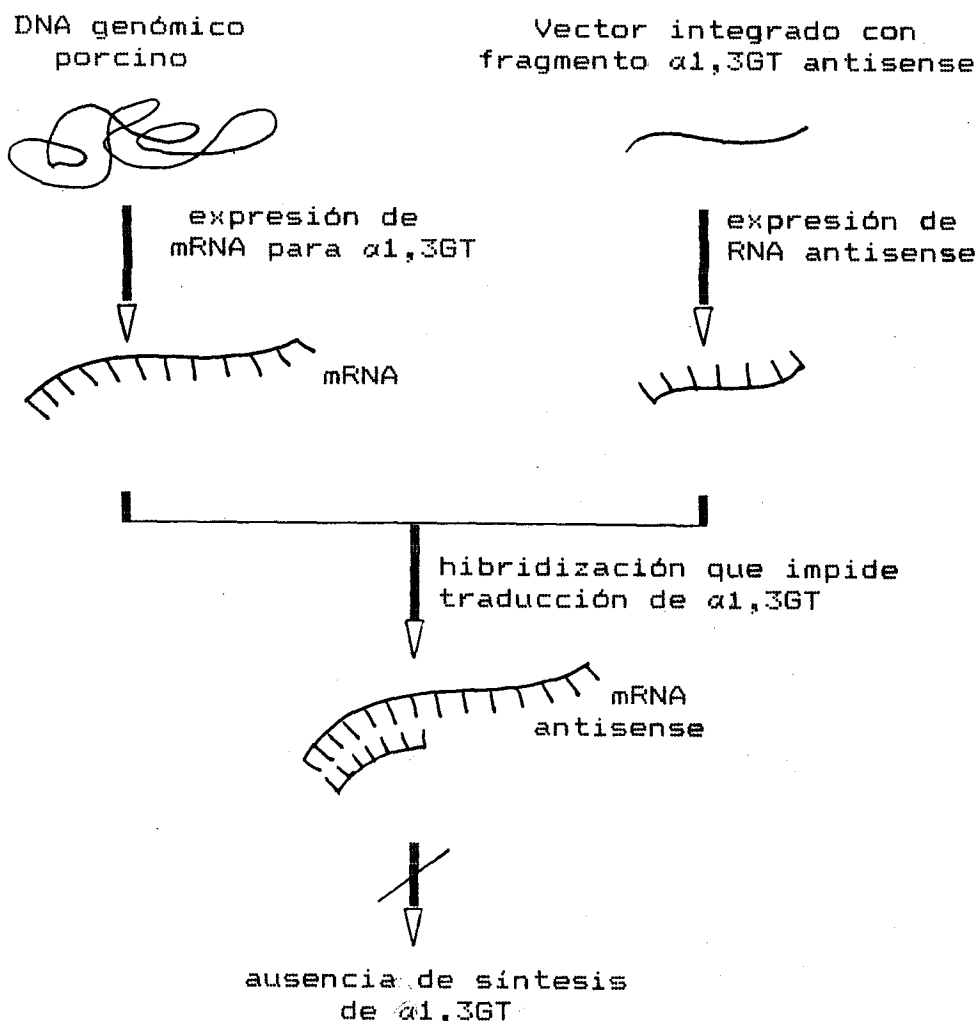


Fig. 3. Inhibición de traducción de $\alpha 1,3GT$ mediante técnica *antisense*.

En cambio, si la pérdida del gen funcional se debió a una simple mutación accidental, como la de muchos polimorfismos humanos, la manipulación del gen de la $\alpha 1,3GT$ porcina será probablemente bien tolerada. (13)

El otro elemento importante en la génesis del rechazo hiperagudo es el **sistema complemento**. Este actúa a través del mecanismo *clásico* mediado por IgM o mediante la activación directa del complemento en la llamada vía *alternativa*, en la cual el factor C1 interactúa directamente con la proteína C reactiva de membrana, con lipopolisacáridos o con moléculas de ADN. Como se sabe, el sistema complemento consiste en un complejo mecanismo en el cual las moléculas que lo forman generan una cascada de activaciones de proteínas que terminan con una respuesta inflamatoria del endotelio que trombosa los vasos del órgano afectado. Así, durante el rechazo hiperagudo ocurre la retracción y separación de las células endoteliales, con la consiguiente exposición de la matriz colágena y del fac-

tor de von Willebrand; en este caso la expresión de P-selectina y del factor activador plaquetario inducen la trombosis. (15)

