

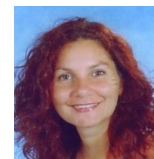
Xenotrapianto: risultati recenti e ostacoli da superare

Lecture magistrali

Marta Vadori¹, **Elisa Cuciz**², **Emanuele Cozzi**^{1,2}

¹ Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari, e Sanità Pubblica, Università di Padova, Via Giustiniani, 5, 35128 Padova, Italia

² Unità Operativa di Immunologia dei Trapianti, Azienda Ospedale-Università di Padova, Via Giustiniani, 2, 35128 Padova, Italia



Marta Vadori

Corrispondenza a:

Emanuele Cozzi, M.D, Ph.D.

Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche Vascolari, e Sanità Pubblica, Università di Padova,

Unità Operativa di Immunologia dei Trapianti, Azienda Ospedale-Università di Padova

Via Giustiniani, 2, 35128 Padova, Italia

Email: emanuele.cozzi@unipd.it

Tel/Fax: +39 049 821 8841

ABSTRACT

Lo xenotrapianto, o trapianto tra individui di specie diverse, è stato a lungo studiato con l'obiettivo di risolvere la carenza di organi, tessuti e cellule umane per il trapianto clinico. Decenni di ricerca hanno convinto gli scienziati che il maiale è la specie donatrice più appropriata. Infatti, oltre alle numerose somiglianze anatomiche e fisiologiche del maiale con l'uomo, l'allevamento di questo si presta a fornire il gran numero di animali necessario a soddisfare la domanda clinica.

Negli ultimi anni, la ricerca nel campo dello xenotrapianto di organi solidi ha compiuto progressi sensazionali. In particolare studi in vitro e ricerche precliniche, che utilizzano il primate non umano come ricevente di organi di maiale, hanno chiarito i principali ostacoli immunologici e fisiologici allo xenotrapianto e hanno fornito una migliore comprensione dei meccanismi alla base delle lesioni osservate nel rigetto di uno xenotrapianto. Tutto ciò ha portato allo sviluppo di maiali donatori geneticamente modificati più compatibili con l'uomo.

Questa revisione della letteratura illustra i principali ostacoli immunologici, fisiologici e di biosicurezza da superare nello xenotrapianto di organi solidi. Sono anche riportati alcuni spunti di discussione riguardanti sia il donatore ideale che la selezione dei candidati più adatti per i primi studi clinici. Particolare attenzione è stata riservata alle procedure di xenotrapianto di rene. La revisione della letteratura recente suggerisce che mai come oggi gli ostacoli critici di natura immunologica e fisiologica sono percepiti come superabili.

PAROLE CHIAVE: enotrapianto, rene, maiale ingegnerizzato, selezione del paziente, fisiologia

Introduzione

La disponibilità molto limitata di organi, cellule e tessuti umani rimane la più grande barriera all'espansione della medicina dei trapianti. In tutto il mondo il divario tra la richiesta di organi e il numero di trapianti eseguiti è ampio ed in aumento. Questo ha spinto la comunità scientifica internazionale a cercare fonti alternative di organi, cellule e tessuti, con particolare attenzione allo sviluppo di nuove conoscenze anche nel settore dello xenotrapianto.

Con il termine xenotrapianto (dal greco *xenos*: straniero) oggi si intende qualsiasi procedura di trapianto, impianto o infusione in un ricevente umano di cellule, tessuti o organi vivi di provenienza da altra specie animale. Nello stesso termine si comprendono fluidi, cellule, tessuti o organi umani che abbiano avuto un contatto ex vivo con cellule, tessuti o organi di altra specie animale.

Lo xenotrapianto offre almeno in teoria parecchi vantaggi (numero illimitato di cellule, tessuti e organi; organi di ogni taglia; cellule, tessuti e organi disponibili in maniera elettiva; cellule, tessuti e organi privi di infezioni; rispetta le barriere culturali alla donazione di organi umani da donatore deceduto) e sin dal diciannovesimo secolo si cominciò ad esplorarne l'applicazione clinica nell'uomo mediante trasfusioni di sangue o trapianti di cute e/o organi solidi di specie animali non umane con perdita precoce dello xenotrapianto nel giro di minuti o ore, nella maggior parte dei casi.

I primati non umani figurano tra le specie donatrici utilizzate nei primi studi clinici. Questo impiego, tuttavia, è associato a problemi di natura etica, economica e di biosicurezza che hanno spostato l'attenzione dei ricercatori verso il maiale quale potenziale specie donatrice per l'uomo. Il maiale, infatti, oltre ad avere anatomia e fisiologia per molti aspetti simili all'uomo, comporta minori problemi di natura etica; basti pensare che, per soli scopi alimentare, negli Stati Uniti ogni anno vengono macellati più di 50 milioni di maiali. Inoltre, il maiale permette di ottenere rapidamente un grande numero di donatori grazie al breve periodo di gestazione, alla pluriparità e alla rapida crescita della progenie.

In questa breve revisione della letteratura, verranno illustrati gli avanzamenti delle conoscenze nel settore dello xenotrapianto. Particolare attenzione sarà rivolta ai risultati conseguiti nello xenotrapianto di rene che, dopo i traguardi importanti raggiunti nel settore della ricerca preclinica, hanno permesso l'avvio delle prime applicazioni cliniche dello xenotrapianto dal maiale all'uomo.

Applicazione clinica dello xenotrapianto: le barriere da superare

a) Gli ostacoli immunologici

Il rigetto anticorpo-mediato

La componente umorale della risposta immunitaria è da sempre considerata la barriera principale alla sopravvivenza a breve e lungo termine di un organo xeno-trapiantato.

