

# **TRASPLANTES Y CLONACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS EN EL SIGLO XXI**



## **TRANSPLANTS AND HUMAN CELL CLONING IN THE 21<sup>st</sup> CENTURY**

**Santiago Grisolia (Ed.)**

**FUNDACION BBVA**

Cuando el deterioro de un tejido u órgano es irreversible, el trasplante se convierte en una de las principales opciones terapéuticas, aunque no exenta de dificultades y limitaciones. El trasplante de órganos procedente de donantes humanos ha ido aumentando en los últimos años, pero la demanda supera con creces la oferta, y, por tanto, el xenotrasplante, trasplante de tejidos u órganos procedentes de otras especies, se contempla como una alternativa con gran potencial terapéutico. Pero, antes de que este procedimiento pueda ser viable y seguro, habrá que resolver, entre otras, las cuestiones relacionadas con la respuesta inmune de rechazo, la regulación funcional del órgano y el riesgo de transferir organismos infecciosos u otros agentes patógenos procedentes del donante.

Todas estas dificultades podrían ser superadas mediante la aplicación de las técnicas de clonación a la producción de tejidos u órganos. En esta justificada búsqueda de nuevas alternativas, la clonación de células humanas mediante transferencia nuclear ofrece insospechadas posibilidades para alcanzar una fuente técnicamente segura y virtualmente inagotable para el trasplante de órganos genéticamente idénticos al paciente. Además de las dificultades técnicas del xenotrasplante y la clonación de tejidos y órganos, se recogen también en este libro los problemas éticos derivados de la utilización de estas estrategias, tanto en relación con el paciente (principalmente de tipo psicosocial) como en la manipulación genética, sacrificio de animales requeridos para estos procedimientos y la clonación de células humanas con fines terapéuticos.

En este libro se recogen las contribuciones presentadas en el "VI Encuentro Internacional sobre el Proyecto Genoma Humano: trasplantes y clonación humana en el siglo XXI", celebrado en la UIMP de Valencia, en octubre de 1999. Con su publicación, la Fundación BBVA quiere contribuir a un mejor conocimiento en nuestra sociedad de los últimos avances en materia de xenotrasplante y clonación de tejidos y órganos, dos de los grandes retos científico-técnicos del siglo XXI y de gran potencial socio sanitario.





# **TRASPLANTES Y CLONACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS EN EL SIGLO XXI**

## **TRANSPLANTS AND HUMAN CELL CLONING IN THE 21<sup>st</sup> CENTURY**

**Santiago Grisolia (Ed.)**

**FUNDACION BBVA**

*La decisión de la Fundación BBVA de publicar el presente libro no implica responsabilidad alguna sobre su contenido ni sobre la inclusión, dentro del mismo, de documentos o información complementaria facilitada por los autores.*

*Trasplantes y donación de células humanas en el siglo XXI /  
Transplants and Human Cell Cloning in the 21<sup>st</sup> Century*

© Fundación BBV

Plaza de San Nicolás, 4

48005 Bilbao

Depósito legal: M. 9.067-2001

I.S.B.N.: 84-95163-42-X

© Ilustración de portada:

INEEDIT

Imprime Sociedad Anónima de Fotocomposición  
Talisio, 9 - 28027 Madrid

## ***Trasplantes y clonación de células humanas en el siglo XXI***

### **Transplants and Human Cell Cloning in the 21<sup>st</sup> Century**





## ÍNDICE

<b>Presentación</b> .....	9
<b>Xenotrasplante. Panorama general y desarrollos recientes: análisis de ventajas y riesgos, Rafael Matesanz</b> .....	11
<b>Risks of Infection in Xenotransplantation, Robin A. Weiss</b> .....	51
<b>Progress in Xenotransplantation, Jeffrey L. Platt</b> .....	67
<b>Problemas éticos y sociales de los trasplantes, Francisco Vilardell</b> .....	87
<b>Ethical Considerations Related to Xenotransplantation, Fritz H. Bach and Elizabeth A. McGregor</b> .....	121
<b>Xenotransplantation: Plunging Headlong into Madness, Alan H. Berger</b> .....	131
Nuffield Council on Bioethics Animal-to-Human Transplants: The Ethics of Xenotransplantation, United Kingdom (March, 1996) .....	151
Xenotransplantation: Science, Ethics and Public Policy Institute of Medicine (IOM) National Academy Press: Washington (June, 1996) .....	153
Draft Public Health Service (PHS) Guideline on Infectious Disease Issues in Xenotransplantation (August, 1996) .....	155
Food & Drug Administration (FDA) Guidance Document "Public Health Issues Posed by the Use of Non-Human Primate Xenografts in Humans" (April, 1999) .	157

8 *Trasplantes y clonación de células humanas en el siglo XXI*  
Transplants and Human Cell Cloning in the 21<sup>st</sup> Century

<b>Cloning: Cellular Requirements and Biological Constraints</b> , Robert M. Moor, Giovanna Lazzari and Cesare Galli .....	161
<b>Cloning by Nuclear Transfer</b> , Harry Griffin .....	181
<b>Genomics and Medicine</b> , William A. Haseltine .....	193
<b>Clonación de células humanas: aspectos éticos, sociales y legales</b> , Marcelo Palacios .....	213

## PRESENTACIÓN

La Fundación BBVA, en su afán por contribuir a la difusión de las últimas actualizaciones del conocimiento, reúne en este libro las ponencias que los científicos más destacados de sus respectivas áreas impartieron en la Universidad Internacional Menéndez Pelayo de Valencia, en el marco del «VI Encuentro Internacional sobre el Proyecto Genoma Humano: trasplantes y clonación humana en el siglo XXI».

Reestablecer la función de un órgano es en gran medida uno de los principales objetivos en Medicina. Sin embargo, cuando este deterioro es irreversible y afecta a un órgano vital, las opciones terapéuticas están más limitadas. En este sentido, la sustitución del órgano enfermo por otro sano, procedente generalmente de un cadáver, es una alternativa terapéutica que ha ido ganando adeptos, en la medida en que los procedimientos técnicos y quirúrgicos de recogida y trasplante de órganos se han optimizado. En consecuencia, se ha incrementado la demanda de órganos para trasplante mientras que la oferta permanece relativamente estacionaria, con lo que el número de pacientes en lista de espera para el trasplante crece de forma progresiva.

Esta dificultad para satisfacer la demanda de órganos hace que el xenotrasplante, es decir, el trasplante a humanos de órganos o tejidos procedentes de animales, pueda ser considerado como una alternativa de gran potencial terapéutico. Pero antes de que el xenotrasplante pueda ser una realidad en la práctica clínica, deben resolverse, al menos, aquellas cuestiones que limitan de forma preferente el éxito y/o la viabilidad del trasplante, como son: I) el rechazo o reacción inmune del receptor contra el órgano, lo cual podría ser superado mediante la modificación genética y clonación de animales transgénicos, expresando genes que bloqueen el rechazo del órgano trasplantado o que generen tolerancia del mismo; II) las limitaciones funcionales del nuevo tejido u órgano que debe trabajar en y ser regulado

por un organismo receptor genéticamente distante; III) por último, aunque no menos importante, la posibilidad de transferir al receptor organismos infecciosos (principalmente virus, aunque también bacterias, hongos, etc.) u otros agentes patógenos (tales como priones) procedentes del órgano trasplantado. Este último riesgo cobra especial relevancia si consideramos que el fenómeno de zoonosis (transmisión de virus y otros agentes infecciosos patógenos de los animales a los humanos) podría ser el origen de nuevas epidemias, de forma similar a como el virus del SIDA ha saltado la barrera de especie desde el chimpancé o la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeld-Jakob está ligada a la encefalopatía espongiforme bovina. En este sentido, la especie donante ideal debiera permitir ofrecer un tamaño de órgano adecuado, una oferta en cantidad no limitada y un órgano para el trasplante exento de agentes patógenos transmisibles. Pero, aparte de las cuestiones técnicas, el xenotrasplante genera también otros problemas de índole ética relacionados con la modificación genética y el sacrificio de animales, la especie utilizada como fuente de órganos, así como el consentimiento informado del paciente y los problemas potenciales de índole psicosocial que pudieran derivarse de no asumir con normalidad el hecho de ser portador de un órgano no humano.

Ante este panorama, parece razonable buscar fuentes alternativas de tejidos u órganos para el trasplante, y, en este sentido, el espectacular avance de las técnicas de clonación de células humanas nos hacen concebir nuevas expectativas y renovadas esperanzas. Aunque técnicamente posible, la clonación completa de un ser humano carece de justificación y resulta en la actualidad inaceptable. Sin embargo, otras aplicaciones del trasplante nuclear destinadas a la producción de tejidos u órganos podrían ofrecer nuevas vías terapéuticas. En la actualidad, la aplicación más excitante de la transferencia nuclear es en terapéutica celular de un amplio número de enfermedades, entre las que se incluyen diabetes, parkinson, enfermedades cardiovasculares, leucemia, etc. En este contexto, los procedimientos de trasplante nuclear tienen una considerable importancia, ya que ofrecen el modo de evitar los problemas derivados del rechazo del órgano, al generar líneas celulares con la misma dotación genética nuclear que las del paciente, y, por tanto, las expectativas terapéuticas del trasplante encuentran en esta nueva tecnología la posibilidad de alcanzar una fuente técnicamente segura y virtualmente inagotable de tejidos u órganos para el trasplante.

**XENOTRASPLANTE.  
PANORAMA GENERAL Y  
DESARROLLOS RECIENTES:  
ANÁLISIS DE VENTAJAS Y RIESGOS**

*Rafael Matesanz*

Presidente de la Comisión de Trasplantes del Consejo de Europa



La posibilidad de sustituir un órgano con una disfunción irreversible por otro procedente de un cadáver, y más raramente de un familiar vivo, ha sido uno de los avances más importantes de la medicina en la segunda mitad del siglo XX. Sin embargo, el éxito del trasplante como terapéutica ha creado un nuevo problema: una demanda de órganos para trasplante muy superior a las disponibilidades actualmente existentes.

En la mayoría de países occidentales el número de enfermos en lista de espera para el trasplante de algún órgano sólido aumenta cada año, mientras que el número de trasplantes que se realizan permanece estacionario, o con incrementos mínimos. En España, el país con el mayor índice de donación de órganos por millón de habitantes del mundo, se ha conseguido que no aumente la diferencia entre el número de candidatos y el número de trasplantes que se realizan. Sin embargo, sería necesario duplicar la cantidad de trasplantes que actualmente se practican para que todos los enfermos que se encuentran en lista de espera (que al comienzo de 1998 eran de 4.460 pacientes totales), y en particular los candidatos a un trasplante renal, pudieran recibir un órgano. El xenotrasplante, o trasplante de células, tejidos u órganos procedentes de otras especies animales, podría ser una posible solución a este problema.

Esta inmensa disparidad entre necesidades de órganos y oferta, y el mejor conocimiento de los fenómenos de rechazo frente a tejidos extraños, han dado pie a investigar en la posibilidad del trasplante de tejidos animales y órganos vascularizados completos en seres humanos.

## Aspectos técnicos

La técnica quirúrgica del xenotrasplante no es diferente del trasplante de órganos humanos. Las primeras barreras para el éxito del trasplante inter-especies están constituidas por las disparidades inmunológicas, fisiológicas y funcionales entre donante y receptor.

El rechazo hiperagudo es una rápida y agresiva reacción inmunológica de rechazo que ocurre en los minutos/horas que siguen al implante. No obstante, en algunas circunstancias clínicas se han observado que órganos de animales pueden mantener la vida humana y que el rechazo de estos xenoinjertos puede ser controlado con éxito.

Existen nuevos fármacos inmunosupresores que pueden permitir la supervivencia a largo plazo. Sin embargo, los investigadores están estudiando estrechamente la bioquímica del sistema inmunológico en cerdos y humanos. El objetivo primero es controlar el inmediato rechazo hiperagudo de los órganos de animales por el sistema inmune humano, mediado por anticuerpos preformados y proteínas del complemento. Aunque teóricamente el rechazo hiperagudo pudiera ser prevenido, todavía quedarían otros problemas inmunológicos y no inmunológicos por resolver.

La inmunosupresión a largo plazo utilizada habitualmente en el alotrasplante puede ser utilizada también en el xenotrasplante, previsiblemente a dosis más altas y en consecuencia con mayores complicaciones tóxicas e infecciosas. Por ello, la solución, según algunos científicos, pasaría por la inducción de una situación de tolerancia por parte del huésped del xenoinjerto. Las células progenitoras de la médula ósea podrían aportar células T y otras células del sistema inmune propios del xenoinjerto que podrían conducir a una situación denominada quimerismo, la cual puede inducir tolerancia.

Mediante ingeniería genética se podrían injertar nuevos genes en animales (animales transgénicos) o eliminar determinados genes existentes en los animales, modificando así su sistema inmunitario, y como resultado el sistema inmune humano podría hipotéticamente reconocer el xenoinjerto como propio.

Un problema adicional que permanece sin resolver son los problemas derivados de las diferencias fisiológicas y de función del xenoinjerto, los cuales están ganando más importancia a medida que se van encontrando vías de posible solución a los problemas en relación con rechazo.