Una vez superado el período hiperagudo existe un segundo tipo de activación del endotelio como respuesta de rechazo. En él aparecen citoquinas (interleukina 1, 6 y 8) y proteínas quimiotáxicas leucocitarias (E-selectina, P-selectina, ICAM-1, VCAM-1), y disminuye el nivel de **trombomodulina**, promotora de efecto anticoagulante. (16)

Existe, además, un conjunto de proteínas reguladoras del sistema complemento, conocidas como factores reguladores de la actividad del complemento (RCAs). Entre ellos se encuentran el MCP (*membrane cofactor protein*), el DAF (*decay-accelerating factor*) y el CD59 (*membrane inhibitor of reactive lysis*), todos ellos específicos para cada especie animal. (16) El uso potencial de estos reguladores para detener la respuesta de rechazo se demostró en algunos estudios en los cuales el rechazo hiperagudo del xenoinjerto se posponía hasta un plazo de dos semanas cuando se in-

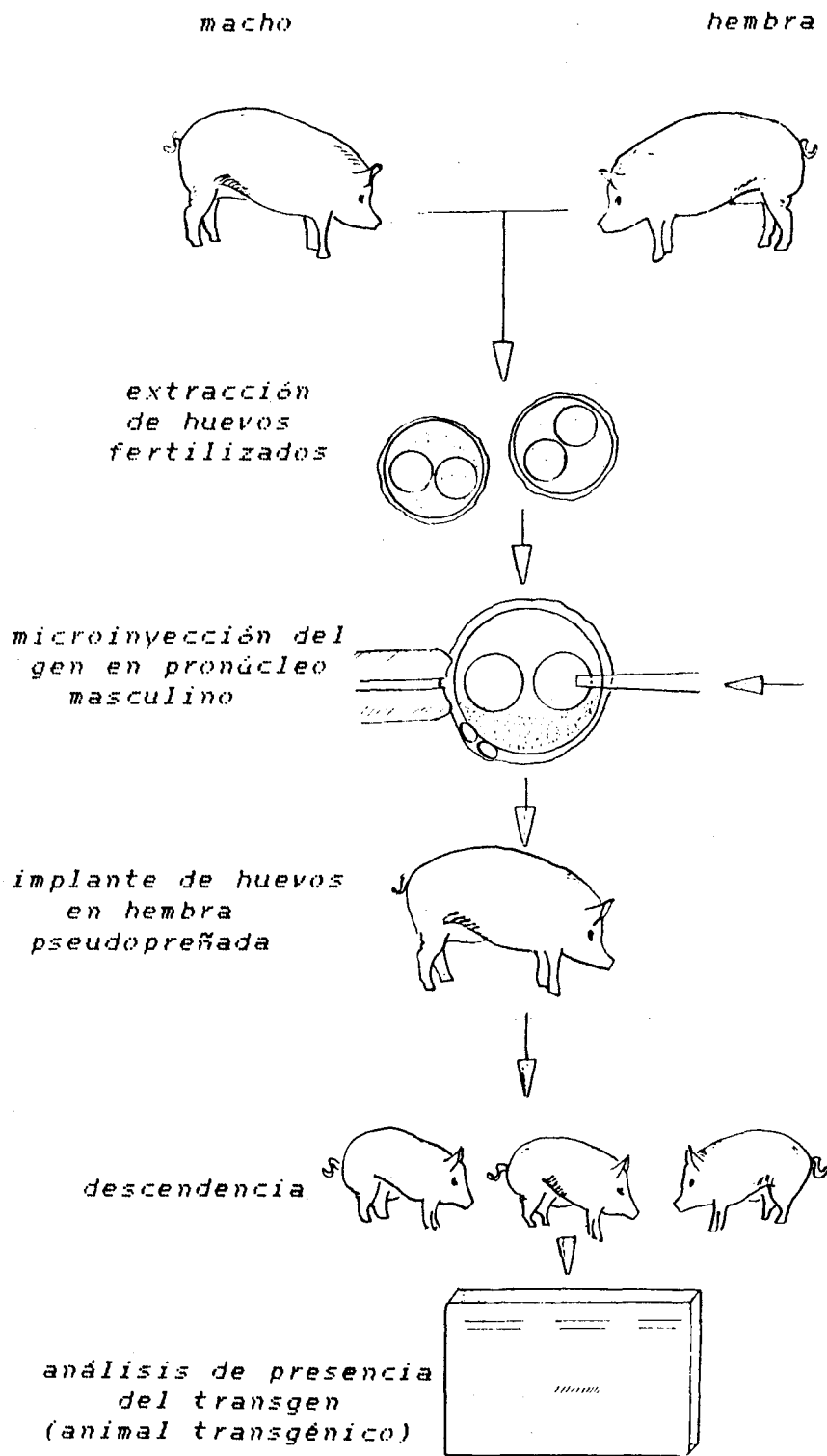


Fig. 4. Transferencia de genes en la línea germinal por microinyección (animal transgénico).

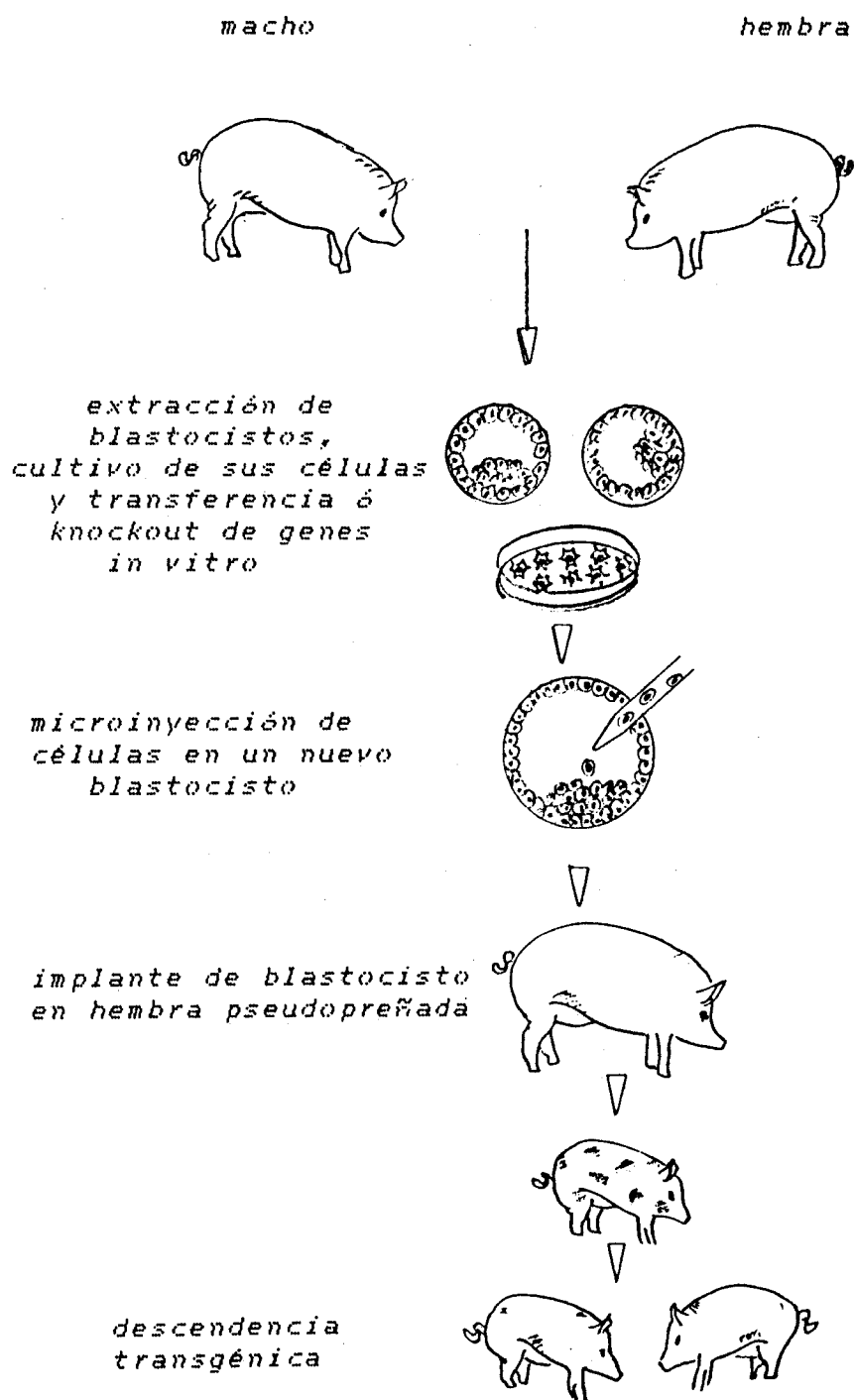
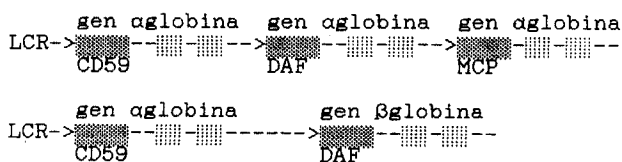


