

Modificación genética en cerdos destinados a xenotrasplante

Sofía Morán Zafrilla¹, Margarita M. Marqués^{2,3}, Yolanda Bayón²

1. Graduada en Biotecnología (promoción 2018-2022). Facultad de CC. Biológicas y Ambientales. Universidad de León. smorazoo@estudiantes.unileon.es

2. Dpto. de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. mmarm@unileon.es

3. Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL), Campus de Vegazana s/n, 24071 León. yolanda.bayon@unileon.es

Resumen

La escasez de órganos humanos para trasplante ha propiciado la búsqueda de otras alternativas, como la posibilidad de utilizar animales como donantes, lo que se conoce como xenotrasplante. El cerdo se ha convertido en la especie donante más prometedora tanto por su similitud anatómica y fisiológica con el ser humano, como por la disponibilidad de metodologías de modificación genética, que han permitido la obtención de modelos porcinos que permiten hacer frente a los riesgos del xenotrasplante. Estos riesgos están asociados con el rechazo inmunológico, la desregulación de la coagulación y la presencia de retrovirus endógenos porcinos. Aunque los resultados de los ensayos preclínicos en primates varían considerablemente, alcanzando diferentes tiempos de supervivencia en función del órgano trasplantado, la inactivación del gen que codifica el antígeno α -Gal ha resultado imprescindible para superar el rechazo hiperagudo, que es la primera y más drástica barrera inmunológica. Los hitos que se han logrado en los últimos años, incluyendo las pruebas clínicas recientes con seres humanos a los que se han realizado trasplantes de riñón o corazón de cerdos modificados genéticamente, acercan un paso más el traslado de los xenotrasplantes a la práctica clínica.

Palabras clave

antígeno α -Gal, CRISPR/Cas9, modificación genética, rechazo inmunológico, retrovirus endógenos porcinos.

Escasez de órganos humanos para trasplante

El trasplante entre individuos de la misma especie, o alotrasplante, está destinado a aquellos pacientes que sufren un daño irreversible en uno o varios de sus tejidos u órganos, siendo necesario para evitar su muerte o mejorar su calidad de vida. Sin embargo, la escasez global de órganos humanos disponibles es el principal factor limitante en estos trasplantes. La Fundación Internacional *Eurotransplant* registró 6803 trasplantes en el año 2021, a pesar de lo cual el número total de pacientes en lista de espera a final de año era de 13460 personas (Eurotransplant, 2022). Para hacer frente a esta grave situación, una de las alternativas que se ha propuesto es el xenotrasplante, es decir, la implantación en un receptor humano de células, tejidos u órganos procedentes de una fuente animal no humana (World Health Organization, 2011).

Idoneidad de la especie porcina como donante

Los primeros experimentos de xenotrasplantes en seres humanos se llevaron a cabo ya en el siglo XVII, con la transfusión de sangre de oveja (Aristiza-

bal et al., 2017). A lo largo del siglo pasado, se realizaron diversos ensayos con órganos de primates, dada la proximidad filogenética al hombre. En la **Figura 1**, se señalan, en una línea de tiempo, los principales ejemplos de xenotrasplantes en humanos realizados hasta finales del siglo XX.

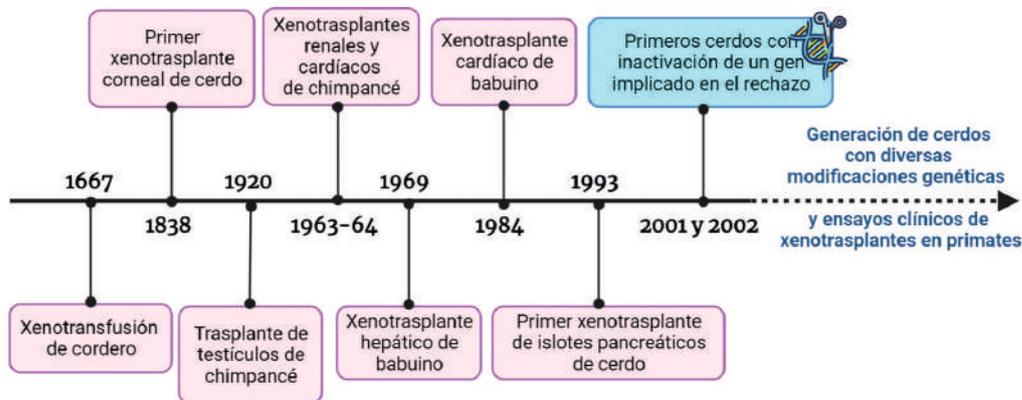


Figura 1. Línea de tiempo de xenotrasplantes a la especie humana hasta finales del siglo XX. Elaborada con Biorender.com a partir de los datos de Aristizabal *et al.* (2017).