Come nel trapianto tra individui della stessa specie (allo-trapianto), anche in un contesto xenogenico gli anticorpi possono innescare diversi tipi di rigetto, in particolare il rigetto iperacuto (*hyperacute rejection* o HAR) e il rigetto acuto anticorpo-mediato (*acute humoral xenograft rejection* o AHXR).

Il rigetto iperacuto avviene a distanza di minuti o ore dal trapianto a causa del legame di anticorpi del ricevente formati prima del trapianto d'organo. La successiva attivazione della cascata del complemento determina un danno endoteliale severo, formazione di trombi e deposito di fibrina. Si osserva accumulo di neutrofili nei capillari del trapianto, e occlusione trombotica dei capillari stessi con conseguente necrosi fibrinoide. Il risultato finale è una rapida e irreversibile perdita dell'organo [1].

Come nell'allograft, il rigetto acuto anticorpo-mediato di uno xenotrapianto avviene a distanza di giorni o mesi dal trapianto ed è solitamente indotto dalla produzione da parte del ricevente di una risposta anticorpale *de novo* verso antigeni dell'organo trapiantato. Le caratteristiche istologiche dell'AHXR comprendono deposizione di IgM, IgG, C4d e C5b-9, perdita di integrità capillare, necrosi delle cellule endoteliali ed estesi depositi di fibrina. Gli aspetti istologici delle lesioni sono in gran parte influenzati dall'isotipo e dalla specificità degli anticorpi coinvolti, dal tipo di organo trapiantato, dalle caratteristiche del donatore dell'organo e dall'intervento immunosoppressivo messo in atto per prevenire il rigetto anticorpo-mediato [2, 3]. L'AHXR può essere causato da IgM o IgG. In entrambi i casi l'attivazione della cascata del complemento rappresenta un elemento chiave nello sviluppo del danno che dovrà essere accuratamente controllata [4]. La citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC), l'attivazione della cascata infiammatoria, l'induzione di un fenotipo pro-coagulativo con conseguente attivazione della coagulazione e della trombosi rappresentano ulteriori meccanismi di danno legati alla risposta umorale nei confronti degli xeno-antigeni.

Nel contesto dello xenotrapianto grande attenzione è stata rivolta verso i carboidrati legati alle proteine o ai lipidi di superficie delle cellule quali principali antigeni bersaglio. Il target più importante degli anticorpi naturali o *de novo* umani è il residuo α Gal ($\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}\beta4\text{Glc-Nac-R}$), un dimero di galattosio ($\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}$) legato alla N-acetil-lattosamina, sintetizzato dall'enzima α 1,3-galattosiltransferasi (α 1-3 GalT), un enzima presente nei mammiferi ma non nell'uomo e nei primati non umani del Vecchio Mondo [5]. Grazie ai progressi della biologia molecolare e dell'ingegneria genetica, sono stati ottenuti maiali knock-out (KO) per il gene α 1-3GT (animali quindi privi dell'epitopo α Gal: animali GTKO) [6].

Tuttavia, l' α Gal non è l'unico epitopo glucidico riconosciuto dagli anticorpi xeno-reattivi umani. Grazie alle ricerche pre-cliniche degli ultimi anni sono stati individuati altri due target glucidici supplementari, il Neu5GC e il Sda.

L'antigene Neu5GC fa parte della famiglia degli acidi sialici e deriva dalla idrossilazione dell'acido N-acetilneuraminico (Neu5AG). Tale reazione è catalizzata dall'enzima CMP-Neu5Ac-idrossilasi (CMAH) presente nei tessuti di molti mammiferi ma non nell'uomo. Per questa ragione tale residuo risulta essere immunogenico per l'uomo. Anche in questo caso è stato possibile ottenere maiali ingegnerizzati privi degli enzimi α 1-3 GalT e CMAH e il loro impiego ha dimostrato di avere effetti benefici al fine di diminuire sia il legame che la citotossicità degli anticorpi umani diretti contro le cellule di maiale [7].

Studi successivi hanno tuttavia dimostrato che quasi il 100% dei sieri umani possiede anche IgM e IgG dirette verso l'Sda, un antigene di un gruppo sanguigno raro sintetizzato dalla β 1,4-N-acetilgalattosamiltransferasi [8].

L'avvento della tecnologia CRISPR/Cas9, una tecnica di editing del genoma altamente precisa, efficace e di facile utilizzo, ha permesso di generare maiali knock-out per tutte le glicosiltransferasi/idrossilasi precedentemente descritte [9].

Uno studio recente ha dimostrato che l'uomo di solito non possiede anticorpi preformati verso questi animali "triple knock out" (TKO) [10]. Tuttavia, alcuni soggetti presentano anticorpi diretti contro il maiale TKO. Ulteriori approfondimenti hanno evidenziato che tali anticorpi riconoscono antigeni del complesso di maggiore istocompatibilità del maiale (swine leukocyte antigen, SLA) di classe I e II [10, 11].

Questo risultato non è del tutto inatteso, giacché i sistemi maggiori di istocompatibilità porcino (SLA) e umano (HLA) hanno tipicamente una omologia di circa il 75% a livello di sequenza amminoacidica ed hanno una struttura tridimensionale molto simile [10].