Fig. 5. Transferencia y *knockout* de genes en *stem cells* embrionarias.

fundía una solución de **receptor soluble del complemento tipo I (sCRI)**, que actúa como un inhibidor potente de la vía del complemento. Esta molécula, al unirse a la fracción C3b y C4b inhibe las convertasas C3 y C5 e impide así el rechazo en modelos animales de xenotrasplante cardíaco. (18, 19)

Estos reguladores del complemento están también presentes en el endotelio de los cerdos, pero la especificidad de especie hace que éstos no puedan actuar eficazmente como inhibidores del complemento humano. Dado este fenómeno de especificidad, se han diseñado distintas estrategias con la finalidad de expresar el CD59, DAF y MCP humanos en tejidos porcinos. La generación de cerdos transgénicos que expresen estas proteínas constituye actualmente una de las líneas más investigadas. Mc Curry y colaboradores generaron cerdos transgénicos que expresaban los factores CD59, DAF y/o MCP humanos en sus eritrocitos. (20) Las proteínas sintetizadas en los mismos eran supuestamente transferidas desde el eritrocito a la propia célula endotelial. Estos corazones porcinos trasplantados a monos babuinos sufrían una menor injuria vascular que la que ocurría en el grupo control, alcanzándose una sobrevida de hasta 30 horas. La construcción del vector de expresión para la generación de los cerdos transgénicos se realizó de la siguiente manera. Los cDNAs del CD59, DAF y MCP obtenidos a partir de los mRNAs humanos correspondientes y amplificados por PCR (*polimerase chain reaction*) se insertaron en sendos codones de iniciación de los genes de la α -globina y β -globina humanos, tal como se ilustra a continuación:



Referencias: LCR = locus control región. -> = codón de iniciación.

La presencia del LCR permitió la expresión exclusiva de la construcción en células de la línea eritropoyética. Con una estrategia similar, otros autores han comunicado sobrevida de trasplantes en babuinos de hasta 60 días. (21)

Entre las proteínas descritas que juegan un papel importante en los denominados mecanismos inflamatorios de respuesta endotelial, existen algunas que podrían ser usadas en la generación de un xenoinjerto. Por ejemplo, la transferencia y expresión de la trombosmodulina en células endoteliales

del cerdo, bajo la actividad y regulación transcripcional de un promotor, que no se inhiba durante la activación endotelial, permitiría obtener niveles permanentes de trombosmodulina, aprovechando su actividad anticoagulante. (15)

La estrategia simultánea de eliminar el epítipo α -galactosil porcino y bloquear la acción del sistema complemento o la activación endotelial, asociada o no al uso de inmunosupresores, podría ser suficiente para prevenir los rechazos hiperagudo y agudo. Sólo superando esta etapa se podría evaluar la aparición de rechazos tardíos mediados por linfocitos T y planear una estrategia para su control.