Sin embargo, tras el fracaso de los ensayos utilizando primates como donantes, son varios los aspectos que han hecho del cerdo la especie donante más prometedora, como la similitud anatómica y fisiológica con el ser humano, y el alto desarrollo de metodologías de modificación genética; además de presentar menores implicaciones éticas que los primates (Cooper *et al.*, 2015). A finales del siglo XX, gracias a los avances metodológicos, tuvo lugar el primer hito: la obtención de cerdos en los que se había inactivado el gen *GGTA1*, que codifica el antígeno determinante de la primera reacción de rechazo de un xenoinjerto (**Figura 1**). A partir de entonces, en apenas dos décadas ha tenido lugar el desarrollo en la especie porcina de modelos cada vez más complejos, con múltiples modificaciones genéticas, destinados a prevenir el rechazo.

Metodologías para la generación de cerdos destinados a xenotrasplante

La combinación de las metodologías de modificación genética con la transferencia nuclear es fundamental para la obtención de cerdos adecuados para xenotrasplante. La transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, *somatic cell nuclear transfer*) implica transferir el núcleo de una célula somática a un oocito enucleado, produciéndose la reprogramación epigenética de la célula donante y generándose un nuevo embrión, que es transferido a una hembra receptora pseudogestante en la que tendrá lugar la gestación (Polejaeva, 2021). Los fibroblastos fetales porcinos son las células más utilizadas como donantes de núcleo (Ouyang *et al.*, 2021); estas células se pueden modificar genéticamente en cultivo para, posteriormente, generar animales modificados genéticamente mediante SCNT.

En las células somáticas se pueden realizar modificaciones dirigidas a genes específicos mediante *gene targeting*, una tecnología que se basa en el meca-

nismo de recombinación homóloga. Los primeros ejemplos en cerdos se obtuvieron en el año 2002, inactivándose el gen *GGTA1*, para obtener cerdos *knockout* o KO (**Figura 2**) (Dai *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2002).



Figura 2. Cerdos con un alelo del gen *GGTA1* inactivado destinados a xenotrasplante, obtenidos mediante *gene targeting* en fibroblastos fetales porcinos (Dai *et al.*, 2002).

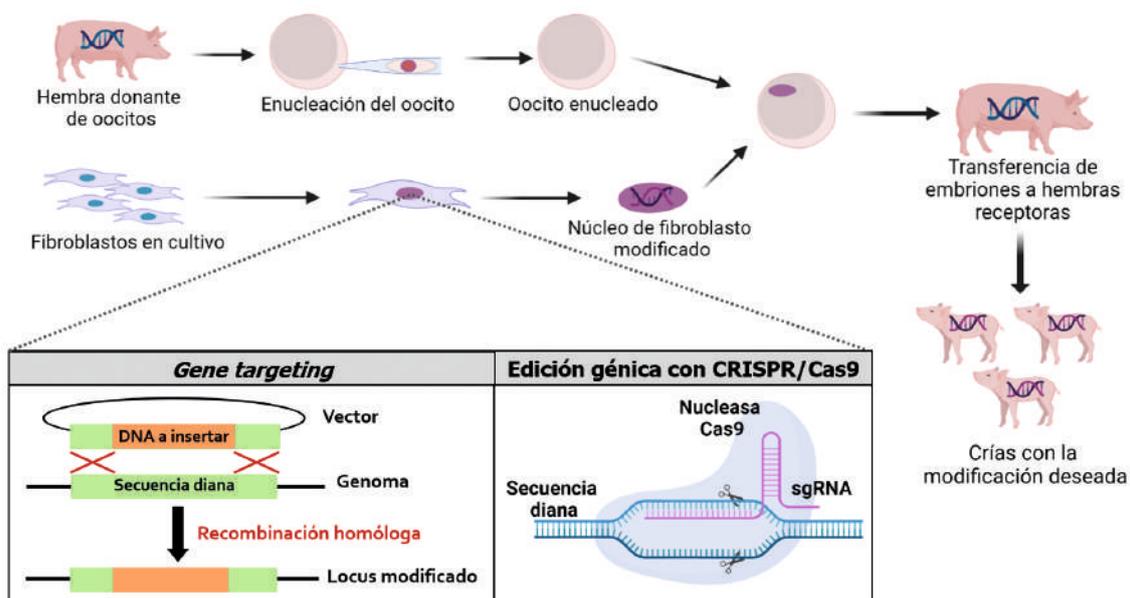


Figura 3. Esquema general para la obtención de cerdos con modificaciones genéticas precisas, mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) combinada con *gene targeting* o edición génica. Elaborada con Biorender.com.

No obstante, actualmente existen otras estrategias más eficientes, destacando el sistema de edición génica CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 nuclease*). Este sistema utiliza una endonucleasa (Cas9) que se une a secuencias específicas preseleccionadas en los genes de interés, para lo

cual es necesario diseñar un RNA de unos 20 nucleótidos que le sirva de guía (sgRNA, *guide RNA*). La nucleasa Cas9 genera cortes de doble hebra en el DNA que, cuando son reparados por el mecanismo celular de unión de extremos no homólogos, pueden originar pequeñas inserciones o deleciones que provocan la inactivación del gen diana (Dmochewitz y Wolf, 2015). En otros casos, tiene lugar la reparación dirigida por homología, lo que requiere introducir en la célula secuencias de DNA exógeno homólogas que serán utilizadas como molde (Perleberg et al., 2018). Las herramientas de edición génica se pueden aplicar tanto directamente en cigotos, como en células somáticas en combinación con SCNT, para generar animales con modificaciones genéticas complejas (Klinger y Schnieke, 2021), tal y como se representa en la **Figura 3**.