Así, el éxito del trasplante inter-especies no sólo depende de las medidas efectivas para evitar el rechazo, sino también del adecuado ajuste del órgano animal al receptor, incluyendo la sensibilidad de los órganos implantados a las señales del receptor, y viceversa, la efectividad de las hormonas, proteínas mediadoras o sustancias transmisoras producidas por los órganos implantados.

Por otro lado, se ha apuntado la posibilidad de transmisión de infecciones especialmente virus, aunque también otros patógenos no virales, de los animales a los humanos (bacterias, hongos, etc.). El xenotrasplante podría facilitar la transmisión de virus animales a los humanos, algo que ha ocurrido ya mediante otras vías de transmisión, originando graves problemas de Salud Pública (SIDA o la infección por virus ÉBOLA), es decir, sería posible lo conocido como salto de patógenos entre las especies.

El riesgo viene de organismos que, pudiendo ser bien tolerados en el animal, podría causar enfermedad en los humanos. Los receptores de trasplante están en una situación de particular riesgo debido a los inmunosupresores, que necesariamente es preciso administrar para prevenir/controlar el rechazo. Una vez que un organismo patógeno llegue a establecerse en un receptor, la potencialidad de transmisión a la familia, al entorno y a la población es factible. Además, cuando se trata de infecciones con largos períodos de incubación, el problema se acentúa, ya que cuando se detecta ya se han podido infectar un gran número de individuos.

Un caso especial lo constituirían las enfermedades por priones, que pueden pasar de una especie a otra, originando el amplio espectro de las encefalopatías espongiformes.

Adicionalmente existe la posibilidad de que el órgano animal xenotrasplantado sea susceptible a enfermedades humanas, aspecto que es actualmente escasamente conocido.

Por ello, se deben emplear los máximos esfuerzos en minimizar el riesgo de enfermedades infecciosas, ya que en esta situación la prevención es mucho más eficaz que el tratamiento y debe ser posible asegurar que los órganos trasplantados están libres de un amplio rango de patógenos a través de los estudios a los animales fuente de órganos y el mantenimiento de éstos en ambientes específicos libres de patógenos.

**TABLA I**  
**Comparación de los primates y los cerdos como donantes de órganos**

Primates		Cerdos	
Ventajas	Inconvenientes	Ventajas	Inconvenientes
Inmunológicamente más relacionado con el hombre	Camadas únicas y crecimiento lento	Camadas múltiples y crecimiento rápido	Inmunológicamente más distante al hombre
Fisiología y anatomía similar al hombre	Falta de experiencia con su crianza en cautividad a «gran escala»	Amplia experiencia con su crianza en granjas	Fisiología y anatomía menos parecida al hombre
	Algunas especies en peligro de extinción	Menos problemas ético-morales	
	Enfermedades más parecidas a las del hombre (¿mayor transmisibilidad?)		
	Razones ético-morales		

## Aspectos éticos

La posibilidad del xenotrasplante conlleva importantes consideraciones éticas tanto en relación con el animal donante como con el receptor humano.

El donante ideal debe estar disponible en grandes cantidades y libre de transmisión de enfermedades, además debe ser posible disponer de diferentes tamaños. Los primates no humanos fueron una atractiva elección debido a su similitud genética a los humanos. Algunos estudios los han utilizado; sin embargo, la utilización de órganos de primates presenta diversos problemas:

1. La mayoría de los órganos de primates son demasiado pequeños para su utilización en adultos humanos.
2. Se sabe que los tejidos de los primates pueden transmitir enfermedades extremadamente peligrosas para los humanos (virus de Ébola o virus Marbug).
3. Muchos primates están incluidos en especies protegidas.
4. Los primates no se reproducen bien en cautividad y son demasiado caros.
5. Algunos primates, como los chimpancés, mantienen una compleja forma de vida animal, cuyas actividades de comportamiento semejan estrechamente el comportamiento humano.

Los investigadores, por lo tanto, han vuelto los ojos hacia la utilización de cerdos como fuente de órganos, con la esperanza de que los problemas éticos y de logística sean considerablemente inferiores.

Existen diferentes consideraciones éticas que afectan especialmente al receptor, como el consentimiento informado, que debe siempre ser obtenido para los procedimientos de trasplante, y en el caso de los xenotrasplantes probablemente se parezca más a un contrato legal o a un consentimiento informado utilizado para el tratamiento con medicamentos de uso compasivo, o incluso parecido al empleado en los ensayos clínicos, y/o quizá debería ser individualizado para cada caso.

Pero además los profesionales médicos deben estar preparados ante los problemas potenciales de índole psicosocial que podrían producirse por el implante de un órgano de otra especie en un humano, ya que probablemente no todos los pacientes serán capaces de asimilar suficientemente el hecho de que poseen una parte no humana dentro de su cuerpo.

El anonimato del receptor y la publicidad de tales procedimientos son otros dos temas que pueden dar lugar a problemas en el contexto ético.

Por ello, los procedimientos adecuados de consentimiento para la intervención terapéutica y el respeto a los principios éticos de autonomía y de anonimato deben ser establecidos con prioridad.

## **Regulaciones**

No existe prohibición expresa que impida el trasplante de órganos animales a los humanos en ninguna legislación. Aunque el xenotrasplante dista mucho de ser un procedimiento de rutina, las investigaciones en este campo precisan de un marco regulatorio adecuado.

Por todo lo anteriormente expuesto, la Subcomisión Nacional de Xenotrasplantes establece sus propias recomendaciones en base al conocimiento científico actual en la materia y que queda reflejado en el presente documento.

## Revisión de la experiencia clínica en xenotrasplante

La idea de trasplantar órganos de otras especies animales en receptores humanos no es nueva. Las siguientes tablas recogen la experiencia clínica mundial en trasplante renal, cardíaco y hepático.

En los primeros años de este siglo se realizaron tres intentos de xenotrasplante utilizando como donantes un cerdo, una cabra y una oveja, especies animales que se encuentran muy alejadas del hombre en la escala filogenética. Como veremos después, la reacción inmunológica de rechazo que tiene lugar en estos xenotrasplantes es muy intensa, lo que determina una destrucción precoz de los xenoinjertos.

**TABLA 2**  
**Experiencia Clínica Mundial en Xenotrasplante Renal**

Año	Cirujano	Donante	N	Supervivencia
1905	Princeteau	Conejo (parcial)	1	16 días
1906	Jaboulay	Cerdo	1	< 3 días
		Cabra	1	< 3 días
1910	Unger	Mono	1	< 2 días
1913	Schonstadt	Mono	1	?
1923	Neuhof	Oveja	1	< 9 días
1964	Reemtsma	Chimpancé	12	≤ 9 días
		Mono	1	10 días
1964	Hitchcock	Babuino	1	5 días
1964	Starzl	Babuino	6	< 60 días
1964	Hume	Chimpancé	1	1 día
1964	Traeger	Chimpancé	3	< 49 días
1965	Goldsmith	Chimpancé	2	4 meses
1966	Cortesini	Chimpancé	1	31 días

**TABLA 3**  
**Experiencia Clínica Mundial en Xenotrasplante Cardíaco**

Año	Cirujano	Donante	Tipo	Supervivencia *
1964	Hardy	Chimpancé	Ortotópico **	2 horas
1968	Cooley	Oveja	Ortotópico	No funcionó
1968	Ross	Cerdo	Heterotópico ***	4 minutos
1968	Ross	Cerdo	Perfusión con sangre humana	No funcionó
1969	Marion	Chimpancé	Ortotópico?	4 horas
1977	Barnard	Babuino	Heterotópico	5 horas
1977	Barnard	Chimpancé	Heterotópico	4 días
1984	Bailey	Babuino	Ortotópico	20 días
1992	Religa	Cerdo	Ortotópico	24 horas

\* En algunos casos hubo problemas funcionales por el reducido tamaño del corazón.

\*\* Se reemplaza el corazón del receptor por el xenoinjerto.

\*\*\* Se coloca el xenoinjerto sin retirar el corazón nativo del receptor.

**TABLA 4**  
**Experiencia Clínica Mundial en Xenotrasplante Hepático**

Año	Cirujano	Donante	Tipo	Supervivencia *
1966	Starlz	Chimpancé	Heterotópico	< 1 día
1969	Starlz	Chimpancé	Ortotópico	9 días
1969	Starlz	Chimpancé	Ortotópico	< 2 días
1969	Bertoye	Babuino	Heterotópico	< 1 día
1970	Leger	Babuino	Heterotópico	3 días
1971	Poyet	Babuino	Heterotópico	< 1 día
1971	Motin	Babuino	Heterotópico	3 días
1974	Starlz	Chimpancé	Ortotópico	14 días
1992	Starlz	Babuino	Ortotópico	70 días
1993	Starlz	Babuino	Ortotópico	26 días
1993	Makowka	Cerdo	Heterotópico	< 2 días

En 1964, antes de que se dispusiera de la diálisis, Reemtsma trasplantó riñones de chimpancé a enfermos con insuficiencia renal. La mayoría de los riñones funcionaron inmediatamente después del trasplante, con presencia de diuresis y una mejoría de la función renal demostrada por la disminución de la urea y creatinina séricas. Dado que se sabía que el rechazo de estos xenoinjertos era más grave que el que se producía cuando los órganos provenían de donantes humanos (alotrasplantes), los receptores fueron tratados con una inmunosupresión mucho más intensa, que incluía azatioprina, corticoesteroides, actinomicina C e irradiación local. Este intenso tratamiento inmunosupresor no pudo evitar que todos los receptores presentaran varios episodios de rechazo agudo. Sin embargo, el problema más importante fue la aparición de diversas complicaciones infecciosas que causaron el fallecimiento de la mayoría de los pacientes, aunque uno de estos riñones funcionó normalmente durante nueve meses.

En el mismo año 1964, Starlz realizó una segunda serie de xenotrasplantes renales utilizando otra especie de primates, los babuinos, como donantes. Los resultados fueron similares a los obtenidos por Reemtsma, con una buena función inicial de los xenoinjertos. Sin embargo, en este caso, la máxima supervivencia que alcanzó uno de los xenoinjertos fue sesenta días, presentando la mayoría de receptores complicaciones infecciosas graves como consecuencia de la intensa inmunosupresión utilizada (la misma que utilizó Reemtsma).

Posteriormente se han practicado otras experiencias clínicas de xenotrasplante en las que se han implantado otros órganos. A destacar el de corazón llevado a cabo por Bailey en 1984 y los dos hepáticos realizados por Starlz en 1992 y 1993. Todos ellos utilizaron

a babuínos como donantes, pero a pesar de disponer de mejores medicamentos inmunosupresores que los empleados en los años sesenta y setenta, en el cardíaco se utilizó ciclosporina y en los dos hepáticos tacrólimo y ciclofosfamida, los resultados finales fueron similares. Las supervivencias de los receptores oscilaron entre veinte y setenta días y todos fallecieron como consecuencia del rechazo del órgano o por complicaciones infecciosas.

Estas experiencias clínicas han puesto de manifiesto importantes aspectos sobre la posible utilidad del xenotrasplante.

No es el objeto de esta ponencia hacer una revisión exhaustiva de los distintos problemas de todo tipo derivados del intento de sustituir un órgano dañado por otro procedente de un animal. Podemos, sin embargo, resumir la situación actual en los siguientes puntos:

- El xenotrasplante de órganos en humanos puede ser una alternativa al déficit de órganos cadavéricos para trasplante, siendo el cerdo el animal que se considera actualmente como fuente de órganos ideal para los humanos.
- La producción de cerdos transgénicos, que expresan en sus células proteínas reguladoras del complemento humano, ha permitido superar la barrera inmunológica del rechazo hiperagudo, que, hasta el momento, era la primera gran limitación para trasplantar órganos de cerdo en humanos. Sin embargo, para evitar que estos xenoinjertos sean rechazados posteriormente es necesario utilizar un intenso tratamiento inmunosupresor que se asocia con graves efectos tóxicos en el receptor.
- La prevención del rechazo xenogénico tardío que se produce tras superar el rechazo hiperagudo en el xenotrasplante de órganos de cerdo en primates no humanos es el gran reto actual para los investigadores. Si este rechazo podrá eludirse, con unos efectos secundarios aceptables para el receptor, usando tratamientos convencionales, o bien será necesario recurrir a nuevas modificaciones genéticas de los animales fuente de órganos u otro tipo de manipulaciones en los receptores, es la siguiente pregunta que hay que responder.
- Una vez superada esta barrera será posible obtener supervivencias prolongadas (más de seis meses) de los órganos de cerdo en primates no humanos y será posible estudiar la funcionalidad de los órganos, así como la transmisión de agentes infecciosos.
- Existe actualmente falta de información definitiva sobre la viabilidad funcional del órgano xenotrasplantado por las cortas supervivencias, hasta ahora, de los injertos.