Rigetto cellulo-mediato dello xenotrapianto

Come nell'allotrapianto, anche uno xenotrapianto può attivare una risposta cellulo-mediata in aggiunta ad una potente risposta umorale. È stato infatti dimostrato che sia le cellule dell'immunità innata sia quelle della immunità adattativa possono causare un danno ai tessuti ed agli organi xenogenici, spesso a causa dell'esistenza di diverse incompatibilità molecolari recettoriali tra specie e della conseguente disregolazione dei segnali di attivazione/inibizione che governano finemente le cellule del sistema immunitario.

Nel caso dell'immunità innata è stato ad esempio dimostrato che le cellule NK infiltrano rapidamente xenotrapianti suini perfusi ex vivo con sangue umano. L'attivazione dei recettori NKp44 or NKG2D delle cellule NK umane da parte di ligandi espressi sulle cellule di maiale, quali ad esempio l'ULPB, associata al mancato riconoscimento delle molecole SLA-1 da parte dei recettori inibitori delle NK umane, porta alla lisi cellulo-mediata delle cellule di maiale. In un contesto xenogenico, inoltre, le cellule NK oltre a mediare l'ADCC interagiscono con i linfociti B della zona marginale della milza mediante l'interazione tra CD40 e CD154, e stimolano la produzione di anticorpi xenoreattivi con un meccanismo linfocita T-indipendente [12].

Un ruolo fondamentale nel rigetto di uno xenotrapianto è rivestito dai monociti e macrofagi che consentono l'attivazione e il reclutamento dei linfociti T CD4+ e CD8+ ed esercitano la loro attività fagocitica. Anche in questo caso la mancata compatibilità tra il recettore inibitore dei macrofagi umani SIRP- α ed il CD47 sulle cellule di maiale favorisce l'attività fagocitica dei macrofagi [13].

Anche le cellule T sono coinvolte nel rigetto di uno xenotrapianto. L'analisi istologica di organi di maiale trapiantati nel primate non umano e rigettati spesso evidenzia infiltrati di cellule T CD4+ e CD8+ associati a monociti/macrofagi, cellule B e NK. Analogamente al contesto allogeneico, le cellule T dell'uomo possono reagire contro le cellule di maiale riconoscendo direttamente le molecole SLA o possono riconoscere indirettamente gli xenoantigeni processati presentati dall'MHC-self. Il riconoscimento dell'antigene in un contesto xenogenico per via indiretta da parte dei linfociti T CD4+ risulta essere più vigoroso rispetto al contesto allogeneico, probabilmente a causa del maggior numero di xenoantigeni presentati dalle *antigen presenting cells* (APC) umane [14]. Inoltre, è stato riportato che i principali epitopi xenogenici riconosciuti indirettamente dalle cellule T sulle APC umane sono antigeni derivati dalle molecole SLA di classe I [14]. È stato anche dimostrato che particolari alleli SLA sono in grado di indurre una risposta cellulare molto elevata. Allo stesso modo, soggetti con particolari configurazioni alleliche HLA sono risultati "*strong responders*" verso cellule di maiale [15]. Questi dati sottolineano che un'accurata selezione del donatore e del ricevente è importante per proteggere l'organo trapiantato non solo dalla risposta umorale ma anche da quella cellulo-mediata.

Complessivamente, i dati ottenuti in vitro e in vivo sottolineano in maniera incontrovertibile l'esistenza di una vigorosa risposta T-mediata verso organi xenotrapiantati che deve essere controllata con farmaci immunosoppressori convenzionali o attraverso il blocco delle molecole co-stimolatorie. In particolare, l'approccio maggiormente perseguito è il blocco della via di attivazione CD40-CD154, mediante anticorpi monoclonali anti-CD40 o anti-CD154, che risulta essere efficace anche nel prevenire la risposta anticorpale linfocita T-dipendente.

b) Fisiologia

La sperimentazione condotta in modelli clinicamente rilevanti suggerisce che gli organi di maiale sono sufficientemente simili a quelli umani da poterne soddisfare le necessità fisiologiche e funzionali. Esistono tuttavia delle differenze fisiologiche che vanno approfondite al fine di permettere una possibile applicazione clinica di successo.

È esperienza di tutti i gruppi di ricerca che la sopravvivenza di un organo xeno-trapiantato nel modello maiale-primate sia gravemente limitata da una alterata regolazione della cascata della coagulazione, spesso associata a trombosi [16, 17]. Le cause sono essenzialmente riconducibili a: attivazione delle cellule endoteliali dell'organo che assumono un profilo pro-coagulante; espressione del Fattore Tissutale sulle piastrine del ricevente indotta dalle cellule endoteliali di maiale; incompatibilità molecolari che impediscono a molecole anticoagulanti endoteliali del maiale di controllare adeguatamente fattori della coagulazione del primate. A tal proposito è stato dimostrato che: la molecola *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) di maiale non blocca efficientemente il complesso TF/Fattore VIIa umano; la trombomodulina di maiale lega la trombina umana ma non permette un'attivazione adeguata della proteina C umana; il Fattore di von Willebrand suino contribuisce all'eccessiva attivazione della coagulazione e trombosi nel primate. L'alterata regolazione della coagulazione porta in molti casi allo sviluppo di microangiopatia trombotica con perdita dell'organo, si associa frequentemente a coagulopatia da consumo con sanguinamenti importanti e non sembra dipendere solamente dalla risposta anticorpo mediata [18].