Estrategias para hacer frente a los riesgos de los xenotrasplantes

El principal riesgo en los trasplantes es el rechazo, situación en la cual el injerto es reconocido como extraño por el receptor y resulta atacado por su sistema inmune. En el caso de los xenotrasplantes, el rechazo es más acusado por las incompatibilidades moleculares entre ambas especies, tanto a nivel del sistema inmunológico como de la cascada de coagulación. Las reacciones que tienen lugar corresponden a varios tipos de rechazo que están interrelacionados y pueden solaparse: en los primeros minutos u horas, se produce el rechazo hiperagudo; si es superado, semanas o meses después ocurre el rechazo humoral o vascular agudo, que se solapa con el rechazo celular; finalmente, puede sufrir rechazo crónico, meses o incluso años después. De este último apenas se tiene información, pero se cree que sería más acusado que en los alotrasplantes.

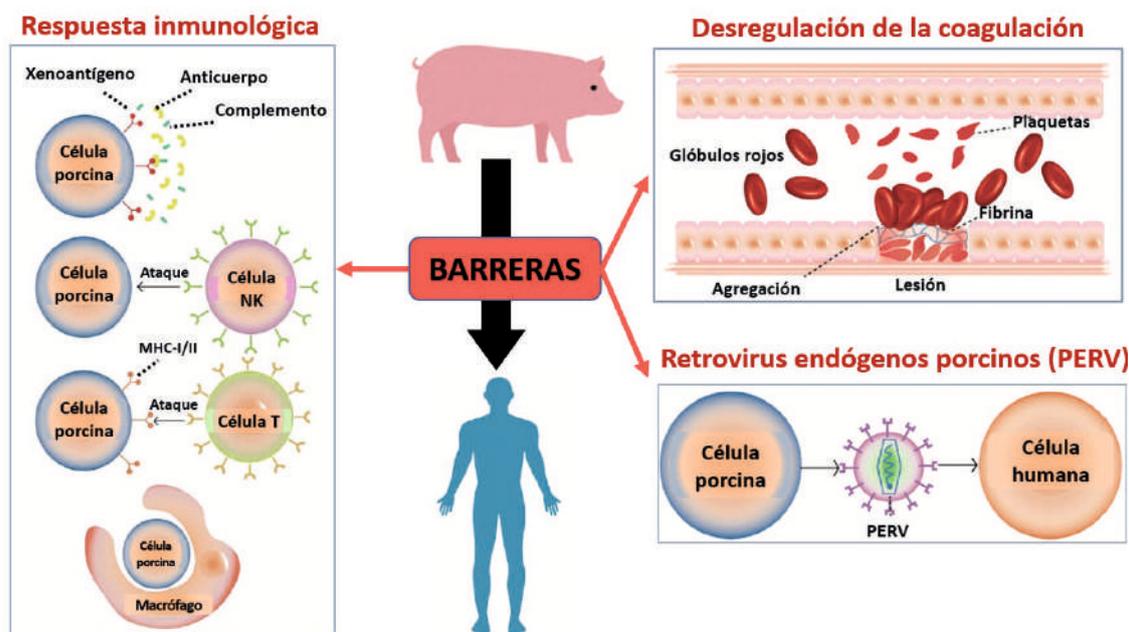


Figura 4. Barreras a superar en el xenotrasplante de cerdo a primate/ser humano para que el xenoinjerto no sea rechazado y alcance la supervivencia a largo plazo. Adaptada de Niu *et al.* (2021).

Otro aspecto clave por el que se ha cuestionado la seguridad de los xenotrasplantes de cerdo al hombre es por la posibilidad de transmisión a la población humana de agentes patógenos del cerdo. En este sentido, la principal preocupación se centra en los retrovirus endógenos porcinos (PERV, *porcine endogenous retrovirus*). La superación de todas estas barreras, que se representan de forma esquemática en la **Figura 4**, es el objetivo de las modificaciones genéticas realizadas en estos animales. A continuación, se comentan las principales estrategias llevadas a cabo.