- Órganos responsables de procesos metabólicos o síntesis proteica, en principio, presentan mayores dificultades de adaptación fisiológica al nuevo medio (hígado, islotes pancreáticos y riñón), mientras que de otros (corazón), sin esta función, cabría esperar una mejor viabilidad.
- Los nuevos datos de infección de células humanas por retrovirus endógenos del cerdo y los más recientes acerca de su capacidad de recombinación nos obligan a ser muy cautos en la aceptación de un ensayo clínico sobre xenotrasplante. Es necesario potenciar el desarrollo de tecnología que permita la detección de estos retrovirus y de su capacidad de recombinación.
- La prevención de transmisión de bacterias, hongos y parásitos (tanto nosocomiales como las oportunistas) se debe considerar igualmente importante.
- Será preciso establecer y seguir normas mínimas de control, tanto para los animales como para sus cuidadores y todo el personal implicado en el acto de la extracción, y después serán aplicables en el postoperatorio al receptor del xenoinjerto, a sus contactos familiares y al personal sanitario relacionado con el trasplante.
- No existe normativa alguna en el ámbito nacional ni internacional que impida el trasplante de órganos animales a los seres humanos. Sí existen en el ámbito internacional, nacional y en las Comunidades Autónomas normativas de obligado cumplimiento para la utilización de organismos modificados genéticamente.
- La utilización de cerdos transgénicos es éticamente aceptable como fuente de órganos y tejidos para trasplante.
- Los animales no serán utilizados para pruebas triviales.
- Los animales serán tratados de la mejor manera posible dentro de lo que permita la práctica para la que sean utilizados.
- No se causará a los animales daño innecesario ni desproporcionado al beneficio esperado de la práctica a la que se les someta.
- Para iniciar ensayos clínicos tiene que haberse profundizado en el conocimiento de los riesgos para el paciente y su entorno, así como constatar la aceptación lúcida por parte del paciente.

Al objeto de crear en España el marco adecuado para el desarrollo de los estudios en xenotrasplante conforme al actual estado de los conocimientos científicos, de forma tal que promueva su práctica

en las condiciones de eficacia, ética, y garantía sanitaria correctas, esta Comisión considera que, definiendo el xenotrasplante como el trasplante de células, tejidos u órganos de no humanos a humanos:

1. *Cualquier estudio in vivo que incluya simios o humanos deberá ser evaluado por esta Comisión.*
2. *Todas las investigaciones con células en el campo del xenotrasplante deben ser asimismo conocidas por esta Comisión.*
3. *Esta Comisión deberá establecer las bases de un Registro evolutivo de las investigaciones evaluadas.*

*Protocolo preclínico:*

Definición: Aquellas investigaciones que incluyan simios.

Requisitos imprescindibles:

Se exigirá el estricto seguimiento de agentes infecciosos conocidos (agentes y test recomendables para su seguimiento acorde con el conocimiento científico actualizado).

Cumplimiento de las normas de experimentación animal, de Salud Pública y Veterinarias vigentes en ese momento.

*Protocolo clínico:*

Definición: Aquellas investigaciones que incluyan humanos.

Requisitos imprescindibles:

- Disponer de un estudio preclínico que haya cumplido las siguientes condiciones:
- Haber demostrado supervivencia y función de las células, tejidos u órganos injertados durante un período mínimo de seis meses.
- Haber demostrado ausencia de transmisión de agentes infecciosos durante seis meses al animal receptor.

Si se demuestra transmisión de agentes infecciosos será preciso un seguimiento mínimo de un año para evaluar las consecuencias de dicha transmisión, tanto en el animal receptor como en su entorno.

- Haber demostrado ausencia de transmisión no accidental de agentes infecciosos a los cuidadores y personal implicado en la experimentación.



## Condiciones a tener en cuenta respecto al animal fuente de órganos para trasplante

### A) Instalaciones en investigación biomédica animal

Se observarán las máximas garantías de seguridad supervisadas por las autoridades sanitarias públicas y los responsables de los equipos de trasplante. Las instalaciones animales contarán con los sistemas de vigilancia sanitaria adecuados y sus resultados estarán documentados. Se dispondrá de veterinarios con experiencia en las enfermedades infecciosas prevalentes en la especie animal y se mantendrá activa colaboración con acreditados laboratorios de microbiología.

A.1) En los protocolos de actuación se deben contemplar los siguientes aspectos:

1. Criterios para la admisión de animales.
2. Descripción del programa de monitorización de enfermedades.
3. Criterios para el aislamiento o eliminación de animales enfermos.
4. Estudios de salud y vigilancia de los humanos que entran en contacto con dichos animales.
5. Limpieza de las instalaciones.
6. Origen y forma de administración de alimentos, comidas, etc.
7. Medidas para impedir la aparición de artrópodos y otros animales.
8. Transporte de los animales.
9. Eliminación de animales fallecidos.
10. Instalaciones legalmente reguladas para los animales modificados genéticamente.

La entrada y salida de animales, cuidadores y personal implicado en el experimento debe ser controlada para minimizar exposiciones inadvertidas a agentes infecciosos transmisibles.

A.2) El movimiento de los animales a través de las instalaciones debe estar descrito en los procedimientos. Cualquier nuevo animal de una colonia que no haya nacido en ella debe atravesar un período de cuarentena y estudio. Con respecto a la reproducción y origen de animales útiles, el uso de métodos tales como inseminación artificial, transferencia de embriones, histerotomía/histerectomía y supresión de la lactancia materna puede minimizar la posible colonización con agentes infecciosos.

- A.3) Durante el despistaje final y cualificación de un animal concreto, como origen de xenotrasplante, el potencial de transmisión de un agente infeccioso será minimizado mediante el movimiento escalonado de lotes o métodos de entrada y salida completa del animal fuente a las instalaciones. Con los anteriores métodos uno o más de los animales origen serán seleccionados de la colonia y permanecerán en cuarentena mientras se realiza el despistaje calificativo final y la obtención de órganos. Después de que el lote completo de animales fuente es trasladado, las áreas de cuarentena y obtención de injertos serán lavadas y desinfectadas antes de la introducción del siguiente lote.
- A.4) Los componentes alimenticios, incluyendo medicinas o aditivos, deben estar documentados al menos una generación anterior al animal fuente. Los alimentos de origen animal deben estar específicamente documentados, y los animales que se alimenten con ellos podrían ser descartados, ya que la ausencia de tales alimentos es importante en la prevención de enfermedades asociadas a priones e infecciones por virus lentos. Los largos períodos de latencia clínica, la severidad de las enfermedades que transmiten y la dificultad de los actuales métodos de detección señalan la importancia de eliminar los factores de riesgo asociados con la transmisión de priones.
- A.5) Se debe contar con un sistema de registro que documente cada animal, órgano, tejido o tipo de células distribuidos o utilizados para trasplante y los centros de trasplante donde fueron enviados. Dicho registro debe mantenerse en la historia de salud del animal fuente para siempre, en la documentación de vigilancia sanitaria de cada lote y en los procedimientos protocolizados de las instalaciones de obtención de animales. La numeración animal u otro sistema de identificación debe ser utilizado para permitir un fácil, rápido y seguro rastreo de la información contenida en los diferentes sistemas de registro.
- A.6) Cuando se produzca el cierre de unas instalaciones biomédicas de animales, todas las historias de salud y especímenes deben ser transferidos a los respectivos centros clínicos de trasplante o los centros deben ser informados del nuevo lugar de archivo.
- A.7) Cuando se trate de animales modificados genéticamente, deberá dirigirse al órgano competente una comunicación por separado para la primera utilización de instalaciones para operaciones con organismos de alto riesgo o de bajo riesgo (Art. 10.3 del Real Decreto 951/1997).

- A.8) Grado especial de origen y confinamiento de animales modificados genéticamente con destino a un programa de xenotrasplantes.

**TABLA 6**  
**Condiciones de obtención y confinamiento para**  
**animales modificados genéticamente**

Especificaciones	Categoría	
	Xenotrasplante experimental entre especies no humanas	Xenotrasplante experimental a especie humana
1. Obtención de candidatos a donantes mediante:	Métodos MD ( <i>minimal disease</i> ) convencionales tales como MEW (Destete precoz medicado)	Histerectomía a término y supresión de lactancia natural
2. Los animales viables deberán confinarse en una instalación que separe físicamente	Sí	Sí
3. Deberán tratarse las vías de entrada para:	Minimizar la entrada	Impedir la entrada
4. La toma de muestras, la adición de materiales y el movimiento de animales u organismos viables deberán:	Minimizar el riesgo de contacto	Impedir el contacto
5. El agua utilizada para bebida y limpieza deberá tratarse previamente para garantizar su total inocuidad	Facultativo	Obligatorio
6. Deberán diseñarse precintos para:	Minimizar la entrada	Impedir la entrada
7. Las instalaciones de confinamiento deberán ubicarse en una zona controlada:	Sí	Sí
a) Sólo se permitirá el acceso a personal autorizado	Sí	Sí
b) Se establecerán criterios de cuarentena para el personal que visite y/o atienda a los animales y que previamente haya tenido contacto con otros animales	Facultativo	Obligatorio
c) Se expedirá una acreditación sanitaria específica para el personal que maneje los animales de forma rutinaria	Facultativo	Obligatorio
d) El personal deberá ducharse antes de entrar a la zona controlada	Sí	Sí
e) La ropa de trabajo se lavará y desinfectará dentro de la zona controlada, no permitiéndose la entrada de ningún material ajeno a la zona	Facultativo	Sí
f) En la zona controlada deberá ventilarse adecuadamente y mantener una presión de aire positiva con respecto a la atmósfera	Facultativo	Sí
g) Se deberá tratar con filtros HEPA el aire de entrada a la zona controlada	Facultativo	Sí
h) Los alimentos, material y enseres que entren a la zona controlada serán desinfectados mediante los medios más eficaces conocidos	Facultativo	Sí

B) *Despistaje preclínico para agentes infecciosos conocidos*

Deben estudiarse los agentes infecciosos conocidos tanto en la colonia como en el animal fuente y como en el xenoinjerto.

- B.1) Los estudios preclínicos se deben realizar de acuerdo al progresivo desarrollo del conocimiento científico en el uso del xenoinjerto y deben ser específicos de especie en la identificación de agentes microbianos en el xenoinjerto. Estos estudios deben señalar el potencial patogénico al hombre de los agentes identificados. La caracterización de la patogenicidad al hombre de los retrovirus endógenos xenotrópicos y las infecciones virales persistentes presentes en el animal origen de órganos, tejidos y células es particularmente importante.

Los estudios preclínicos deben desarrollar protocolos adecuados para el despistaje programado de la calidad de los xenoinjertos para uso clínico.

- B.2) Los protocolos para despistaje y detección de agentes infecciosos conocidos en la colonia, en el animal fuente y en el xenoinjerto deben ser realizados a medida para la especie animal y la aplicación clínica, y deben ser actualizados periódicamente, reflejando los avances en el conocimiento de las enfermedades infecciosas. Los equipos de xenotrasplante son responsables de la idoneidad de los protocolos de despistaje.
- B.3) Todas las pruebas utilizadas para el despistaje e identificación de agentes infecciosos (tanto oportunistas como patógenos) en la colonia o lote, en los animales origen y en el análisis final de los xenoinjertos, deben estar bien documentadas, tanto en su especificidad y sensibilidad como en lo que se refiere a su validación en la situación en que ellos son utilizados.
- B.4) Las muestras de xenoinjerto deben ser testadas preclínicamente con pruebas de cocultivo que incluyan un apropiado panel de células indicadoras, como son las células mononucleadas sanguíneas humanas para facilitar la amplificación y detección de retrovirus endógenos xenotrópicos capaces de producir infección en el hombre. La selección de las células indicadoras en el panel de cultivo debe realizarse de acuerdo al xenoinjerto y su aplicación clínica. Por ejemplo, un xenotrasplante que implique al sistema nervioso central puede precisar un cocultivo de una muestra del xenoinjerto con una línea celular de neuronas humanas en un intento de detectar virus neurotrópicos. Podría ser adecuado realizar pases

seriados y observar los efectos citopáticos, y la formación de grumos, así como ensayos de transcriptasa inversa y microscopía electrónica.

Cuando el cultivo sugiere la presencia de agentes virales pueden ser útiles las técnicas inmunológicas o genéticas o de cultivo *in vivo* en otras especies.

La detección de virus latentes puede ponerse de manifiesto utilizando métodos químicos o irradiación.

Para la detección de posibles bacterias en el xenotrasplante debe utilizarse la PCR.

### C) *Mantenimiento y vigilancia de la salud de la colonia/rebaño*

Los principales elementos para calificar a una colonia o rebaño como origen de animales para uso en xenotrasplante incluyen: (1) colonia o rebaño cerrado y (2) adecuado programa de vigilancia de problemas infecciosos. La documentación debe estar disponible en los protocolos de instalación de animales. Los protocolos deben estar disponibles para su revisión por los comités. Se deberá mantener indefinidamente la documentación relativa a la colonia y los animales calificados como origen de xenoinjertos.

- C.1) Se deberán utilizar técnicas asépticas y equipos estériles en todas las intervenciones parenterales, incluidas vacunaciones, flebotomías o biopsias. Todos los incidentes que puedan afectar a la salud de la colonia o rebaño deben ser registrados (ejemplo: rotura de las barreras ambientales en la seguridad de la instalación, muerte súbita de animales o enfermedades epidémicas). Las vacunaciones y los procedimientos de despistaje deben ser descritos en detalle. Se desaconseja el uso de vacunas de agentes vivos; su uso sólo estaría justificado cuando no existan vacunas de virus muertos o acelulares disponibles.
- C.2) Además de los cuidados médicos habituales, la colonia/rebaño debe ser monitorizada ante la eventualidad de una infección subclínica. Los protocolos deberán describir el programa de monitorización, incluyendo el tipo y la programación de las pruebas clínicas y test de laboratorio utilizados en la detección de los agentes infecciosos.
- C.3) El despistaje de rutina a toda colonia o rebaño cerrado se debe centrar en las zoonosis propias de los animales cautivos, teniendo en cuenta la localización geográfica. Se debe contar con la colaboración de veterinarios familiarizados con la prevalencia de distintos agentes infecciosos en el área geo-

gráfica de origen de los animales fuente de xenotrasplante, así como del área donde estarán las instalaciones de confinamiento.