Focalizzando l'attenzione sugli aspetti anatomici, il rene di maiale ha la stessa organizzazione del rene umano ma possiede un minor numero di nefroni ed un numero ridotto di nefroni con ansa di Henle lunga [19]. Conseguentemente, rispetto all'uomo, i reni di maiale hanno una ridotta capacità di concentrare l'urina. Tuttavia il rene di maiale è in grado di mantenere gli elettroliti principali (compresi sodio, potassio e cloro) in un range fisiologicamente normale [20]. La velocità di filtrazione glomerulare (GFR) ed il flusso ematico renale sono sostanzialmente sovrapponibili tra uomo e maiale, così come è paragonabile la proteinuria tra le due specie. Rimangono tuttavia delle differenze tra maiale e primate. Ad esempio, l'osmolalità delle urine è più bassa nel maiale. Allo stesso modo vi sono delle differenze considerevoli a livello dei mediatori ormonali che regolano la funzionalità renale nelle due specie, il cui impatto reale nell'uomo potrà essere definitivamente chiarito solo dopo i primi trial clinici. In particolare: (i) l'angiotensinogeno umano non sembra essere un substrato ottimale per la renina prodotta dal rene di maiale e resta quindi da definire l'efficienza del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) dopo uno xenotrapianto; (ii) l'ormone antidiuretico umano (ADH) è strutturalmente diverso da quello suino e risulta meno potente verso i recettori presenti sull'organo di maiale. Questo potrebbe portare ad una diminuzione nel riassorbimento dell'acqua e a una ridotta capacità di concentrare le urine dopo uno xenotrapianto; (iii) sebbene molto simile a quella umana, l'eritropoietina renale del maiale non sembra essere in grado di stimolare adeguatamente l'eritropoiesi nel primate, cosa che potrebbe spiegare l'anemia sistematicamente osservata dopo xenotrapianto di rene nel primate non umano [21, 22]. Il pH ematico è simile tra uomo e maiale. Tuttavia, resta ancora da chiarire la capacità del rene di maiale di espellere i fosfati e l'impatto del rene di maiale sui meccanismi di regolazione dei livelli del calcio e del fosfato.

c) Biosicurezza dello xenotrapianto

Come nell'allotrapianto, anche lo xenotrapianto è associato al rischio di infezioni legato all'impiego di terapie immunosoppressive, che prevengono il rigetto ma che abbassano anche le difese immunologiche del soggetto trapiantato nei confronti delle infezioni. In questo caso però, oltre alle infezioni comuni causate da patogeni nell'uomo (quali ad esempio il virus citomegalico (CMV) o il virus di *Epstein-Barr* (EBV) umani), vi è anche il rischio potenziale di trasmissione di infezioni di origine suina.

Al momento, i patogeni che potrebbero essere problematici in ambito xenogenico sono: (i) quelli che rimangono in forma latente a livello intracellulare in un soggetto asintomatico come il citomegalovirus di maiale (pCMV), l'herpes virus linfotropico di maiale (PHLV), il virus dell'epatite E (HEV) e i retrovirus endogeni del maiale (Porcine Endogenous RetroVirus o PERV); (ii) eventuali

microrganismi ancora ignoti che pertanto richiedono un continuo monitoraggio post trapianto [23].

Il pCMV e il PHLV sono due herpes virus con capacità di infettare le cellule umane. L'infezione da pCMV può causare nell'organo trapiantato una attivazione endoteliale e una coagulopatia sistemica e può portare a rigetto dello xenotrapianto, mentre i PHLV potrebbero causare linfomi nell'ospite infettato. Sino ad oggi infezioni da pCMV erano state riportate solo in modelli preclinici nei quali la loro presenza era stata dimostrata essere inequivocabilmente correlata con una ridotta sopravvivenza di uno xenotrapianto [24–26]. Recentemente è stata riportata un'inaspettata infezione da pCMV nel paziente ricevente un cuore di maiale nella sperimentazione clinica condotta dall'Università di Maryland, il cui impatto sarà fonte di ulteriori approfondimenti [27].

Per quanto riguarda i PERV, ne esistono 3 sottotipi: il PERV-A, PERV-B e PERV-C. I PERV- A e -B hanno un tropismo per le cellule umane, mentre il PERV-C non è in grado di infettare le cellule umane. Il PERV-C può però permettere la formazione della variante ricombinante PERV-A/C che è in grado di infettare le cellule umane e replicarsi in maniera maggiore del PERV-A [28]. Tuttavia, è importante sottolineare che a tutt'oggi non esistono evidenze di infezioni da PERV sia in modelli preclinici maiale-primate non umano che nei recenti studi clinici [29–32].

È degno di nota che molti dei patogeni potenzialmente presenti negli animali donatori possono essere eliminati. In particolare, recentemente è stato possibile generare una linea di maiali nei quali i PERV sono stati inattivati grazie all'applicazione della tecnica di editing genomico CRISPR/Cas9 [33–35]. In ogni caso, sebbene il rischio di trasmissione all'uomo di infezione attraverso uno xenotrapianto appaia oggi molto limitato, esso deve comunque essere contenuto al massimo. A questo scopo è necessaria anche una minuziosa sorveglianza microbiologica degli animali donatori cresciuti in allevamenti barrierati, i cosiddetti animali “designated pathogen-free” (DPF). Questa designazione è riservata a maiali saggiati per una lista di potenziali patogeni umani e suini che sono stati esclusi dall'allevamento. Inoltre, le misure di sicurezza dello xenotrapianto devono prevedere il monitoraggio rigoroso e per tutta la vita dei riceventi di uno xenotrapianto (e preferibilmente dei loro contatti stretti), la raccolta di campioni da archiviare in biobanche per possibili indagini retrospettive, nonché lo sviluppo e validazione di test PCR quantitativi altamente sensibili per valutare la possibile presenza virus porcini nelle cellule umane.