Supresión del xenoantígeno α -Gal

El rechazo hiperagudo se produce porque anticuerpos preformados del receptor reconocen un antígeno del cerdo llamado α -Gal (galactosa- α -1,3-galactosa), producido por la enzima codificada por el gen *GGTA1*. A diferencia del cerdo, los monos del Viejo Mundo (como los babuinos y los macacos) y los seres humanos no sintetizan esta enzima, pero poseen anticuerpos anti- α -Gal generados durante la etapa neonatal por exposición a antígenos de bacterias del intestino que sí la expresan. El reconocimiento del antígeno α -Gal por los anticuerpos preexistentes (**Fig. 5A**) provoca la activación del sistema del complemento (Meier *et al.*, 2018). Como resultado, la destrucción de la barrera endotelial permite la infiltración de células inmunitarias, y se estimula la cascada de coagulación y la respuesta inflamatoria (Stevens, 2018). De este modo, el rechazo se manifiesta con trombosis, edema y hemorragias, provocando el fracaso del trasplante (**Figura 5C-D**).

La inactivación del gen *GGTA1*, responsable de la producción del xenoantígeno α -Gal, es clave para evitar el rechazo hiperagudo. En 2001, se generaron los primeros cerdos *knockout* heterocigóticos para el gen *GGTA1* (*GGTA1* KO o GTKO; Dai *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2002) y, un año después, se obtuvieron los homocigóticos (Phelps *et al.*, 2003).

Supresión de otros xenoantígenos

Otros antígenos del cerdo son también reconocidos por anticuerpos del receptor y causan el rechazo humoral o vascular agudo, activando también la cascada del complemento (**Fig. 5B**). Estos xenoantígenos son el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) y el glicano S_Da, producidos, respectivamente, por la enzima codificada por el gen *CMAH* y la enzima codificada por el gen *B4GALNT2*. La inactivación de esos genes en el cerdo ayuda a prevenir este tipo de rechazo.

Expresión de proteínas humanas reguladoras del complemento

Las proteínas reguladoras del complemento (CRP, *complement regulatory protein*) del cerdo no son efectivas a la hora de proteger a las células endoteliales porcinas del xenoinjerto frente al daño producido por el sistema del complemento del receptor. La introducción en el cerdo de genes que codifican CRPs humanas, como CD46, CD55 y CD59, puede atenuar la activación de la cascada del complemento y prolongar la supervivencia (Burdorf *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018).

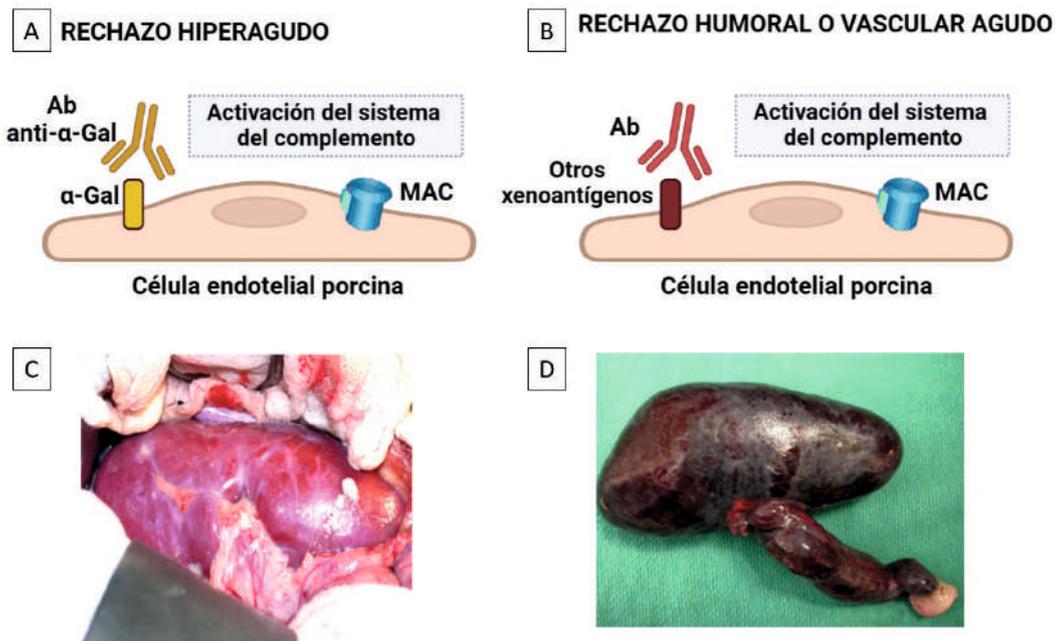


Figura 5. Rechazo hiperagudo (A) y rechazo humoral o vascular agudo (B). El reconocimiento de los antígenos del cerdo por los anticuerpos del receptor del xenoinjerto provoca la activación del sistema del complemento, formándose complejos de ataque a membrana (MAC), que a su vez conducen a la lisis de las células endoteliales. Elaborada con BioRender.com. (C-D) Riñón de un cerdo sin modificaciones genéticas trasplantado a un babuino inmediatamente después del trasplante (C) y 10 minutos después, presentando características típicas del rechazo hiperagudo (D). Fotos tomadas de Cooper *et al.* (2016).