- C.4) Como parte del programa de vigilancia de rutina se obtendrán muestras de suero de animales seleccionados al azar que serán representativos de la población de la colonia, que deben ser estudiadas para el despistaje de agentes infecciosos más relevantes de la especie. Se realizarán análisis serológicos adicionales o cultivos activos en animales concretos en respuesta a indicaciones clínicas. La infección de un animal de la colonia justifica una evaluación clínica y epidemiológica del resto de los animales de la colonia o rebaño. Además, se debe mantener una seroteca indefinidamente en las instalaciones de investigación animal para poder realizar eventuales investigaciones adicionales de enfermedades no sospechadas en la colonia o rebaño, en animales concretos, en receptores de xenoinjertos o en sus contactos.
- C.5) Ante cualquier animal muerto por causa desconocida o no totalmente aclarada, incluyendo abortos y mortalidad perinatal, se realizará un estudio necrópsico completo con evaluación de posibles etiologías infecciosas.
- C.6) Se fomentará la cría y monitorización de animales controles durante su vida natural, lo que incrementará las posibilidades de detección de enfermedades subclínicas, latentes o de aparición tardía, tales como las enfermedades mediadas por priones.

D) *Cualificación y estudio en animales concretos*

La documentación de cualificación de animales concretos como fuente de xenotrasplante incluirá datos sobre la cría y procedencia, así como de salud general, incluyendo el calendario vacunal, con especial mención al uso de cualquier vacuna de virus vivos atenuados. La presencia de patógenos, que pueden producir infección activa, debe ser controlada mediante exploración clínica y aplicación de períodos de cuarentena adecuados y más largos que el período de incubación del patógeno que se sospeche. Establecer asimismo vigilancia estrecha a la colonia de la cual dicho animal fue seleccionado. Durante la cuarentena, los animales fuente deben ser estudiados para agentes infecciosos con especial potencial de infectividad clínica.

- D.1) El animal fuente debe permanecer en cuarentena durante al menos tres semanas antes del procedimiento de obtención

de un xenoinjerto. Este tiempo es suficiente para declararse una enfermedad aguda por agentes infecciosos, a los cuales el animal pudiera haber sido expuesto. Cuando el período de cuarentena se acorte, se debe incluir la justificación en el protocolo, y el aumento potencial de riesgo infeccioso debe ser señalado en el documento de consentimiento informado.

- D.2) Durante el período de cuarentena los animales candidatos a ser fuente deben ser evaluados para la presencia de agentes infecciosos (bacterias, parásitos y virus) por serologías adecuadas o cultivos de sangre completa, frotis en sangre periférica y examen fecal para parásitos. La evaluación de agentes virales que pueden no ser reconocidos como agentes zoonóticos, pero cuya infección ha sido documentada tanto en células humanas como en células de primates no humanos *in vitro* o *in vivo*, se debe tener en cuenta. Se debe poner particular atención a los virus con reconocida capacidad de recombinación, complementación o pseudotipaje. Estos test deben ser realizados lo más próximo posible a la fecha del trasplante, siempre que se asegure la disponibilidad de los resultados antes de su utilización clínica.
- D.3) Los estudios al candidato animal origen del xenotrasplante se deben repetir antes de la obtención de xenoinjertos si ha transcurrido un período mayor de tres meses desde que se realizó el despistaje inicial y la cualificación, o si el animal ha estado en contacto con animales en el período entre la cuarentena y el momento de la obtención de las células, tejidos u órganos.
- D.4) El transporte de animales origen de xenotrasplantes puede comprometer la protección seguida en la colonia cerrada. Una cuidadosa atención a las condiciones de transporte puede minimizar, pero no eliminar, la exposición a enfermedades durante el envío. Una cuarentena de mayor duración y estudios comparables a los utilizados cuando entran animales nuevos en un rebaño o colonia cerrada deben ser instituidos a la llegada. Los xenoinjertos deben ser obtenidos, siempre que sea posible, en las instalaciones animales y transportados como células, tejidos u órganos para ser trasplantados.
- D.5) Todos los órganos, tejidos o células obtenidos con la finalidad de un uso clínico deben estar tan libres de agentes infecciosos como sea posible. Se debe evitar la utilización de animales origen de xenoinjertos en los que se hayan identificado agentes infecciosos, incluyendo virus latentes. Sin embargo,

la presencia de un agente en determinados sitios anatómicos, por ejemplo, el tracto alimentario, puede no excluir dicho animal de su utilización si se documenta su ausencia en el xenoinjerto.

- D.6) Se realizarán estudios biopsicos e histopatológicos para agentes infecciosos por los medios adecuados previos al trasplante, siempre que sea posible, y no se comprometa el xenoinjerto. Los resultados de todos los estudios serán revisados por el investigador principal antes de la utilización clínica del xenoinjerto.
- D.7) La historia de salud de la colonia y/o animales concretos fuente de xenoinjertos estarán disponibles a los comités de revisión. Todos los datos relevantes para la salud de la vida del animal, incluyendo tanto a la colonia como a sus integrantes, y una historia completa de vacunaciones deben estar disponibles y ser revisadas antes de la selección de los animales candidatos y la obtención de células, tejidos u órganos. Estos archivos se mantendrán indefinidamente para revisiones retrospectivas. Una copia de estos archivos acompañará al xenoinjerto y se archivará como parte permanente de la historia clínica del receptor.
- D.8) Siempre que un agente infeccioso sea identificado en la colonia o en el animal con posterioridad a la obtención de un xenoinjerto (identificación de una enfermedad de comienzo retardado mediada por priones en un animal centinela), los responsables de las instalaciones animales biomédicas lo notificarán al centro clínico receptor.

#### E) *Obtención y estudios del xenoinjerto*

La obtención y el procesamiento de células, tejidos u órganos se deben realizar en condiciones de asepsia documentada destinadas a minimizar la contaminación. Estos procedimientos se realizarán en instalaciones acreditadas y sujetas a inspecciones.

- E.1) Se deben emplear procedimientos que inactiven o eliminen patógenos sin comprometer la integridad y función del xenoinjerto.
- E.2) Células, tejidos y órganos destinados al trasplante que sean mantenidos en cultivo antes de dicho procedimiento deben ser evaluados periódicamente para asegurar el mantenimiento de la esterilidad, incluyendo estudios para virus y micoplasma.



- E.3) Para asegurar la reproductibilidad del control de calidad de la obtención y estudios realizados, todos los acontecimientos que sean detectados desde la obtención del xenoinjerto hasta el trasplante del tejido en el receptor deben ser recogidos y documentados.
- E.4) Cuando el animal es sacrificado durante el procedimiento de la obtención de células, tejidos u órganos, se realizará una necropsia completa que incluirá evaluación macro y microscópica, histopatológica y microbiológica. Cuando el xenoinjerto se obtiene sin el sacrificio del animal, la salud de dicho animal será monitorizada de por vida. Cuando estos animales se sacrifican, con independencia del tiempo transcurrido entre la obtención del injerto y el fallecimiento, se realizará igualmente una necropsia completa. La historia médica completa del animal, incluyendo su necropsia, se archivarán indefinidamente. En el caso de que los hallazgos necróticos sugieran infecciones de consideración en la salud del xenoinjerto o del receptor (evidencia de enfermedad asociada a priones) éstos serán comunicados a todos los centros de trasplante que hayan recibido células, tejidos u órganos procedentes de dicho animal.

F) *Registros de la historia médica del animal y muestra.*

Se debe crear un archivo sistemático de todas las muestras biológicas del animal de forma que permita una rápida identificación de la fuente con el receptor. Este archivo de muestras y datos es esencial para las investigaciones en salud pública y la detección de potenciales infecciones xenogénicas.

- F.1) La responsabilidad del mantenimiento, acceso, archivo y recogida de datos debe estar claramente especificado en la investigación y en el protocolo clínico.
- F.2) Los datos de los archivos relacionados con la salud de la colonia y de los animales individuales fuente de xenoinjertos y los archivos de los análisis de evaluación de los xenoinjertos se mantendrán indefinidamente. Un resumen de lo anterior se enviará y archivará en el centro de trasplante y se deberá mantener como parte de la historia médica del receptor.
- F.3) Para fines de investigaciones retrospectivas en salud pública, muestras biológicas de los animales fuente de xenoinjertos, se almacenarán en el momento de la obtención del xenoinjerto. Todas las muestras deben permanecer almacenadas indefinidamente para permitir análisis retrospectivos si re-

querimientos de Salud Pública así lo exigieran. Las muestras biológicas serán accesibles rápida y fácilmente y permitirán la relación entre el animal fuente del xenoinjerto y el receptor del mismo.

- F.4) Idealmente, al menos cinco alícuotas de 0,5 cc cada una de suero y de plasma del animal origen de xenoinjerto deben estar almacenadas. Al menos tres alícuotas de leucocitos viables deben estar criopreservadas ( $1 \times 10^7$ ). De forma óptima, alícuotas con DNA y RNA extraídos de los leucocitos deben ser almacenadas. Adicionalmente, muestras de tejido (bazo, hígado, médula ósea, sistema nervioso central) deben ser obtenidas de los animales que fallecen en el procedimiento de obtención del xenoinjerto y criopreservadas, conservadas en parafina y fijadas con formol.

## Estudios clínicos

### El receptor de xenotrasplante

La monitorización clínica y de laboratorio, tras un procedimiento de xenotrasplante, es crítica para vigilar la introducción y propagación de agentes infecciosos xenogénicos en la población general. La realización y documentación de esta vigilancia es responsabilidad del centro clínico y debe realizarse durante toda la vida del receptor. Los adecuados métodos de vigilancia deben incluir:

- Vigilancia durante las visitas clínicas periódicas tras el trasplante de los acontecimientos clínicos adversos potencialmente asociados con infecciones xenogénicas.
- Obtención y archivo de muestras biológicas que permitan de manera retrospectiva la investigación de posibles infecciones xenogénicas. Las muestras biológicas deben ser recogidas para propósitos de investigación en Salud Pública. Las muestras obtenidas deben ser las adecuadas al trasplante específico. Se deben obtener suero, plasma y leucocitos periféricos y preferiblemente al menos tres de cinco alícuotas de 0,5 cc de plasma anticoagulado con citrato o EDTA deben almacenarse en momentos predeterminados. Al menos 2 alícuotas de leucocitos viables ( $1 \times 10^7$ ) deben ser criopreservadas. De forma adicional, alícuotas de DNA y RNA extraídos de leucocitos y/o suero también deben almacenarse. También deben ser almacenadas muestras de cualquier xenoinjerto que sea extraído (posrechazo, en el fallecimiento). Se recomienda el siguiente esquema para la recogida de muestras:

1. *Un mes antes del xenotrasplante se obtendrán dos series de muestras. Si esto no es posible se obtendrán lo más separadamente posible del xenotrasplante.*
  2. *En el período postrasplante inmediato, y aproximadamente al mes y al sexto mes postrasplante, se obtendrá cada vez una serie de muestras.*
  3. *Una serie de muestras se obtendrá anualmente durante los dos primeros años del xenotrasplante.*
  4. *Después de lo anterior, las muestras se deben espaciar cada cinco años durante el resto de la vida del receptor.*
  5. *La obtención y archivo de muestras puede ser más frecuente si así lo indican protocolos específicos o lo aconseja la evolución médica del receptor.*
- En el caso de fallecimiento del receptor, muestras almacenadas a  $-70^{\circ}$ , tejidos embebidos en parafina y tejidos para estudio de microscopía electrónica deben ser obtenidos en la autopsia del xenoinjerto y de todos los órganos mayores que hayan estado en relación con el trasplante o con el síndrome clínico responsable del fallecimiento. Estas muestras deben ser almacenadas indefinidamente ante un potencial uso en estudios de Salud Pública.
- El centro clínico es responsable del mantenimiento, seguimiento y seguridad del archivo de las muestras biológicas. En ausencia de una instalación central, las muestras biológicas destinadas a Salud Pública deben ser archivadas con las garantías adecuadas para su almacenamiento a largo plazo (sistemas de alarmas de frío monitorizadas y muestras repartidas en congeladores separados), y con un sistema eficiente para su rápida obtención y seguimiento de datos que permitan la unión de la historia médica del/de los receptores con su animal origen.
- Además del archivo de muestras biológicas, se debe realizar seguimiento activo de programas de laboratorio de vigilancia a los receptores de xenoinjertos cuando agentes xenogénicos conocidos o sospechados estén presentes en el xenoinjerto. La intención de este despistaje activo es detectar infecciones humanas antes de la diseminación a la población general. Muestras de suero, leucocitos o tejidos deben ser analizados a intervalos periódicos postrasplante para agentes xenogénicos que se saben presentes en el tejido trasplantado. La vigilancia activa debe in-

cluir estudios más frecuentes en el período postrasplante inmediato (dos, cuatro y seis semanas postrasplante) con incremento en la frecuencia en presencia de indicaciones clínicas. Se consideran adecuados los estudios orientados a la detección general de agentes desconocidos. Se deben realizar estudios para detectar clases de virus conocidos que establecen infecciones persistentes latentes en ausencia de síntomas clínicos (por ejemplo, herpesvirus y retrovirus). Cuando los virus xenogénicos tienen similares contrapartidas en los humanos, se deben utilizar técnicas para distinguirlos (por ejemplo, CMV de simio). Dependiendo del grado de inmunosupresión en el receptor, los estudios serológicos pueden ser útiles o no. Los métodos de análisis deben comprender cocultivos y adecuados métodos de detección. La sensibilidad, especificidad y validación de los métodos utilizados deben ser probadas y documentadas en condiciones que simulen las empleadas en el procedimiento de xenotrasplante.