Los biólogos han observado durante muchos años el *privilegio inmunológico* que posee el tejido testicular, el cual no genera rechazo cuando se lo trasplanta a huéspedes inmunológicamente no compatibles. Esta característica parece estar dada por la expresión en las células de Sertoli del **ligando** para una proteína de membrana denominada **CD95** (también llamada Fas o **Apo-1**). (22) Cuando algún patógeno o tejido extraño invade un organismo, los linfocitos T del huésped se activan expresando en su membrana la proteína CD95 como respuesta inmune. Como hecho particular, esta proteína puede generar una señal de apoptosis en la célula que la expresa, siempre y cuando se una a su ligando específico **CD95L**. (23) Si se realiza un trasplante testicular, los linfocitos T del huésped reconocen al tejido incompatible y se activan expresando la CD95; ésta a su vez se une al ligando CD95L producido por el tejido testicular, generando la muerte de las células T. (24) En caso de generar un animal transgénico que exprese el CD95L, el sistema inmune del receptor no podría eliminar el injerto, pero seguiría intacta su capacidad para atacar a otras células o patógenos; sólo los linfocitos en contacto con el injerto se eliminarían. De cualquier forma, aún queda por conocer si existen otras características de las células de Sertoli que le otorgan ese privilegio inmunológico. La agresión de los linfocitos T sobre el injerto ocurre mucho después que los mecanismos, mediados por anticuerpos naturales y complemento, han sido activados; por lo tanto, un xenoinjerto compatible deberá expresar necesariamente no sólo el CD95L sino también los reguladores de la vía del complemento acompañado de la eliminación del epítipo α -galactosil.

Es evidente que, aunque fuera posible generar un animal transgénico histocompatible, se deberá resolver una serie de aspectos fundamentales en lo que respecta a la bioseguridad antes de intentar una aplicación clínica del xenotrasplante. Si bien se plantea que el cerdo podría criarse en ambientes estériles li-

bres de patógenos, es posible que este animal esté contaminado con algún retrovirus heredado desde su línea germinal como DNA proviral. Muchos retrovirus endógenos no pueden replicarse en sus huéspedes nativos, pero son capaces de crecer en células heterólogas a través de un fenómeno conocido como xenotropismo. (25) Por otro lado se deberá considerar la posibilidad de *reacción injerto contra huésped*, consecuencia de los "leucocitos pasajeros" que se transportan e injertan junto al xenotrasplante, y su eventual resolución con el fenómeno de quimerismo que necesariamente requerirá para su logro un régimen de inmunosupresión. (26)

A pesar de que algunas compañías comerciales biotecnológicas pretenden mostrar el problema del xenotrasplante como algo resuelto, apresurando así la ejecución de ensayos clínicos, todavía deben resolverse muchos aspectos prácticos para su aplicación. Como se ha visto, el volumen de conocimientos acumulados hasta el momento permite plantear bases teóricas claras para la generación de xenoinjertos compatibles. A partir de aquí será necesario un extraordinario y paciente trabajo de laboratorio con el fin de encarar el xenotrasplante cardíaco con posibilidades de éxito.

SUMMARY

THE FUTURE OF HEART XENOTRANSPLANTS

Current development of molecular biology and DNA-recombinant technology preview the generation of genetically engineered xenografts compatible with human tissues. A feasible design to construct a cardiac xenograft using a phylogenetically disparate donor (swine) consist in redubing α -galactosyl epitope density on celular surface by transferring and overexpressing human fucosyltransferase in the seine, to produce in the animal an epitope similar to human H antigen. Simultaneous strategy of fucosyltransferase expression and complement blockage (by expressing complement regulatory proteins) associated to immunosuppressive drugs, could be enough to prevent hyperacute and acute rejection.