Inhibición de la respuesta inmunitaria celular

Para inhibir la fagocitosis de las células porcinas por macrófagos, se ha propuesto, por ejemplo, expresar en el cerdo la proteína CD47 humana (hCD47), de modo que la interacción CD47-SIRP- α tenga un efecto inhibitorio sobre los macrófagos del primate (Ide *et al.*, 2007). También se ha tratado de prevenir la citotoxicidad por células NK introduciendo en el cerdo el gen *HLA-E*, que codifica para una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad MHC-I (Maeda *et al.*, 2013). Por último, la citotoxicidad por linfocitos T se puede contrarrestar expresando en el cerdo la proteína de fusión CTLA4-Ig, que bloquea la vía de coestimulación CD28-CD80/86, necesaria para la activación completa de las células T (Wang *et al.*, 2015).

Expresión de proteínas humanas reguladoras de la coagulación/inflamación

Las proteínas del cerdo que participan en la retroalimentación positiva y negativa de la cascada de coagulación no son capaces de ejercer correctamente su función sobre las proteínas de coagulación humanas (Stevens, 2018). Esta desregulación de la coagulación supone una importante barrera para los xenotrasplantes y se manifiesta con una microangiopatía trombótica y una coagulación intravascular

diseminada que amenazan la vida del receptor, ya que se ocluyen los vasos sanguíneos produciéndose hipoxia, daño tisular y necrosis (Cowan y Robson, 2015). Se ha intentado contrarrestar con la expresión de proteínas humanas con función anticoagulante/antitrombótica, como hCD39, hCD73, trombomodulina humana (hTBM), TFPI humano (hTFPI) y EPCR humano (hEPCR) (Wolf *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2020).

Inactivación de los retrovirus endógenos porcinos

Los retrovirus endógenos (PERV, *porcine endogenous retrovirus*) se encuentran en múltiples copias en el genoma del cerdo en forma inactiva (provirus) (Denner, 2021). El posible riesgo sería que los PERV presentes en el xenoinjerto pudieran activarse y volverse patogénicos para el receptor (Denner, 2018). Aún no está claro si pueden suponer un riesgo real, ya que, aunque se ha demostrado que pueden infectar células humanas *in vitro* (Patience *et al.*, 1997), no se ha demostrado la infección *in vivo*. No obstante, esta barrera ya se ha superado gracias a la edición génica, que en 2017 hizo posible la generación de animales donde todas las secuencias virales se encuentran inactivadas (Niu *et al.*, 2017).

Tabla 1. Principales modificaciones genéticas en cerdo para prevenir los riesgos derivados del xenotrasplante.

Modificación	Inhibición
Supresión de xenoantígenos	
Inactivación del gen <i>GGTA1</i> (<i>GGTA1</i> KO)	Rechazo hiperagudo
Inactivación del gen <i>CMAH</i> (<i>CMAH</i> KO)	Rechazo vascular agudo
Inactivación del gen <i>B4GALNT2</i> (<i>B4GALNT2</i> KO)	Rechazo vascular agudo
Expresión de proteínas humanas reguladoras del complemento	
hCD46	Activación del complemento
hCD55	Activación del complemento
hCD59	Activación del complemento
Inhibición de la respuesta inmunitaria celular	
Expresión de hCD47	Fagocitosis por macrófagos
Expresión de HLA-E	Citotoxicidad de células NK
Expresión de hCTLA4-Ig o de LEA29Y	Activación de células T
Inactivación del SLA-I o expresión de CIITA-DN	Respuesta de células T
Expresión de proteínas humanas reguladoras de la coagulación/inflamación	
hCD39 y hCD73	Coagulación e inflamación
hTBM	Coagulación
hTFPI	Coagulación
hEPCR	Coagulación
hHO-1 y hA20	Apoptosis e inflamación
Inactivación de vWF	Activación plaquetaria
Inactivación de los retrovirus endógenos porcinos (PERV)	
PERV KO	Reducir el posible riesgo de los PERV

En la **Tabla 1** se recogen las principales modificaciones realizadas en el cerdo que se han detallado en este apartado.

Optimización de un modelo porcino de xenotrasplante

Lo expuesto anteriormente indica que los órganos de cerdo con mayor potencial clínico serían aquellos que reúnan múltiples modificaciones genéticas que permitan superar las diferentes barreras, siendo imprescindible la inactivación del gen que codifica el xenoantígeno α -Gal. La modificación del genoma más compleja descrita hasta ahora fue la realizada por Yue *et al.* (2021). Estos cerdos reúnen un total de 42 modificaciones y se obtuvieron mediante dos rondas consecutivas de edición génica y clonación. Las modificaciones incluyen la supresión de xenoantígenos, la expresión de proteínas humanas y la inactivación de todas las secuencias de los retrovirus endógenos presentes en su genoma. Sin embargo, aún será necesario identificar cuáles son las modificaciones concretas más adecuadas en función del órgano que se pretenda trasplantar.