- En respuesta a una potencial infección xenogénica relacionada con un episodio clínico, los estudios de las muestras biológicas obtenidas postrasplante deben realizarse de forma paralela a una investigación epidemiológica para seguir la Salud Pública con relación a la infección. La investigación debe realizarse bajo la dirección de las adecuadas autoridades sanitarias, después de una inmediata notificación al órgano competente.

## **Contactos del receptor**

El protocolo clínico debe incluir información al receptor de la responsabilidad de educar a las personas con las que se relacione de forma íntima respecto a la posibilidad de aparición de una infección xenogénica de origen en el animal donante; el centro médico deberá asesorarle en esto si así lo requiere. La educación en estos contactos íntimos debe dirigirse hacia el riesgo de las infecciones xenogénicas, hacia la información del comportamiento conocido de agentes infecciosos transmisibles entre humanos (relaciones sexuales sin protección, utilización de drogas intravenosas compartiendo jeringuillas u otras actividades que impliquen intercambio de sangre u otros fluidos corporales) y los métodos para minimizar el riesgo de transmisión. Los receptores deben educar a las personas con las que mantengan relaciones íntimas en la necesidad de informar de cualquier enfermedad que presenten, con importancia clínica y no explicada, a su médico y al investigador principal de la institución donde se realizó la intervención.

## Control hospitalario de infecciones

- Se deben emplear precauciones estándar en el cuidado de todos los pacientes, incluyendo el adecuado lavado de manos, utilización de métodos de barrera de precaución y cuidado en la utilización y desecho de agujas e instrumentos punzantes. El estricto cumplimiento de estas recomendaciones puede reducir los riesgos de transmisión de enfermedades xenogénicas y otros patógenos nosocomiales o transmitidos por la sangre.
- Adicionales medidas de control o de aislamiento se deben utilizar según estén indicadas a juicio de los especialistas en epidemiología y en enfermedades infecciosas, y el equipo de xenotrasplante. La idoneidad de las medidas de control de infección se debe considerar en el momento del trasplante y reevaluar en cada ingreso. Las precauciones de aislamiento deben continuar hasta que se haya demostrado y resuelto la infección xenogénica sospechada o hasta que ésta haya sido excluida.
- Los equipos de xenotrasplante deben responsabilizarse de seguir las medidas recomendadas para el manejo, la desinfección/esterilización del instrumental médico y la eliminación de los residuos infecciosos.
- Episodio infeccioso agudo: La mayoría de las infecciones virales agudas en la población general nunca son etiológicamente identificadas. Los receptores de un xenoinjerto tienen el riesgo de estas infecciones y además otras infecciones comunes en los pacientes inmunodeprimidos. Cuando el origen de una enfermedad relevante en un receptor no es identificado a pesar de la utilización de procedimientos diagnósticos estándar, se deben realizar otros procedimientos de análisis añadidos, tanto en fluidos corporales como en tejidos. Especialistas en enfermedades infecciosas junto con epidemiólogos, veterinarios, microbiólogos clínicos y otros miembros del equipo de xenotrasplante deben seguir cada episodio clínico y establecer las medidas adecuadas en cuanto al tipo de los test diagnósticos y precauciones adecuadas para el control de la infección. Puede ser necesario consultar a expertos en enfermedades infecciosas y en Salud Pública.
- La inmunosupresión de los pacientes trasplantados puede limitar una respuesta inmunológica suficiente para permitir la detección de la infección por estudios serológicos. En estas circunstancias, otros métodos adecuadamente validados pueden ser necesarios (cultivos, detección genómica). Por ello, los centros que realicen

xenotrasplante deben contar con la posibilidad de realizar cultivos e identificar agentes virales por métodos *in vivo* e *in vitro*. Las muestras se deben manejar asegurando su viabilidad y maximizando la probabilidad de aislamiento e identificación de estos agentes. Se deben desarrollar algoritmos, en colaboración con expertos en la materia (personas con experiencia tanto médica como veterinaria en enfermedades infecciosas), para la evaluación e identificación de patógenos xenogénicos desconocidos, así como para el manejo, con seguridad sanitaria, de las muestras para tal investigación.

- Se archivarán sueros tanto en la fase aguda como en la de convalecencia de la enfermedad en aquellas enfermedades no conocidas, cuando se considere oportuno a juicio de los médicos de enfermedades infecciosas y epidemiólogos del hospital. Esto permitirá un estudio retrospectivo y quizá un diagnóstico etiológico del episodio clínico.
- Trabajadores sanitarios: Se debe diseñar un programa de salud para educar a los profesionales en riesgo y monitorizar sus posibles infecciones. Los trabajadores sanitarios, incluyendo el personal de laboratorio que maneja órganos o tejidos animales antes del trasplante, tienen un riesgo de infección no superior al de los cuidadores de animales, veterinarios o trabajadores de mataderos que están de forma rutinaria expuestos a estas especies animales y en consecuencia se deben utilizar estándares equivalentes de seguridad. Sin embargo, el riesgo de los profesionales sanitarios en contacto directo o indirecto con los receptores de un xenotrasplante es indefinido. Las decisiones de restricción al trabajo o asignación al mismo de profesionales inmunocomprometidos deben ser determinadas en cada institución. Los programas de salud deben incluir:
  - a) Educación a los profesionales sanitarios.
  - b) Vigilancia de los trabajadores.
  - c) Manejo y evaluación postexposición.
- a) *Educación a los profesionales sanitarios.* Cada centro que realice procedimientos de xenotrasplante debe desarrollar un programa educativo a medida de los mismos. Estos programas describirán los procedimientos de xenotrasplante y los riesgos de infección xenogénica conocidos o potenciales asociados a ellos. Las actividades de investigación o cuidados sanitarios que se consideren con mayor riesgo deben ser enfatizados con el fin de minimizar la exposición y transmisión de agentes nosocomiales y zoonóticos entre el receptor y los profesionales sanitarios. Los protocolos estandarizados

deben ser revisados. Los programas de educación deben detallar las circunstancias de utilización de equipos de protección personal (guantes, mascarillas, batas, etc.) y la importancia del lavado de manos antes y después del contacto con cada paciente, incluso si se han utilizado guantes. Se incluirá el riesgo de transmisión a la población general.

- b) *Vigilancia de los trabajadores.* Se desarrollarán protocolos para la obtención y archivo de sueros base (previas a la exposición al xenoinjerto o receptor) para los trabajadores sanitarios, tanto de los equipos de xenotrasplante como de los cuidadores de los receptores y del personal de laboratorio que pudiera manejar células, tejidos u órganos animales o muestras biológicas de los receptores del trasplante. El suero de archivo será base para la comparación con sueros obtenidos tras exposiciones nosocomiales. Además, estos protocolos deben describir los métodos de archivo, almacenamiento y obtención de información con relación a los profesionales sanitarios y exposiciones nosocomiales específicas. Las actividades de los servicios de salud ocupacional deben estar coordinadas con programas de control de infecciones para asegurar una vigilancia adecuada de las infecciones en el personal.
- c) *Manejo y evaluación postexposición.* Se debe contar con protocolos escritos para la evaluación de los profesionales sanitarios que han sido expuestos a un riesgo de transmisión infecciosa (pinchazo accidental). Los profesionales sanitarios, incluyendo personal de laboratorio, deben ser instruidos para comunicar dichas exposiciones inmediatamente al servicio de salud ocupacional. El protocolo postexposición deberá describir la precisa información que se debe recoger, incluyendo la fecha y naturaleza de la exposición, el procedimiento de xenotrasplante, la información al receptor y las acciones tomadas como resultado de tal exposición (consejos, manejo y seguimiento postexposición) y la evaluación de dicho incidente. Esta información se debe archivar indefinidamente en el centro de xenotrasplante con independencia de cualquier cambio de trabajo del profesional o de la interrupción de la actividad de xenotrasplante en el centro. Los trabajadores sanitarios y de laboratorio deben comunicar y buscar evaluación médica ante enfermedades clínicas no explicables que ocurran después de la exposición.

## **Registro de los profesionales sanitarios**

Cada centro clínico de xenotrasplante debe mantener indefinidamente tres sistemas de registro de referencias cruzadas:

1. Un registro institucional de xenotrasplante con documentación de todos los procedimientos de xenotrasplante: el investigador principal, el animal origen individualizado y las instalaciones de obtención, la fecha y tipo de procedimiento, el receptor del tejido xenoinjerto y un resumen de la evolución clínica del receptor, contactos íntimos y los trabajadores sanitarios relacionados con cada procedimiento.
2. Un registro de exposiciones sanitarias nosocomiales en xenotrasplante con documentación de fechas, personas involucradas y la naturaleza de todas las exposiciones asociadas con el protocolo de xenotrasplante y que potencialmente supongan un riesgo de transmisión de enfermedades xenogénicas.
3. Registro médico e individual de receptores de xenotrasplante con documentación relativa a la evolución clínica de cada paciente, los resultados de la vigilancia postrasplante y un resumen del estado de salud y de los resultados de los estudios realizados al animal origen del xenotrasplante.

Estos registros deben estar actualizados y adecuadamente referenciados unos con otros. Su adecuado mantenimiento facilitará eventuales investigaciones epidemiológicas ante acontecimientos adversos. En el futuro éstos deberían conectarse a un Registro Nacional para facilitar el reconocimiento de la incidencia y ubicación de acontecimientos sanitarios adversos, incluyendo aquellos que puedan afectar a los resultados de infecciones xenogénicas, como patrones de mortalidad y conexión de estos acontecimientos con otras exposiciones específicas en el ámbito nacional.

## **Consentimiento informado**

### *Requisitos básicos obligatorios*

A continuación se exponen una serie de puntos que se recomiendan que figuren en todo formulario de Consentimiento Informado en Medicina, según la Ley General de Sanidad y las Recomendaciones del Convenio de Bioética del Consejo de Europa:

1. Identificación del Hospital y del Servicio Asistencial implicado.



2. Nombre del procedimiento y en qué consiste.
3. Identificación del procedimiento, habitualmente incluyendo información sobre el diagnóstico del paciente, objetivo y manera de llevarlo a término.
4. Consecuencias seguras del procedimiento (ejemplo: en una amputación hay que especificar que quedará sin el miembro).
5. Molestias y complicaciones relativamente frecuentes derivadas del procedimiento.
6. Complicaciones poco frecuentes pero de especial gravedad. Pero no se deben incluir aquéllas cuya probabilidad sea totalmente remota.
7. Tanto en este punto como en el anterior no se recomienda cuantificar estos riesgos en porcentaje, sino con expresiones cualitativas como «frecuentemente», «algunas veces», «en rarísimas ocasiones», etc.
8. Riesgo personalizado: circunstancias médicas o de otro tipo que añaden riesgos al procedimiento para este paciente en concreto.
9. Alternativas de tratamiento distintas al procedimiento recomendado (si las hay), así como sus consecuencias. Opcionalmente puede mencionarse que esas alternativas serán ofrecidas en la información oral proporcionada por el médico.

#### *Declaración de consentimiento*

10. Datos de identificación del paciente: Nombre y dos apellidos. Opcionalmente otros, como Documento Nacional de Identidad (DNI), n.º de Historia Clínica, etc.
11. Nombre del médico que informa al paciente. Nombre del médico que va a realizar el procedimiento.
12. Declaración de conformidad del paciente con la información recibida: La información ha sido entendida, se han podido hacer preguntas y aclaraciones necesarias y el paciente considera que la información que posee es suficiente para tomar adecuadamente la decisión.
13. Posibilidad de revocar el consentimiento en el momento en el que quiera sin tener que dar ninguna explicación.
14. Fecha y firmas del paciente y del médico que ha dado la información sobre el procedimiento.

### *Modelos especiales*

15. Declaración de consentimiento ante testigo: Para pacientes que no pueden leer el documento o que no pueden firmarlo.
16. Declaración de consentimiento del representante legal: Para pacientes que están incapacitados para tomar decisiones, por su edad (niños), por tener alteración del nivel de conciencia, o enfermedades psíquicas, etc.
17. Modelo de revocación del consentimiento: Opcionalmente se puede incluir.

### **Consentimiento informado en el xenotrasplante**

Los pacientes beneficiarios de un posible xenotrasplante deberán expresar por escrito su aceptación cuando previamente hayan recibido una información veraz respecto a todos los aspectos de interés, los riesgos, las posibilidades de fracaso y las complicaciones que concurren en este acto terapéutico.