Ingegnierizzazione dell'animale donatore ideale per uno xenotrapianto

Da quanto sopra esposto è evidente che l'immunità naturale e adattiva, così come l'infiammazione e le deregolazioni della coagulazione, sono tutti fattori che possono contribuire alla perdita prematura di uno xenotrapianto di maiale nell'uomo. Di conseguenza gli esperti del settore sono convinti che diversi approcci dovranno essere necessariamente applicati in maniera sinergica per contrastare i vari meccanismi immunitari e non coinvolti in questo processo [36]. In particolare, a questo punto si pensa che una sopravvivenza a lungo tempo di uno xenotrapianto potrà essere possibile solo con l'impiego di agenti immunosoppressori diretti contro l'attivazione del complemento e contro la risposta T e B, possibilmente in combinazione con nuove linee di suini transgenici knock-out e knock-in per diversi geni umani (Tabella 1). Molteplici studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato in maniera convincente che ad oggi la miglior fonte di organi di maiale per lo xenotrapianto deve prima di tutto essere priva degli epitopi zuccherini maggiormente riconosciuti dalla risposta immunitaria anticorpale. Questo è reso possibile attraverso l'ingegnerizzazione di linee di maiali GalTKO/ CMAHKO/ β 4GalINT2KO. Inoltre, la linea donatrice dovrà esprimere una o più molecole regolatorie della cascata del complemento umano (hCD46, hCD55, hCD59), una o più molecole regolatorie della cascata della coagulazione (trombomodulina e recettore della proteina C endoteliale [EPCR]), e preferibilmente anche molecole umane anti-infiammatorie/anti-apoptotiche

(hHO-1, hA20). In aggiunta appare preferibile che l'animale donatore sia transgenico per molecole in grado di modulare l'attività fagocitica dei macrofagi (quali hCD47). Infine, per poter contrastare la crescita dell'organo di maiale dopo il trapianto, è stata suggerita un'ulteriore manipolazione genetica in grado di silenziare il gene del recettore dell'ormone della crescita (GH-KO). È degno di nota che organi con queste caratteristiche sono già stati utilizzati nei recenti xenotrapianti nell'uomo eseguiti in Alabama e nel Maryland [27, 32].

Data l'evidenza che le molecole SLA di classe I e II possono costituire un bersaglio per l'immunità umorale e cellulare dell'uomo, sono in corso diversi tentativi sperimentali per eliminare tali antigeni dagli organi di maiali donatori [37, 38].

Infine, alla luce di quanto spiegato sopra, è chiaro che l'ingegnerizzazione del donatore potrà anche contribuire ad aumentare i livelli di sicurezza dello xenotrapianto.

Ingegnerizzazione		Applicazione in clinica		
Obiettivo	Tipo	Xeno-rene ([31])	Xeno-rene ([32])	Xeno-cuore ([27])
Rimozione di determinanti antigenici				
α1,3-galattosiltransferasi (GALT)	Knock-out	✓	✓	✓
Idrossilasi CMP-Neu5Ac (CMAH)	Knock-out		✓	✓
β1,4 N-acetilgalattosaminil transferasi (β4GalNT2)	Knock-out		✓	✓
Regolazione della cascata del complemento				
CD46 umano	Transgene		✓	✓
CD55 umano	Transgene		✓	✓
CD59 umano	Transgene			
Regolazione della cascata della coagulazione				
Inibitore del fattore tissutale umano (TFPI)	Transgene			
Trombomodulina umana	Transgene		✓	✓
Recettore endoteliale della proteina C umana	Transgene		✓	✓
CD39 umano	Transgene			
Regolazione della infiammazione e dell'apoptosi				
A20 umano	Transgene			
Emeossigenasi-1 (HO-1) umano	Transgene		✓	✓
Controllo della fagocitosi				
CD47 umano	Transgene		✓	✓
SIRPα umano	Transgene			
Controllo della risposta cellulo-mediata				
MHC-Classe I (MHC-I-KO)	Knock-out			
FAS ligand (CD95L) umano	Transgene			
Prevenzione dell'infezione da PERV				
Geni PERV	Knock-out			
Regolazione della crescita dell'organo				
Recettore dell'ormone della crescita	Knock-out		✓	✓

Tabella 1: Ingegnerizzazione di linee di maiali per possibili applicazioni pre-cliniche e cliniche dello xenotrapianto

Primi trials clinici e selezione dei candidati per procedure di xenotrapianto

Una volta identificato ed ottenuto il donatore ottimale per una applicazione clinica dello xenotrapianto, rimane da stabilire quali pazienti possano essere eticamente selezionati per i primi trials clinici [39, 40]. Nel caso del trapianto di rene, alcuni ricercatori hanno proposto che i candidati ideali per uno xenotrapianto potrebbero essere quei pazienti in lista d'attesa per un allotrapianto con ridotta aspettativa di vita (inferiore ai 2 anni) i quali difficilmente potrebbero ricevere un organo da donatore umano. In questo caso i pazienti in attesa di un trapianto di rene sono i candidati ideali,

in quanto, a differenza dei pazienti in attesa di un cuore, l'organo trapiantato potrebbe essere rimosso qualora si registrasse insufficienza d'organo, o sviluppo di infezioni con necessità di interruzione della terapia immunosoppressiva. In questo caso, infatti, il paziente potrebbe tornare in dialisi ed essere mantenuto in vita. Altri hanno proposto che possibili candidati potrebbero anche essere pazienti in età avanzata e condizioni fisiche accettabili, per i quali si prevede una lunga permanenza in lista d'attesa. Questi soggetti potrebbero voler prendere in considerazione lo xenotrapianto renale al fine di migliorare la propria qualità di vita, senza le restrizioni imposte dalla dialisi cronica mentre sono in attesa di un allotrapianto. Altra categoria di pazienti potenzialmente candidabili per i primi xenotrapianti di reni è costituita da coloro i quali hanno una alta probabilità di ricorrenza di malattia in caso di un possibile allotrapianto, ma non nel caso dello xenotrapianto, come la glomerulopatia da C3 o la nefropatia da IgA [41, 42].