Resultados de los ensayos preclínicos en primates

Como paso previo imprescindible a los ensayos clínicos en seres humanos, es necesario realizar xenotrasplantes en modelos animales. Los receptores que más se han utilizado son babuinos (*Papio spp.*), el mono Rhesus (*Macaca mulatta*) y el macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) (**Fig. 6A**). Hasta ahora, los mejores tiempos de supervivencia se han obtenido en xenotrasplantes de islotes pancreáticos, riñón y corazón. De hecho, el mayor éxito se ha producido en corazón, órgano con el que se ha llegado a alcanzar una supervivencia de 945 días (Mohiuddin *et al.*, 2016) utilizando cerdos GTKO/hCD46/hTBM. El corazón del cerdo se implantó en el abdomen del receptor sin retirar el corazón del primate (trasplante heterotópico). En cambio, la máxima supervivencia alcanzada en xenotrasplante ortotópico de corazón, es decir, reemplazando el corazón del receptor por el corazón del cerdo, ha sido de 195 días, usando también corazones GTKO/hCD46/hTBM (Långin *et al.*, 2018). En comparación con el resto de órganos, el xenotrasplante de hígado o pulmón origina muchas más complicaciones, fundamentalmente debido a trastornos severos de la coagulación (Hryhorowicz *et al.*, 2020). Ha de tenerse en cuenta que, además del tipo de modificación genética del donante, el éxito de estos ensayos depende de múltiples factores, como la estabilidad y niveles de expresión de los transgenes, el órgano trasplantado, la especie receptora, o la terapia inmunosupresora a la que se somete al receptor (Fischer y Schnieke, 2022). En la **Figura 6B**, se han recogido los tiempos de supervivencia máximos alcanzados en ensayos preclínicos en primates para las células y órganos más estudiados.

Últimos avances: primeras pruebas clínicas en seres humanos

Aunque no existen aún protocolos establecidos, de forma excepcional ya se han llevado a cabo en Estados Unidos xenotrasplantes de órganos de cerdo modificado genéticamente a seres humanos. Los primeros fueron xenotrasplantes de riñón que se realizaron a personas en situación de muerte cerebral a finales del 2021. En un caso, se trasplantó un riñón GTKO a dos personas (Montgomery *et al.*, 2022)

y, en el otro, ambos riñones de un cerdo con 10 modificaciones genéticas (Porrett *et al.*, 2022). Es de destacar que en ninguna de las dos intervenciones hubo signos de rechazo hiperagudo. No obstante, el ensayo clínico que ha alcanzado mayor notoriedad fue aquel realizado en enero de 2022, cuando se trasplantó por primera vez un corazón con 10 modificaciones genéticas a un paciente vivo (Griffith *et al.*, 2022). El órgano trasplantado se mantuvo funcional y sin síntomas de rechazo hasta el día 49, cuando se produjo un repentino fallo cardíaco, aunque la autopsia reveló que las alteraciones del órgano no parecían relacionadas con fenómenos de rechazo.