Los problemas y peculiaridades que presenta la adaptación de un consentimiento informado tipo al xenotrasplante son:

- La información veraz del procedimiento y los riesgos conocidos y los remotos (*xenozoonosis*).
- La *voluntariedad*, frente a la falta de alternativa. Sobre todo cuando se plantee xenotrasplante de órganos diferentes del riñón en el que cabe la alternativa de seguir en diálisis. Por tanto, ésta sería una *voluntariedad condicionada*.
- La *confidencialidad* en este tipo de terapéutica casi seguro tendría que descartarse del consentimiento informado, porque los contactos (familiares y personal sanitario) deberán conocer los riesgos de xenozoonosis y el paciente será sometido a procesos de aislamiento probablemente más rigurosos que en otros casos de trasplantes de órganos.
- En este tipo de consentimiento no cabe la *irrevocabilidad*, sobre todo como hemos dicho en los casos de órganos distintos del riñón.
- Probablemente en el xenotrasplante habría que contemplar *el consentimiento informado a los familiares* por los problemas de transmisión de infecciones.

- Debería *incluir un documento informativo* adjunto con información específica a este procedimiento, que será más o menos detallado y será discutido por los profesionales científicos implicados en la realización del procedimiento. Podría contener algún apartado susceptible de ser completado individualmente (semiabiertos).
- Podría ser un modelo de consentimiento *más parecido al de los Ensayos Clínicos*, donde surge la necesidad de conciliar los derechos de las personas con las nuevas posibilidades terapéuticas para sus enfermedades.
- Se debe hacer constar que el paciente que renuncie a un xenotrasplante *no será discriminado* como receptor de un alotrasplante.
- Existe la posibilidad de tener modelos de consentimiento informado que sean *individualizados* para cada caso.

## Bibliografía

1. **Reemtsma, K.; McCracken, B. H.; Schlegel, J. U.; Pearl, M. A.; Pearce, C. & De Witt, C. W. (1964):** «Renal Heterotransplantation in man», *Ann. Surg.*, 160: 384-410.
2. **Starlz, T. E.; Marchioro, T. L.; Peters, G.; Kiepatrick, C. H.; Wilson, W. E. C. & Porter, K. A.: Renal Heterotransplantation from baboon to man: experience with 6 cases.**
3. **Bailey, L. L.; Nehlsen-Cannarella, S. L.; Concepcion, W. & Jolley, W. B. (1985):** «Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate», *JAMA*, 254: 3321-3329.
4. **Starlz, T. E.; Tzakis, A.; Fung, J. J., et al. (1994):** «Prospects of clinical xenotransplantation», *Transplant Proc.*, 26: 1082-1088.
5. **Calne, R. Y. (1970):** «Organ transplantation between widely disparate species», *Transplant Proc.*, 2: 550-553.
6. **Hager EB. (1967):** «The Forssman antigen as a model for the study of homograft and heterograft immunity», *Transplantation*, 5: 1436-1440.

7. **Michels, M. G. & Simmons, R. L.**: «Xenotransplant associated senses: strategies for prevention», *Transplantation*, 57: 1-7.
8. **Niekrasz, M.; Ye, Y. & Rolf, L. L. (1992)**: «The pig as organ donor for man», *Transplant Proc.*, 24: 625-626.
9. **Neuzil, D. F.; Rozga, J.; Demetriadis, A. A.; Moscioni, A. D.; Ro, M. S.; Hakim, R. & Arnaout, W. S. (1993)**: «Use of a novel bioartificial liver in a patient with acute liver insufficiency», *Surgery*, 113: 340-343.
10. **Makowka, L.; Wu, D.; Hoffman, A.; Podesta, L.; Sher, L. & Tusio, P. J. (1994)**: «Immunopathologic lesions associated with the rejection of a pig to human liver xenograft», *Transplant Proc.*, 26: 1074-1075.
11. **Kissmeyer-Nielsen, F.; Olsen, S.; Petersen, V. P. & Fjeldborg, O. (1966)**: «Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre existing humoral antibodies against donors cells», *Lancet*, 2: 662-665.
12. **Platt, J. L.; Fischel, R. J.; Matas, A. J.; Reif, S. A.; Bolman, R. M. & Bach, F. H. (1991)**: «Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model», *Transplantation*, 52: 214-220.
13. **Cooper, D. K. C.; Human, P. A.; Lexer, G. et al. (1988)**: «Effects of cycloporine and antibody adsorption on pig cardiac xenograft survival in the baboon», *J. Heart Transplant*, 7: 236-246.
14. **Damalasso, A. P.; Vecelloti, G. M.; Fischel, R. J.; Bolman, R. M.; Bach, F. H. & Platt, J. L.**: «Mechanism of complement activation in the hiperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients», *Am. J. Pathol.*, 140: 1157-1166.
15. **Kaplon, R. J.; Michler, R. E.; Xu, H.; Kwiatkowski, O. A.; Edwards, N. M. & Platt, J. L. (1995)**: «Absence of hiperacute rejection in newborn pig-to-baboon cardiac xenografts», *Transplantation*, 59: 1-6.
16. **Galili, U.; Macher, B. A.; Buehler, J. & Shohet, S. B. (1985)**: «Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1-3)-linked galactose residues», *J. Exp. Med.*, 162: 573-582.

17. **Parker, W. R.; Bruno, D.; Holzknecht, Z. E. & Platt, J. L. (1994):** «Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies», *J. Immunol.*, 153: 3791-3803.
18. **Galili, U. & Swanson, K. (1991):** «Gene sequences suggest inactivation of alpha-1-3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7401-7404.
19. **Galili, U.; Shohet, S. B.; Kobrin, E.; Stults, C. L. M. & Macher, B. A. (1988):** «Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells», *J. Biol. Chem.*, 263: 17755-17762.
20. **Platt, J. L.; Vercelotti, G. M.; Lindman, B. J.; Oegema, T. R. Jr.; Mach, F. H. & Dalmaso, A. P. (1990):** «Release of heparan sulfate from endothelial cells. Implications for pathogenesis of hiperacute rejection», *J. Exp. Med.*, 171: 1362-1368.
21. **Magee, J. C.; Collins, B. H.; Harland, R. C. et al. (1995):** «Immunoglobulin prevents complement-mediated hiperacute rejection in swine-to-primate xenotransplantation», *J. Clin. Invest.*, 96: 2404-2412.
22. **Miyagawa, S.; Hirose, H.; Shirakura, R. et al. (1988):** «The mechanism of discordant xenograft rejection», *Transplantation*, 46: 825-830.
23. **Dalmaso, A. P.; Vercelotti, G. M.; Platt, J. L. & Bach, F. H. (1991):** «Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hiperacute rejection», *Transplantation*, 52: 530-533.
24. **Good, A. H.; Cooper, D. K. C.; Malcom, A. J. et al. (1992):** «Identification of carbohydrate structures that bind human anti-porcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans», *Transplant Proc.*, 24: 559.
25. **Ye, Y.; Neethling, F. A.; Niekrasz, M. et al. (1994):** «Evidence that intravenously administered alpha-galactosyl carbohydrates reduce baboon serum cytotoxicity to pig kidney cells (PK15) and transplanted pig hearts», *Transplantation*, 58: 330-337.

26. **Koike, C.; Kannagi, R.; Takuma, Y. et al. (1996):** «Introduction of  $\alpha$  (1-2) fucosyltransferase and its effect on  $\alpha$  gal epitopes in transgenic pig», *Xenotransplantation*, 3: 81-86.
27. **Damasso, A. P. (1992):** «The complement system in xenotransplantation», *Immunopharmacology*, 24: 149-160.
28. **Cozzi, E. & White, D. J. G. (1995):** «The generation of transgenic as potential organ donors for humans», *Nat. Med.*, 1: 964-966.
29. **Diamond, L. E.; McCurry, Kr.; Martin, M. J. et al. (1996):** «Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium», *Transplantation*, 61: 1241-1249.
30. **McCurry, K. R.; Kooyman, D. L.; Alvarado, C. G. et al. (1995):** «Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury», *Nat. Med.*, 1: 324-427.
31. **Rosengard, A. M.; Gary, N. R. B.; Langford, G. A.; Tucker, A. W.; Wallwork, J. & White, D. J. G. (1995):** «Tissue expression of human complement inhibitor, decay-accelerating factor, in transgenic pigs», *Transplantation*, 59: 1325-1333.
32. **Fodor, W. L.; William, B. L.; Matis, L. A. et al. (1994):** «Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogenic hyperacute organ rejection», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 11153-11157.
33. **4th International Congress for Xenotransplantation:** Nantes, Francia; septiembre 1997.
34. **Bach, F. H.; Winkler, H.; Ferran, C.; Hancock, W. W. & Robson, S. C. (1996):** «Delayed xenograft rejection», *Immunol today*, 17: 379-384.
35. **Wecker, H.; Winn, HJ. & Auchincloss, H. (1994):** «CD4+ T cells, without CD8+ or B-lymphocytes can reject xenogenic skin grafts», *Xenotransplantation*, 1: 8-16.

36. **Wolf, L. A.; Coulombe, M. & Gill, R. G. (1995):** «Donor antigen-presenting cell-independent rejection of islet xenografts», *Transplantation*, 60: 1164-1170.
37. **Auchincloss, H. (1988):** «Xenogenic transplantation», *Transplantation*, 46: 1-2.
38. **Tolan, M. J.; Friend, P. J.; Cozzi, E., et al. (1996):** «Life-supporting transgenic kidney transplants in a Pig-to-primate model», *Abstracts of the XVI International Congress of the Transplantation Society*, Barcelona, page 102.
39. **4th International Congress for Xenotransplantation:** Nantes, Francia; septiembre 1997.
40. **Acuerdo del Consejo Interterritorial sobre Consentimiento Informado (1995):** *Memoria de las Actividades del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud*, 6 noviembre 1995.
41. **West, J. B. (ed.) (1985):** *Respiratory Physiology*, 3 ed., Baltimore, Williams and Wilkins.
42. **Tumbleson, M. E. (1986):** *Swine in biomedical research*, New York, Plenum Press.
43. **Wernhold, D.; Weingartner, J. & Hammer, C. et al. (1986):** «In vivo investigation of Kangaroo aortic valve xenoprostheses: an experimental animal model», *Yorke med Books*, 669-693.
44. **Kirkman, Rl. (1991):** «Of swine and men: organ physiology on different species», in Cooper, D. K. C.; Kemp, E.; Reemtsma, K. & White, D. J. G. (eds.): *Xenotransplantation*, Berlin, Springer-Verlag, 481.
45. **Hammer, C. (1990):** «Barreras naturales frente al xenotrasplante», en Arias, M.; Gómez Fleitas, M. y De Francisco, A. L. M.: *Xenotrasplante*, Sandozpharma, Barcelona.
46. **Starzl, T. E.; Tzakis, A.; Fung, J.; Todo, S.; Demetris, A. & Mañez, R. (1994):** «Prospects of clinical xenotransplantation», *Transpl. Proc.*, 26: 1082-1088.

47. **Dorling, A.; Riesbeck, K. & Warrens, A. (1997):** «Lechler Clinical xenotransplantation of solid organs», *Lancet*, 349: 867-871.
48. **Chapman, L. E.; Folks, T. M.; Salomon, D. R.; Paterson, A. P.; Eggerman, T. E. & Noguchi, P. D. (1995):** «Xenotransplantation and xenogenic infections», *N. Engl. J. Med.*, 333: 1498-1501.
49. **Nichaels, M. G.; McMichael, J. P.; Brasky, K.; Kalter, S.; Peters, R. L.; Starzl, T. E. & Simmons, R. L. (1994):** «Screening donors for xenotransplantation», *Transplantation*, 57: 1462-1465.
50. **Michaels, M. G. & Simmons, R. L. (1994):** «Xenotransplantation associated zoonosis», *Transplantation*, 57: 1-7.
51. **Fishman, J. A. (1997):** «Xenosis and xenotransplantation: Addressing the infectious risks posed by an emerging technology», *Kidney International*, 51 (suppl.) 58: 41-45.
52. **Ye, Y.; Nickrasz, M.; Kosankc, S.; Welsh, R.; Jordan, H. E.; Fox, J. C.; Edwards, W. C. et al. (1994):** «The pig as a potential organ donor for man», *Transplantation*, 57: 694-703.
53. **Fishman, J. A. (1994):** «Miniature swine as organ donors for man: Strategies for prevention of xenotransplant associated infections», *Xenotransplantation*, 4: 455-477.
54. **Draft Public Health Service Guideline on Infectious Disease Issues in Xenotransplantation (1996):** *Federal Register*, 85: 49919-49932.
55. «Guidance on xenotransplantation sought», *Nature Medicine*, 1997, 3: 935.
56. **Swindle, M. M. (1996):** «Considerations of specific pathogen-free swine in xenotransplantation», *J. Invest. Surg.*, 9: 267-271.
57. **Platt, J. L. (1997):** «Approaching the clinical application of xenotransplantation», *Am J. Med. Sci.*, 313: 315-321.