Infine, meritano particolare attenzione i pazienti iperimmunizzati di qualsiasi età con alti livelli di anticorpi anti-HLA (PRA superiore al 99%), per i quali la probabilità di avere accesso a un allotrapianto è praticamente nulla. In questo caso i possibili candidati allo xenotrapianto saranno coloro nei quali gli anticorpi anti-HLA non cross-reagiscono con gli antigeni SLA del maiale donatore. Naturalmente il maiale ideale in questo caso è rappresentato dall'animale ingegnerizzato privo di molecole SLA.

Recenti risultati preclinici ed avvio degli studi clinici nello xenotrapianto di rene

Come precedentemente riportato, lo xenotrapianto di rene rappresenta la procedura più appropriata per l'inizio della sperimentazione clinica nell'uomo. Questa affermazione risulta anche sostenuta dai risultati favorevoli ottenuti di recente sia in ambito preclinico nel primate non umano che nell'uomo.

La più lunga sopravvivenza di uno xenotrapianto di rene di maiale salvavita in un primate non umano riportata in letteratura è di 499 giorni [43]. Tale risultato è stato possibile mediante l'applicazione sinergica di strategie innovative atte a controllare sia l'immunità umorale che la risposta T cellulo-mediata. Inoltre i reni xenotrapiantati sono stati ottenuti da maiali GalTKO transgenici per la molecola regolatrice del complemento hDAF (CD55). I macachi rhesus riceventi sono stati selezionati tra quelli con titoli più bassi di anticorpi anti-donatore preformati mediante cross-match donatore/ricevente. La terapia di induzione prevedeva l'utilizzo di un anticorpo monoclonale anti-CD4, mentre la terapia di mantenimento consisteva nella inibizione del pathway costimolatore CD40-CD154 mediante l'impiego di un anticorpo monoclonale anti-CD154 in combinazione con micofenolato mofetile e steroidi. Questi risultati enfatizzano l'importante ruolo delle cellule T-CD4+ nel rigetto dello xenotrapianto di rene e ribadiscono la necessità di utilizzare inibitori delle molecole co-stimolatorie nella terapia immunosoppressiva dopo xenotrapianto.

Alla luce di questi studi preclinici molto incoraggianti è stato autorizzato negli Stati Uniti l'avvio delle prime applicazioni nell'uomo dello xenotrapianto di rene. Sino ad oggi sono stati riportati in letteratura tre casi di soggetti in stato di morte cerebrale, ma con conservate funzioni cardiovascolari, che hanno ricevuto uno xenotrapianto di rene. In due casi sono stati trapiantati un rene da maiale GTKO che comprendeva anche tessuto timico del maiale con l'obiettivo di modulare la risposta T-cellulare [31]. La terapia immunosoppressiva è stata fatta utilizzando micofenolato mofetile e metilprednisolone. La sperimentazione è durata 54 ore, dopo di che l'organo è stato espantato. Per tutta la durata della sperimentazione i reni xenotrapiantati sono rimasti ben perfusi, la filtrazione glomerulare è aumentata ed hanno continuato a produrre abbondanti quantità di urina; i livelli di creatinina si sono ridotti, senza comparsa di proteinuria. L'analisi istologica ha escluso la presenza di rigetto anticorpo- o cellulo-mediato, anche se in un caso sono stati evidenziati

depositi focali di C4d. In aggiunta non è stato evidenziato alcun segnale di deregolazione della cascata della coagulazione.

Questi risultati sono stati in parte replicati da un secondo gruppo di ricerca [32]. In questo caso, una volta accertata la morte celebrale, il paziente è stato nefrectomizzato e sono stati trapiantati entrambi i reni ottenuti da un maiale ingegnerizzato con 10 modifiche genetiche (riportate nella Tabella 1). La sperimentazione è stata condotta per 74 ore durante le quali la funzionalità renale è stata mantenuta in termini di produzione di urina anche se la clearance della creatinina non è migliorata. Istologicamente sin dall'inizio si è osservata una microangiopatia trombotica di grado moderato che non è progredita nel tempo e che non era associata a depositi di anticorpi, di complemento o a rigetto cellulo-mediato.

A questo punto è importante sottolineare che in entrambi questi studi, che si sono avvalsi di maiali donatori con alto profilo di sicurezza (DPF) associato a monitoraggio microbiologico assiduo del ricevente, non c'è stata nessuna evidenza di trasmissione di infezione all'uomo, in particolare da PERV.

Nonostante il breve periodo di follow-up legato alla particolare condizione sperimentale utilizzata, questi studi fanno ben sperare che organi appropriatamente ingegnerizzati in combinazione con un adeguato protocollo immunosoppressivo siano in grado di svolgere le normali funzioni fisiologiche di un rene in vista di una più ampia applicazione clinica futura.