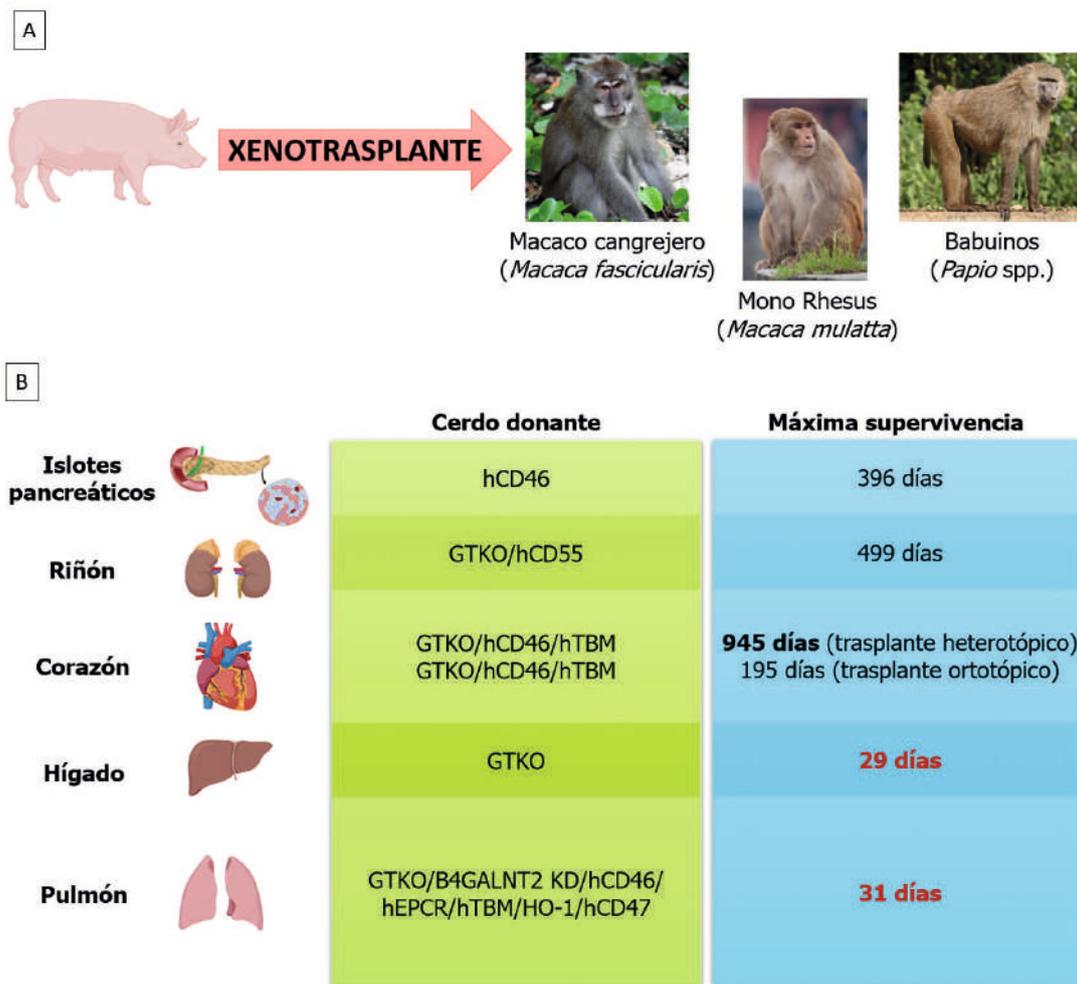


Figura 6. Ensayos preclínicos de xenotrasplante. **A)** Especies de primates más utilizadas como receptores. **B)** Máximos tiempos de supervivencia alcanzados en ensayos preclínicos en primates, indicando las modificaciones que presentaba el cerdo donante.

Consideraciones finales

La idea de trasplantar órganos de cerdos modificados genéticamente, ha dado pie a diversas cuestiones éticas, como aquellas relacionadas con el sacrificio de animales para beneficio humano, el acceso equitativo a un xenotrasplante o las consecuencias que este pueda tener en la identidad de la persona. Estos aspectos éticos, junto a los aspectos técnicos, hacen necesaria una regulación in-

ternacional. De hecho, la Organización Mundial de la Salud, la FDA y la Agencia Europea de Medicamentos ya han desarrollado algunas directrices al respecto. Finalmente, es necesario mencionar que, de manera simultánea a los avances en el campo de los xenotrasplantes, diferentes equipos de investigación se están centrando en el desarrollo de otras estrategias. Entre ellas podemos citar el uso de dispositivos mecánicos implantables, la medicina regenerativa basada en células troncales pluripotentes, la ingeniería de tejidos o las quimeras interespecie (Mou *et al.*, 2015). El avance de esas investigaciones, junto con el futuro traslado de los xenotrasplantes a la práctica clínica, mantienen la esperanza de paliar la grave situación de la escasez de órganos para mejorar la calidad de vida de miles de personas en todo el mundo.

Referencias

- Aristizabal, A. M., Caicedo, L. A., Martínez, J. M., Moreno, M. *et al.* 2017. Xenotrasplantes, una realidad cercana en la práctica clínica: revisión de la literatura. *Cirugía Española*, 95(2):62-72.
- Burdorf, L., Stoddard, T., Zhang, T., Rybak, E. *et al.* 2014. Expression of human CD46 modulates inflammation associated with GalTKO lung xenograft injury. *American Journal of Transplantation*, 14(5):1084-1095.
- Cooper, D. K. C., Ekser, B. y Tector, A. J. 2015. A brief history of clinical xenotransplantation. *International Journal of Surgery*, 23:205-210.
- Cooper, D. K. C., Ezzelarab, M. B., Hara, H., Iwase, H. *et al.* 2016. The pathobiology of pig-to-primate xenotransplantation: a historical review. *Xenotransplantation*, 23(2):83-105.
- Cowan, P. J. y Robson, S. C. 2015. Progress towards overcoming coagulopathy and hemostatic dysfunction associated with xenotransplantation. *International Journal of Surgery*, 23:296-300.
- Dai, Y., Vaught, T. D., Boone, J., Chen, S. H. *et al.* 2002. Targeted disruption of the $\alpha 1$, 3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology*, 20(3):251-255.
- Denner, J. 2018. Why was PERV not transmitted during preclinical and clinical xenotransplantation trials and after inoculation of animals? *Retrovirology*, 15(1):28.
- Denner, J. 2021. Porcine endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Viruses*, 13(11):2156.
- Dmochewitz, M. y Wolf, E. 2015. Genetic engineering of pigs for the creation of translational models of human pathologies. *Animal Frontiers*, 5(1):50-56.
- Eurotransplant. 2022. Eurotransplant - Statistics. Disponible en: <https://statistics.eurotransplant.org/> (Accedido: 29 de enero de 2022).
- Fischer, K. y Schnieke, A. 2022. Xenotransplantation becoming reality. *Transgenic Research*, 31(3):391-398.
- Griffith, B. P., Goerlich, C. E., Singh, A. K., Rothblatt, M. *et al.* 2022. Genetically modified porcine-to-human cardiac xenotransplantation. *New England Journal of Medicine*, 387(1):35-44.
- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Hryhorowicz, S., Nowak-Terpiłowska, A. *et al.* 2020. Application of genetically engineered pigs in biomedical research. *Genes*, 11(6):670.