58. **Perico, N. & Remuzzi, G. (1997):** «Xenotransplantation: Problems and prospects», *Nephrol Dial Transplant*, 12 (suppl. 1): 59-64.
59. **Warrens, A. N.; Dorling, A. & Lechler, R. I. (1996):** «The prospects of xenotransplantation», *QJM*, 89: 885-891.
60. **Cooper, D. K. C.; Ye, Y.; Rolf, L. L. & Zuhdi, N. (1991):** «The pig as a potential organ donor for man, In xenotransplantation: The transplantation of organ and tissues between species», D. K. C. Cooper, E. Kemp, K. Rechtsma, D. J. C. White (eds.), Berlin: Springer-Verlag, 481-500.
61. **Ley General de Sanidad: 14/1986, de 26 de abril:** Artículo 10 (Consentimiento informado) y Artículo 31 (Competencias de las Comunidades Autónomas sobre protección y experimentación animal).
62. **Convention on Human Rights and Biomedicine (1997):** Capítulos II y III, Oviedo, 4 de abril.
63. **Daar, A. S. & D. Phill (1997):** «Ethics of Xenotransplantation: Animal issues, consent, and likely transformation of transplant ethics», *World J. Surg.*, 21: 975-82.
64. **Ley del Medicamento:** Real Decreto 561/1993 (Anexo 6).
65. **Simón Lorda, Pablo y Concheiro Carro, Luis (1993):** «El consentimiento informado: teoría y práctica», *Med. Clín.*, vol. 100, n.º 17.
66. **Simón Lorda, Pablo (1993):** «El consentimiento informado: teoría y práctica», *Med. Clín.*, vol. 101, n.º 5.
67. **Ley 30/1979, de 27 octubre:** *Extracción y Trasplante de órganos.*
68. **Real Decreto 426/1980, de 22 de febrero,** por el que se desarrolla la Ley 30/1979.
69. **Real Decreto 411/1996, de 1 de marzo:** Regulación de actividades relativas a la utilización de tejidos humanos.
70. **Ley 15/1994, de 3 de junio.** Régimen jurídico de la utilización de organismos modificados genéticamente.

71. **Real Decreto 951/1997, de 20 de junio**, por el que se aprueba el Reglamento General para el Desarrollo y Ejecución de la Ley 15/1994, de 3 de junio.
72. **Instrumento de Ratificación del Convenio Europeo hecho en Estrasburgo el 18 de marzo de 1986**. BOE 25805, de 25 de octubre de 1990.
73. **Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo**, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
74. **Orden de 13 de octubre de 1989**. Normas de registro de establecimientos, suministradores y usuarios de animales de experimentación de titularidad estatal.
75. **Advisory Group on the Ethics of Xenotransplantation (1997)**: *Animal Tissue into Humans*, TSO, London.
76. **García Barreno, Pedro (1996)**: «Biotecnología y sociedad. Futuro Imperfecto: Compromiso ético de la biotecnología», en A. Dou (ed.): *Evaluación Social de la ciencia y de la Técnica. Análisis de Tendencias*, UPCO, Madrid.
77. **García Gómez-Heras, José M.<sup>a</sup> y colab. (1997)**: *Ética del Medio Ambiente. Problema, Perspectivas, Historia*, Tecnos, Madrid.
78. **Informe Subcomisión de Xenotrasplantes de la Comisión Permanente de Trasplantes del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud (1997)**: Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.
79. **Gruen, Lori (1995)**: «Los animales», en Peter Singer (ed.): *Compendio de Ética. Diccionario de Adecué*, Alianza Editorial, Barcelona.
80. **Harris, John (1985)**: *The value of Life. An Introduction to Medical Ethics*, Routledge, London and New York.
81. **Jonas, Hans (1995)**: *El principio de responsabilidad. Ensayo de una ética para la civilización tecnológica*, Herder, Barcelona.
82. **Medical Research Council (1993)**: *Responsibility in the Use of Animals in Medical Research*, London.

83. **Reagan, Tom (1983):** *The Case for Animal Rights*, University of California Press. Berkeley and Los Angeles.
84. **Documento de Consenso de la Comisión Permanente de Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud (1993):** «Puntos éticos de conflicto que puede generar un trasplante de órganos», *Rev. Esp. Traspl.*, 2 (Extr. I): 9-11.
85. **DRAFT Public Health Service Guideline on Infections Disease Issues in Xenotransplantation: Notice**, Department of Health and Human Services Public Health Service (August 1996) (obtenido a través de Internet).



# **RISKS OF INFECTION IN XENOTRANSPLANTATION**

*Robin A. Weiss*

*Wohl Virion Centre, Windeyer Institute of Medical Sciences,  
University College London, UK*



## Introduction

With the growing pressure to carry out clinical xenotransplantation, the grafting of animal cells, tissues and organs into humans zoonoses have become a major area of concern (1, 2, 3). Zoonosis is the transmission of viruses and other infectious pathogens from animals to humans. While the benefit of the xenograft to the individual patient might outweigh the risk of infection, it is the fear of setting off a new epidemic in the human population that distinguishes the infection risks of xenotransplantation from the well known infections occurring in allografts and following blood transfusion.

Zoonosis has occurred ever since we learnt to hunt or domesticate animals. Yet we continue to witness unexpected events. The AIDS pandemic is caused by viruses which have only recently jumped host species from chimpanzees (HIV-1) and sooty mangabey monkeys (HIV-2) (4). New variant Creutzfeld-Jakob disease is linked to bovine spongiform encephalopathy. The current Malaysian epidemic of Nipah virus probably has a reservoir in fruit-bats, but is spread by pigs (5). The lack of onward, human-to-human transmission of chicken H5N1 influenza virus in Hong Kong two years ago was a fortunate, unpredictable feature of a zoonosis which killed 6 of 18 infected individuals.

If zoonoses happen so readily, why should we be concerned over an added risk of this occurring through xenotransplantation? In fact, such zoonoses are fairly rare events, but xenotransplantation could increase the risk of occurrence for three reasons:

1. The physical barrier is breached by implanting the tissues of one species into another.

2. The recipient patients will be severely immunosuppressed.
3. The transgenic animals providing the tissues will be expressing human genes that serve as virus receptors, and in addition may protect enveloped viruses from complement attack.

Thus source animals will need to be rigorously screened for microbes and potential pathogens. Not all such infections, however, can be readily eliminated. As discussed below, endogenous retroviruses have attracted special concern.

### **Progress in Xenotransplantation**

Among the animals considered as sources for xenografted tissues, pigs are considered the most suitable. While primate tissues may be better tolerated immunologically, there are ethical and supply problems in addition to the difficulty of maintaining them in specific pathogen free conditions (1, 2, 3). Pigs can be bred in closed herds, grow to about the right size for organ transplantation, and produce large litters. Moreover, they can be genetically manipulated by the introduction of new genes.

Xenotransplantation across wide phylogenetic groups, however, raises questions of physiological compatibility. Pig insulin functions in humans, so pancreatic islet cell xenotransplantation for insulin dependent diabetes mellitus has already undergone a phase I trial (6). Pig fetal neurones secreting dopamine have been used to treat patients with Parkinson's disease (7) and similar xenotransplantation is proposed for Huntington's disease. Pig kidneys should function in humans diuretically; but pig erythropoietin does not bind to human erythropoietin receptors and therefore the recombinant human hormone would be required in kidney xenograft recipients. A pig heart may perform its pumping function, but a pig liver is unlikely to provide all the correct biochemical and metabolic functions of a human liver. Nevertheless, perfusion or dialysis across porcine hepatocytes is being proposed for clinical trial to treat acute liver failure (2). This may bridge a patient until a human liver allograft becomes available, or until the patient's own liver has regenerated.

Rejection remains a major hurdle to successful xenotransplantation (2, 3, 8). There are three main mechanisms of rejection. Hyperacute rejection of xenografted organs represents a complement-mediated destruction of the vascular endothelium of a discordant graft, such as one from a pig. It occurs within minutes of transplantation or perfusion, and is analogous to a human allograft



mismatched for the ABO blood groups. Like ABO, hyperacute rejection results from the recognition of carbohydrate antigens, especially a major porcine antigen, galactose- $\alpha$ (1-3)-galactose, known as  $\alpha$ Gal (9, 10). Most mammals including pigs place  $\alpha$ Gal as a terminal sugar on membrane glycolipids and glycoproteins, but old world primates including humans lack the gene encoding the  $\alpha$ (1-3) galactosyltransferase which catalyses this reaction. Because gut bacteria express  $\alpha$ Gal, humans make  $\alpha$ Gal antibodies, just as Group O individuals make anti-A and anti-B antibodies. Some 5 % or more of IgM in the plasma is directed to  $\alpha$ Gal antigen (11). Acute vascular rejection, also rather confusingly known as delayed xenograft rejection, is also triggered by recognition of  $\alpha$ Gal antigens on the endothelial surface. Antibody deposition leads to inflammatory cytokine responses, adhesion of leukocytes and extravasation. Both hyperacute rejection and acute vascular rejection occur because humans are pre-immunised against  $\alpha$ Gal and other xenoantigens.

Delayed xenograft rejection is an acquired, cell-mediated rejection, just like cytotoxic T-cell rejection of mismatched or partially matched allografts. Delayed xenograft rejection may be abrogated by immunosuppressive drugs like Cyclosporin A, but it is not yet clear whether even stronger immunosuppressive regimes than in allografts will be needed. Chronic graft rejection might possibly have a viral or microbial component.

A promising solution to acute and hyperacute xenograft rejection is to breed transgenic pigs that express human complement modulating proteins on vascular surfaces. Pigs expressing CD55 (DAF), CD46 or CD59 have been bred. Using baboons or macaques as surrogate human recipients, pig hearts from CD55 transgenic pigs have survived up to 40 days rather than a few minutes (12). Cellular and small tissue grafts are much less sensitive to acute and hyperacute rejection than are organs requiring an intact vasculature. Less  $\alpha$ Gal antigen is expressed on pancreatic islet cells and brain cells, and these cells may survive by switching off  $\alpha$ Gal expression. This is another reason why cellular xenografts have undergone human clinical trials, while whole organ xenotransplantation remains premature.

## Infection Risks

Known pathogens of animals can readily be detected and should be eliminated from colonies of source animals. However, it is not possible to screen for agents that are not yet discovered, though general procedures such as Caesarean delivery and physical isolation

of founding animals will preclude the majority of microbes that are transmitted postnatally. There are a number of porcine viruses such as herpesviruses and rotaviruses as that ought to be excludable by appropriate screening and immunisation. Others, such as parvovirus and circovirus, might re-contaminate the herd because they are ubiquitous on food or footwear.

When a virus crosses from its natural reservoir species to a new host, it is not easy to predict whether it will become more or less pathogenic. Yaba monkey-pox virus, a relative of variola (smallpox) virus causes severe disease in both monkeys and man. On the other hand, cow-pox behaves in an attenuated manner in humans, which allowed the development of vaccination by Jenner 200 years ago. More troublesome could be the viruses that often show little pathogenic signs or symptoms in their natural animal host yet cause serious disease in humans. The hantaviruses of rodents, including the outbreak of Sin Nombre virus infection in Southwest USA (13) come to mind, as well as the haemorrhagic viruses causing Ebola, Marburg and Lassa fever. Herpesvirus B, related to human herpes simplex virus, causes nothing worse than cold sores in immunocompetent monkeys but causes lethal encephalitis in humans. Simian immunodeficiency viruses (SIV) appear to have low if any pathogenicity in their natural African primate hosts, but lead to fatal acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in Asian macaques and, sadly, after adaptation to become HIV in humans.

So when veterinarians give source animals such as pigs a "clean bill of health", we may still not know if they might be harbouring potential human pathogens. Moreover, new microbes are coming to light all the time. In pigs, for example, several viruses have been discovered within the last three years. These include a virus related to human hepatitis E virus which may also infect humans (14); a torovirus (15); paramyxoviruses in Australia (Menangle virus) (16) and the new epidemic in Malaysia (Nipah virus) (5), which is causing deaths in both pigs and people and has spread to abattoir workers in Singapore (17); and human-tropic pig endogenous retroviruses (18, 19).

### **Porcine Endogenous Retroviruses (PERV)**

The DNA replicative genome of retroviruses made by reverse transcriptase integrates into chromosomal DNA to form the provirus. During the evolution of vertebrate hosts, DNA proviruses have integrated into germ cells, the precursors of eggs and sperm. In consequence, such proviruses become host Mendelian genetic traits and gain vertical passage through host generations without

undergoing further viral replication. These genomes are called endogenous retroviruses to distinguish them from exogenous, infectious transmitted retroviruses. Most vertebrate species carry multiple copies of endogenous proviruses. For example, up to 0.1 % of human DNA may be of retroviral origin, though none are known to give rise to infectious virus (20). Most endogenous retroviruses belong to the betaretrovirus subfamily, resembling murine mammary tumour virus, and to the gammaretrovirus subfamily, related to murine leukemia viruses (MLV). Neither lentiviruses related to HIV nor deltaretroviruses related to human T-cell lymphotropic virus (HTLV) have been found as endogenous genomes.

Many endogenous retroviral genomes are defective, but some which have been endogenous in the germ-line for a relatively short evolutionary time can give rise to infectious, RNA containing particles. These potentially infectious endogenous retroviruses are frequently xenotropic, that is they grow better in cells of foreign host species. Thus they are poised to infect neighbouring foreign cells when living tissues are juxtaposed in xenotransplantation. This is exemplified by the frequent infection of human tumour tissue by xenotropic endogenous MLV strains after xenotransplantation into immunodeficient mice, known for over 20 years (21).