Conclusioni

La carenza cronica di organi, cellule e tessuti umani per la cura di malati, unita al loro sempre più crescente fabbisogno, ha dato un grosso impulso alla ricerca di fonti alternative di organi. In quest'ambito lo xenotrapianto rappresenta una delle vie correntemente esplorate dai ricercatori. In particolare, grazie alla sua somiglianza anatomica e fisiologica con l'uomo, alla sua crescita veloce e ad aspetti economici ed etici, il maiale è stato individuato come la specie più promettente per una possibile applicazione clinica dello xenotrapianto.

Una migliore comprensione dei meccanismi immunitari responsabili del rigetto di uno xenotrapianto ha permesso di ottenere animali ingegnerizzati maggiormente compatibili con l'uomo e lo sviluppo di nuove terapie immunosoppressive. Allo stesso modo è stato possibile generare animali in grado di superare alcune incompatibilità fisiologiche tra maiale e primate, e con un aumentato profilo di sicurezza.

Questi progressi hanno permesso di prolungare significativamente la sopravvivenza di xenotrapianti di maiale nel primate non umano e hanno consentito l'avvio prudente di sperimentazioni cliniche nell'uomo fino ad oggi ritenute impossibili.

BIBLIOGRAFIA

1. Ierino FL, Sandrin MS. Spectrum of the early xenograft response: from hyperacute rejection to delayed xenograft injury. *Crit Rev Immunol*. 2007;27(2):153-66. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v27.i2.30>.
2. Shimizu A, Yamada K, Robson SC, et al. Pathologic characteristics of transplanted kidney xenografts. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Feb;23(2):225-35. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011040429>.
3. Rosales IA, Colvin RB. The pathology of solid organ xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2019 Oct;24(5):535-542. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000681>.
4. Cozzi E, Langford GA, Richards A, Elsome K, Lancaster R, Chen P, Yannoutsos N, White DJ. Expression of human decay accelerating factor in transgenic pigs. *Transplant Proc*. 1994 Jun;26(3):1402-3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7518135/>.
5. Galili U, Shohet SB, Kobrin E, et al. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem*. 1988 Nov 25;263(33):17755-62. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2460463/>.
6. Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*. 2003 Jan 17;299(5605):411-4. <https://doi.org/10.1126/science.1078942>.
7. Burlak C, Wang ZY, Chihara RK, et al. Identification of human preformed antibody targets in GTKO pigs. *Xenotransplantation*. 2012 Mar-Apr;19(2):92-101. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2012.00695.x>.
8. Gao B, Long C, Lee W, et al. Anti-Neu5Gc and anti-non-Neu5Gc antibodies in healthy humans. *PLoS One*. 2017 Jul 17;12(7):e0180768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180768>.
9. Estrada JL, Martens G, Li P, et al. Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/ β 4GalNT2 genes. *Xenotransplantation*. 2015 May-Jun;22(3):194-202. <https://doi.org/10.1111/xen.12161>.
10. Martens GR, Reyes LM, Li P, et al. Humoral Reactivity of Renal Transplant-Waitlisted Patients to Cells From GGTA1/CMAH/ β 4GalNT2, and SLA Class I Knockout Pigs. *Transplantation*. 2017 Apr;101(4):e86-e92. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001646>.
11. Ladowski JM, Reyes LM, Martens GR, et al. Swine Leukocyte Antigen Class II Is a Xenoantigen. *Transplantation*. 2018 Feb;102(2):249-254. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001924>.
12. Li S, Yan Y, Lin Y, et al. Rapidly induced, T-cell independent xenoantibody production is mediated by marginal zone B cells and requires help from NK cells. *Blood*. 2007 Dec 1;110(12):3926-35. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-065482>.
13. Maeda A, Kogata S, Toyama C, et al. The Innate Cellular Immune Response in Xenotransplantation. *Front Immunol*. 2022 Mar 28;13:858604. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.858604>.
14. Dorling A, Lombardi G, Binns R, Lechler RI. Detection of primary direct and indirect human anti-porcine T cell responses using a porcine dendritic cell population. *Eur J Immunol*. 1996 Jun;26(6):1378-87. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260630>.
15. Hundrieser J, Hein R, Pokoyski C, Brinkmann A, Düvel H, Dinkel A, Trautewig B, Siegert JF, Römermann D, Petersen B, Schwitzer R. Role of human and porcine MHC DRB1 alleles in determining the intensity of individual human anti-pig T-cell responses. *Xenotransplantation*. 2019 Jul;26(4):e12523. <https://doi.org/10.1111/xen.12523>.
16. Cowan PJ, d'Apice AJ. The coagulation barrier in xenotransplantation: incompatibilities and strategies to overcome them. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008 Apr;13(2):178-83. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e3282f63c74>.
17. Cozzi E, Simioni P, Boldrin M, et al. Alterations in the coagulation profile in renal pig-to-monkey xenotransplantation. *Am J Transplant*. 2004 Mar;4(3):335-45. <https://doi.org/10.1046/j.1600-6143.2003.00349.x>.
18. Ramackers W, Werwitzke S, Klose J, et al. Investigation of the influence of xenoreactive antibodies on activation of complement and coagulation in an ex vivo perfusion animal study using porcine kidneys. *Transpl Int*. 2019 May;32(5):546-556. <https://doi.org/10.1111/tri.13396>.
19. Hansen-Estruch C, Cooper DKC, Judd E. Physiological aspects of pig kidney xenotransplantation and implications for management following transplant. *Xenotransplantation*. 2022 May;29(3):e12743. <https://doi.org/10.1111/xen.12743>.
20. Ekser B, Bianchi J, Ball S, et al. Comparison of hematologic, biochemical, and coagulation parameters in α 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs, wild-type pigs, and four primate species. *Xenotransplantation*. 2012 Nov-Dec;19(6):342-54. <https://doi.org/10.1111/xen.12007>.
21. Cozzi E, Vial C, Ostlie D, et al. Maintenance triple immunosuppression with cyclosporin A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF

- porcine renal xenografts. *Xenotransplantation*. 2003 Jul;10(4):300-10. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3089.2003.02014.x>.
22. Soin B, Smith KG, Zaidi A, et al. Physiological aspects of pig-to-primate renal xenotransplantation. *Kidney Int*. 2001 Oct;60(4):1592-7. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00973.x>.
 23. Montgomery RA, Mehta SA, Parent B, Griesemer A. Next steps for the xenotransplantation of pig organs into humans. *Nat Med*. 2022 Aug;28(8):1533-1536. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01896-y>.
 24. Denner J, Längin M, Reichart B, et al. Impact of porcine cytomegalovirus on long-term orthotopic cardiac xenotransplant survival. *Sci Rep*. 2020 Oct 16;10(1):17531. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73150-9>.
 25. Mueller NJ, Livingston C, Knosalla C, et al. Activation of porcine cytomegalovirus, but not porcine lymphotropic herpesvirus, in pig-to-baboon xenotransplantation. *J Infect Dis*. 2004 May 1;189(9):1628-33. <https://doi.org/10.1086/383351>.
 26. Cavicchioli L, Zanetti R, Ferrareso S, et al. Expression of recipient cytomegalovirus in immunosuppressed and xenotransplanted *Macaca fascicularis* may be related to more severe gastrointestinal lesions. 2015 Mar-Apr;22(2):135-43. <https://doi.org/10.1111/xen.12153>.
 27. Griffith BP, Goerlich CE, Singh AK, et al. Genetically Modified Porcine-to-Human Cardiac Xenotransplantation. *N Engl J Med*. 2022 Jul 7;387(1):35-44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2201422>.
 28. Denner J. Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation? *Arch Virol*. 2008;153(8):1421-6. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0141-7>.
 29. Scobie L, Padler-Karavani V, Le Bas-Bernardet S, et al. Long-term IgG response to porcine Neu5Gc antigens without transmission of PERV in burn patients treated with porcine skin xenografts. *J Immunol*. 2013 Sep 15;191(6):2907-15. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301195>.
 30. Morozov VA, Wynyard S, Matsumoto S, et al. No PERV transmission during a clinical trial of pig islet cell transplantation. *Virus Res*. 2017 Jan 2;227:34-40. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.08.012>.
 31. Montgomery RA, Stern JM, Lonze BE, et al. Results of Two Cases of Pig-to-Human Kidney Xenotransplantation. *N Engl J Med*. 2022 May 19;386(20):1889-1898. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2120238>.
 32. Porrett PM, Orandi BJ, Kumar V, et al. First clinical-grade porcine kidney xenotransplant using a human decedent model. *Am J Transplant*. 2022 Apr;22(4):1037-1053. <https://doi.org/10.1111/ajt.16930>.
 33. Niu D, Wei HJ, Lin L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*. 2017 Sep 22;357(6357):1303-1307. <https://doi.org/10.1126/science.aan4187>.
 34. Yue Y, Xu W, Kan Y, et al. Extensive germline genome engineering in pigs. *Nat Biomed Eng*. 2021 Feb;5(2):134-143. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00613-9>.
 35. Fishman JA. Prevention of infection in xenotransplantation: Designated pathogen-free swine in the safety equation. *Xenotransplantation*. 2020 May;27(3):e12595. <https://doi.org/10.1111/xen.12595>.
 36. Hansen-Estruch C, Porrett PM, Kumar V, Locke JE. The science of xenotransplantation for nephrologists. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2022 Jul 1;31(4):387-393. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000800>.
 37. Hein R, Sake HJ, Pokoyski C, et al. Triple (GGTA1, CMAH, B2M) modified pigs expressing an SLA class II low phenotype-Effects on immune status and susceptibility to human immune responses. *Am J Transplant*. 2020 Apr;20(4):988-998. <https://doi.org/10.1111/ajt.15710>.
 38. Fu R, Fang M, Xu K, et al. Generation of GGTA1-/-β2M-/-CIITA-/- Pigs Using CRISPR/Cas9 Technology to Alleviate Xenogeneic Immune Reactions. *Transplantation*. 2020 Aug;104(8):1566-1573. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003205>.
 39. Cozzi E, Schneeberger S, Bellini MI, et al. Organ transplants of the future: planning for innovations including xenotransplantation. *Transpl Int*. 2021 Nov;34(11):2006-2018. <https://doi.org/10.1111/tri.14031>.
 40. Cooper DKC. The Long And Winding Road To Clinical Xenotransplantation – A Personal Journey. *Eur Surg Res*. 2022 Jun 28. <https://doi.org/10.1159/000525757>.
 41. Meier RPH, Longchamp A, Mohiuddin M, et al. Recent progress and remaining hurdles toward clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2021 May;28(3):e12681. <https://doi.org/10.1111/xen.12681>.
 42. Jagdale A, Kumar V, Anderson DJ, et al. Suggested Patient Selection Criteria for Initial Clinical Trials of Pig Kidney Xenotransplantation in the United States. *Transplantation*. 2021 Sep 1;105(9):1904-1908. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003632>.
 43. Kim SC, Mathews DV, Breeden CP, et al. Long-term survival of pig-to-rhesus macaque renal xenografts is dependent on CD4 T cell depletion. *Am J Transplant*. 2019 Aug;19(8):2174-2185. <https://doi.org/10.1111/ajt.15329>.