Transference and expression of genes could be done by artificially ex-vivo organ perfussion or by creating transgenic animals from germinal cell line. Current knowledge lets propose a clear theoretically basis for compatible xenografts construction.

Key words Heart transplant - Molecular biology - Xenotransplants

BIBLIOGRAFIA

1. Nowak R. Xenotransplants set to resume. *Science* 1994; 266: 1148.
2. Galili U. Interaction of the natural anti-Gal antibody with α -galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immun Today* 1993; 14: 480.
3. Platt JL, Lindman BJ, Chen H, Spitalnik SL, Bach FH. Endothelial cell antigens recognized by xenoreactive human natural antibodies. *Transplantation* 1990; 50: 870.
4. Zhao Z, Termignon JL, Cardoso J y col. Hyperacute xenograft rejection in the swine-to-human donor-recipient combination. *Transplantation* 1994; 57: 245.
5. Paulson JC, Colley KJ. Glycosyltransferases: structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* 1989; 264: 17615.
6. Larsen RD, Rayan VP, Ruff MM y col. Isolation of a cDNA encoding a murine UDP galactose: β -D-galactosyl-1,4-N-acetyl-D-glucosaminide α -1,3-galactosyltransferase: Expression cloning by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8227.
7. Joziassse DH, Sharper JH, Van den Eijnden DH, Van Tunen AJ, Sharper NL. Bovine α 1,3-galactosyltransferase: isolation and characterization of a cDNA clone. Identification of homologous sequences in human genomic DNA. *J Biol Chem* 1989; 264: 14290.
8. Sandrin MS, McKenzie IFC. Gal α (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognized in pigs by human natural antibodies. *Immunol Rev* 1994; 141: 169.
9. Larsen RD, Rivera-Marrero CA, Ernst LI, Cummings RD, Lowe JB. Frameshift and non sense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal: β -D-Gal1,4-D-GlcNAc α 1,3-galactosyltransferase cDNA. *J Biol Chem* 1990; 265: 7055.
10. Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990; 345: 229.
11. Joziassse DH, Sharper JH, Jabs EW, Sharper NL. Characterization of an α 1,3-galactosyltransferase homologue on human chromosome IX that is organized as a processed pseudogene. *J Biol Chem* 1991; 266: 6991.
12. Sandrin MS, Vaughan HA, McKenzie IFC. Identification of Gal α (1-3)Gal as the major epitope for pig-to-human vascularized xenografts. *Transplantation Rev* 1994; 8: 134.
13. Gustafsson K, Strahan K, Preece A. α 1,3 galactosyltransferase: a target for in vivo genetic manipulation in xenotransplantation. *Immunol Rev* 1994; 141: 59.
14. Coutelle C, Douar AM, Colledge WH, Froster U. The challenge of fetal gene therapy. *Nature Med* 1995; 9: 864.
15. Bach FH, Robson SC, Winkler H y col. Barriers to xenotransplantation. *Nature Med* 1995; 1: 869.
16. Gerritsen ME, Bloor CM. Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J* 1993; 7: 523.
17. Cozzi E, White DJG. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nature Med* 1995; 1: 964.
18. Pruitt SK. The effect of soluble complement receptor type I on hyperacute rejection of porcine xenografts. *Transplantation* 1994; 57: 363.
19. Ryan US. Complement inhibitory therapeutics and xenotransplantation. *Nature Med* 1995; 1: 967.
20. Mc Curry KR, Kooyman DL, Alvarado CG y col. Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nature Med* 1995; 1: 423.
21. Moran N. Pig-to-human heart transplant slated to begin in 1996. *Nature Med* 1995; 10: 987.
22. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke

- RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995; 377: 630.
23. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456.
24. Vaux DL. Ways around rejection. *Nature* 1995; 377: 576.
25. Stoye JP, Coffin JM. The dangers of xenotransplantation (Letter). *Nature Med* 1995; 1: 1100.
26. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M y col. Chimerism and donor specific nonreactivity 27 to 29 years after kidney allotransplantation. *Transplantation* 1993; 55: 1272.