- Ide, K., Wang, H., Tahara, H., Liu, J. *et al.* 2007. Role for CD47-SIRP α signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12):5062-5066.
- Klinger, B. y Schnieke, A. 2021. Twenty-five years after Dolly: How far have we come? *Reproduction*, 162(1):F1-F10.
- Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K., Cheong, H. *et al.* 2002. Production of knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 295:1089-1092.
- Längin, M., Mayr, T., Reichart, B., Michel, S. *et al.* 2018. Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation. *Nature*, 564(7736):430-433.
- Liu, F., Liu, J., Yuan, Z., Qing, Y. *et al.* 2018. Generation of GTKO diannan miniature pig expressing human complementary regulator proteins hCD55 and hCD59 via T2A peptide-based bicistronic vectors and SCNT. *Molecular Biotechnology*, 60(8):550-562.
- Lu, T., Yang, B., Wang, R. y Qin, C. 2020. Xenotransplantation: Current status in preclinical research. *Frontiers in Immunology*, 10:3060.
- Maeda, A., Kawamura, T., Ueno, T., Usui, N. *et al.* 2013. The suppression of inflammatory macrophage-mediated cytotoxicity and proinflammatory cytokine production by transgenic expression of HLA-E. *Transplant Immunology*, 29(1-4):76-81.
- Meier, R. P. H., Muller, Y. D., Balaphas, A., Morel, P. *et al.* 2018. Xenotransplantation: back to the future?. *Transplant International*, 31(5):465-477.
- Mohiuddin, M. M., Singh, A. K., Corcoran, P. C., Thomas, M. L. *et al.* 2016. Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO. hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft. *Nature Communications*, 7:11138.
- Montgomery, R. A., Stern, J. M., Lonze, B. E., Tatapudi, V. S. *et al.* 2022. Results of two cases of pig-to-human kidney xenotransplantation. *New England Journal of Medicine*, 386(20):1889-1898.
- Mou, L., Chen, F., Dai, Y., Cai, Z. *et al.* 2015. Potential alternative approaches to xenotransplantation. *International Journal of Surgery*, 23:322-326.
- Niu, D., Ma, X., Yuan, T., Niu, Y. *et al.* 2021. Porcine genome engineering for xenotransplantation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 168:229-245.
- Niu, D., Wei, H.-J., Lin, L., George, H. *et al.* 2017. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*, 357(6357):1303-1307.
- Ouyang, H., Han, J. y Huang, Y. 2021. Pig Cloning Using Somatic Cell Nuclear Transfer. (En Hu, K. ed.) *Nuclear Reprogramming: Methods and Protocols*. New York: Humana, pp. 1-18.
- Patience, C., Takeuchi, Y. y Weiss, R. 1997. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Medicine*, 3:282-286.
- Perleberg, C., Kind, A. y Schnieke, A. 2018. Genetically engineered pigs as models for human disease. *Disease Models and Mechanisms*, 11(1):dmm030783.
- Phelps, C. J., Koike, C., Vaught, T. D., Boone, J. *et al.* 2003. Production of α 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 299(5605):411-414.
- Polejaeva, I. 2021. Generation of genetically engineered livestock using somatic cell nuclear transfer. *Reproduction*, 162(1):F11-F22.
- Porrett, P. M., Orandi, B. J., Kumar, V., Houpp, J. *et al.* 2022. First clinical-grade porcine

- kidney xenotransplant using a human decedent model. *American Journal of Transplantation*, 22(4):1037-1053.
- Stevens, S. 2018. Xenotransplantation. (En Tsoufas, G. ed.) *Organ Donation and Transplantation - Current Status and Future Challenges*. London: IntechOpen, pp. 331-351.
- Wang, Y., Yang, H.-Q., Jiang, W., Fan, N.-N. *et al.* 2015. Transgenic expression of human cytotoxic T-lymphocyte associated antigen4-Immunoglobulin (hCTLA4Ig) by porcine skin for xenogeneic skin grafting. *Transgenic Research*, 24(2):199-211.
- Wolf, E., Kemter, E., Klymiuk, N. y Reichart, B. 2019. Genetically modified pigs as donors of cells, tissues, and organs for xenotransplantation. *Animal Frontiers*, 9(3):13-20.
- World Health Organization. 2011. Second WHO global consultation on regulatory requirements for xenotransplantation clinical trials: October 17-19 2011, Switzerland: World Health Organization. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/341817> (Accedido: 13 de junio de 2022).
- Yue, Y., Xu, W., Kan, Y., Zhao, H. Y. *et al.* 2021. Extensive germline genome engineering in pigs. *Nature Biomedical Engineering*, 5(2):134-143.