Like mice, pigs carry MLV-related porcine endogenous retroviruses (PERV). These viruses were originally detected as virions released from cell lines derived from porcine kidneys and from lymphoma (22, 23, 24). They are C-type, gammaretrovirus genomes with many copies in porcine DNA (18, 19, 25). Recently, further sets of endogenous retroviral genome have been detected in porcine DNA, representing both beta- and gamma-retroviral taxonomic groups (26). Since these new sequences appear to be defective, they probably pose little problem for xenotransplantation, but the C-type PERV particles released from porcine cells are infectious.

When we first examined the infectivity of PERV, we found that PERV released from the PK-15 kidney cell line replicated both in porcine cells (the ST-lowa testis cell line) and in human cells (293 kidney cells and some other human cell types) (18). In fact, PK-15 cells release a mixture of two PERV strains with distinct envelope sequences, designated PERV-A and PERV-B (19). The virus released by another porcine kidney cell line, MPK, was infectious for pig cells but not for human 293 cells (18). This PERV strain, designated PERV-C, has an envelope sequence of PERV-C similar to a PERV genome originally cloned from a pig lymphoma (27). PERV-A and PERV-B have virtually indistinguishable protease and reverse

transcriptase sequences, but diverge in the outer envelope glycoprotein (19).

PERV-A and B are "amphotropic" in being able to infect both pig cells and foreign cells, whereas PERV-C behaves as an "ecotropic" virus replicating only in porcine cells. More extensive studies using MLV vectors with a reporter gene and PERV envelopes indicated that many human cells but few simian cells are permissive for PERV-A and PERV-B entry (28). Not all human cells are fully permissive for PERV replication, yet they may take up and integrate the PERV provirus (18). Even in human cell lines such as 293 and HeLa which are among the most permissive for PERV replication, the levels of infectious PERV released are low compared to other human-tropic C-type viruses such as MLV (28).

Receptor blocking studies show that PERV-A, -B and -C each utilise a different cell surface receptor on porcine and human cells, which are also distinct from the receptors for MLV, cat, baboon and gibbon retroviruses (28). Primary, short-term cultures of porcine cells spontaneously release PERV infectious for human cells. This has been reported for porcine lymphocytes (29) and endothelial cells (30). It is therefore likely that some porcine cells or tissues xenotransplanted *in vivo* will also release PERV.

Southern blotting indicates that most strains of domestic pig carry multiple copies of PERV proviral genomes, dispersed among pig chromosomes, with approximately 30 copies of PERV-A and 15 copies of PERV-B (19). Many of these might be defective and incapable of giving rise to infectious virus. The endogenous proviruses will need to be mapped, cloned and sequenced to determine which of them are potentially infectious. Thus it will not be simple to develop PERV-negative herds of pig, either by conventional breeding or by knock-out technology.

### **Monitoring Clinical Infection by PERV**

The demonstration that some strains of PERV can infect human cells in culture has led the FDA in USA and the UK Xenotransplantation Interim Regulatory Authority to draw up stringent guidelines for the conduct of xenotransplantation trials and the subsequent monitoring of PERV infection. In USA, some experts have called for a moratorium on all clinical xenoperfusion and xenotransplantation (31, 32), whereas in Japan the decision may be left to local ethical research committees.

Before proceeding with clinical trials of porcine tissue, it seemed useful to investigate by retrospective surveillance whether humans already exposed to pig cells and tissues have become infected by PERV. This has been examined in four studies: in ten diabetes patients xenografted with porcine pancreatic islet cells (33); in two renal dialysis patients whose extracorporeal circulation was perfused through porcine kidneys (34); in 24 neurological patients who were implanted with fetal pig neurones (35); and in 150 further patients exposed in various ways to living porcine tissue (36). In all these cases, no evidence was found of PERV infection.

These attempts to detect PERV infection used several approaches, reverse transcriptase activity, PCR and RT-PCR detection of PERV genomes, and serological tests for PERV-specific antibodies in recipients (37). The PCR-based assays in particular are highly sensitive, being based on primers and sequences specific to PERV which do not cross-react with human endogenous retrovirus sequences. However, a careful distinction must be made between PERV infection and microchimerism of surviving porcine cells in the human body. Among the patients studied in the Novartis/CDC survey (36) were 100 Russian individuals who had been subjected to "immunotherapy" by extracorporeal blood perfusion through pig spleens. Nearly 25 % of these patients showed evidence of porcine cell microchimerism following the perfusion, some of them several years after a single, 1-hour exposure. The microchimerism was initially identified by PCR detection of PERV sequences. Because mitochondrial or centromeric porcine DNA sequences were also detected, it was assumed that the PERV detection resulted from the survival of porcine cells rather than infection of human cells by PERV.

Thus the surveys conducted to date indicate that PERV is not highly contagious to humans, and that very few xenotransplant recipients are likely to become infected. These findings are consistent with the low titre of PERV replication in porcine or human cells in culture (18, 28, 29). Nonetheless, it will be important to monitor whether PERV can adapt to grow to high titres, or might recombine with other retroviral genomes to yield a more human-tropic retrovirus.

Animal retroviruses do infect humans, as found for primate foamy viruses, though they have not spread beyond the index persons (38). In addition, murine retroviral vectors are used clinically for gene therapy. However, replication competent recombinant MLV vectors can be pathogenic (39). The primate origins of HIV-1

and HIV-2 (4), and of some strains of HTLV-I (40) further show the potential danger of retroviral zoonoses.

## **Transgenic Pigs and Human Infection**

A problem not often raised by transplant surgeons and immunologists is that the genetic modification of pigs designed to prevent hyperacute rejection might permit porcine viruses to become pre-adapted for human infection. The human complement-modulating genes bred into transgenic pigs could have a direct impact on viruses (41): CD55/DAF acts as a receptor for human picornaviruses such as Echo and Coxsackie B myocarditis viruses, and CD46 acts a receptor for measles virus. Therefore these viruses could infect the transplanted porcine tissue. Moreover, related viruses of pigs might adapt to utilise the human receptor homologues in transgenic pigs.

Human complement acts on enveloped viruses budding from animal cells in the same way as in hyperacute rejection. Antibodies to  $\alpha$ Gal and other carbohydrate xenoantigens bind to virus envelopes bearing these sugar antigens and this leads to complement inactivation, a sort of hyperacute lysis of virus particles (9, 10). For example, PERV released by wild-type porcine cells expressing  $\alpha$ Gal is rapidly inactivated by fresh human serum, whereas the same virus after one passage through  $\alpha$ Gal-negative human 293 cells is completely resistant (18). If the virus particles budding from transgenic porcine cells also incorporated human CD46, CD55 or CD59 into their envelopes, complement-mediated lysis may be abrogated. Thus the genetic modification of pigs designed to make organ xenotransplantation possible could also result in "humanising" porcine viruses (41).

## **Conclusions and Prospects**

Cellular therapies using animal sources has already arrived in clinical trials. Tissue and organ xenotransplantation needs more research but is an area of active development. Therefore the risks of infection in xenotransplantation need to be balanced with the substantial benefit that is likely to accrue when the physiological and immunological problems are resolved. Individual benefit should be weighed against potential longer term community risk.

Overall, the factors concerning viral zoonosis in xenotransplantation are complex, and the risks are extremely difficult to quantify.

The worst case scenario would be a major new viral pandemic like HIV/AIDS. A more realistic scenario is that, perhaps, one in one thousand xenograft recipients may pick up a porcine retrovirus, and if detected, that infection may be treatable by anti-retroviral therapy and would not spread to the patient's contacts. Clearly, more research is required both on retroviruses and on other infections in relation to xenotransplantation, and ethical issues need to be related to scientific data.

## Acknowledgement

Our research into porcine retroviruses is supported by the Medical Research Council.

## References

1. **Allan, J. S. (1996):** «Xenotransplantation at a crossroads: Prevention versus progress», *Nature Med.*, 2: 18-21.
2. **Fishman, J.; Sachs, D. & Shaikh, R. (eds.) (1998):** «Xenotransplantation: Scientific Frontiers and Public Policy», *Ann. NY Acad. Sci.*, 862: 1-251.
3. **Weiss, R. A. (1998):** «Science, medicine, and the future-Xenotransplantation», *Br. Med. J.*, 317: 931-937.
4. **Weiss, R. A. & Wrangham, R. W. (1999):** «The origin of HIV-1: From *Pan* to pandemic», *Nature*, 397: 385-386.
5. **Enserink, M. (1999):** «New virus fingered in Malaysian epidemic», *Science*, 284: 407-410.
6. **Groth, C. G.; Korsgren, O.; Tibell, A. et al. (1994):** «Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients», *Lancet*, 344: 1402-1404.
7. **Deacon, T.; Schumacher, J.; Dinsmore, J. et al. (1997):** «Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease», *Nat. Med.*, 3: 350-3.
8. **Auchincloss, H. Jr. & Sachs, D. H. (1998):** «Xenogeneic transplantation», *Annu. Rev. Immunol.*, 16: 433-470.

9. **Takeuchi, Y.; Porter, C. D.; Strahan, K. M. et al. (1996):** «Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (alpha 1-3) galactosyltransferase», *Nature*, 379: 85-88.
10. **Rother, R. P. & Squinto, S. P. (1996):** «The alpha-galactosyl epitope: a sugar coating that makes viruses and cells unpalatable», *Cell*, 86: 185-188.
11. **McMorrow, I. M.; Comrack, C. A.; Sachs, D. H. & DerSimonian, H. (1997):** «Heterogeneity of human anti-pig natural antibodies cross-reactive with the Gal(alpha,3) Galactose epitope», *Transplantation*, 64: 501-510.
12. **Bhatti, F. N.; Schmoeckel, M.; Zaidi, A. et al. (1999):** «Three-month survival of HDAF transgenic pig hearts transplanted into primates», *Transplant Proc.*, 31: 958.
13. **Nichol, S. T.; Spiropoulou, C. F.; Morzunov, S., et al. (1993):** «Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness», *Science*, 262: 914-917.
14. **Meng, X. J.; Halbur, P. G.; Shapiro, M. S. et al. (1998):** «Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus», *J. Virol.*, 72: 9714-9721.
15. **Kroneman, A.; Cornelissen, L. A.; Horzinek, M. C.; de Groot & Egberinck, H. F. (1998):** «Identification and characterisation of a porcine torovirus», *J. Virol.*, 72: 3507-3511.
16. **Philbey, A. W.; Kirkland, P. D.; Ross, A. D. et al. (1998):** «An apparently new virus (family *Paramyxoviridae*) infectious for pigs, humans, and fruit bats», *Emerg. Infect. Dis.*, 4: 269-271.
17. **Paton, N. I.; Yee, S. L.; Zaki, S. R. et al. (1999):** «Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore», *Lancet*, 354: 1253-1256.
18. **Patience, C.; Takeuchi, Y. & Weiss, R. A. (1997):** «Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs», *Nature Medicine*, 3: 282-286.



19. **Le Tissier, P.; Stoye, J. P.; Takeuchi, Y.; Patience, C. & Weiss, R. A. (1997):** «Two sets of human-tropic pig retrovirus», *Nature*, 389: 681-682.
20. **Patience, C.; Wilkinson, D. A. & Weiss, R. A. (1997):** «Our retroviral heritage», *Trends Genet*, 13: 116-120.
21. **Achong, B. G.; Trumper, P. A. & Giovanella, B. C. (1976):** «C-type virus particles in human tumours transplanted into nude mice», *Brit. J. Cancer*, 34: 203-206.
22. **Armstrong, J. A.; Porterfield, J. S. & De Madrid, A. T. (1971):** «C-type virus particles in pig kidney cell lines», *J. Gen. Virol.*, 10: 195-198.
23. **Moennig, V.; Frank, H.; Hunsmann, G.; Ohms, P.; Schwarz, H. & Schafer, W. (1974):** «C-type particles produced by a permanent cell line from a leukemic pig. II. Physical, chemical, and serological characterization of the particles», *Virology*, 57: 179-188.
24. **Todaro, G. J.; Benveniste, R. E.; Lieber, M. M. & Sherr, C. J. (1974):** «Characterization of a type C virus released from the porcine cell line PK(15)», *Virology*, 58: 65-74.
25. **Benveniste, R. E. & Todaro, G. J. (1975):** «Evolution of type C viral genes: preservation of ancestral murine type C viral sequences in pig cellular DNA», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 4090-4094.
26. **Patience, C.; Takeuchi, Y.; Switzer, W.; Heneine, W.; Folks, T. & Weiss, R. A. (1999):** «Multiple types of endogenous retroviral genome in the DNA of swine and other species of Suiformes». *In preparation*.
27. **Akiyoshi, D. E.; Denaro, M.; Zhu, H.; Greenstein, J. L.; Banerjee, P. & Fishman, J. A. (1998):** «Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine», *J. Virol.*, 72: 4503-4507.
28. **Takeuchi, Y.; Patience, C.; Magre, S. et al. (1998):** «Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus», *J. Virol.*, 72: 9986-9991.

29. **Wilson, C. A.; Wong, S.; Muller, J.; Davidson, C. E.; Rose, T. M. & Burd, P. (1998):** «Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells», *J. Virol.*, 72: 3082-3087.
30. **Martin, U.; Kiessig, V.; Blusch, J. H. et al. (1998):** «Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells», *Lancet*, 352: 692-694.
31. **Bach, F. H.; Fishman, J. A.; Daniels, N. et al. (1998):** «Uncertainty in xenotransplantation: Individual benefit versus collective risk», *Nature Med.*, 4: 141-144.
32. **Butler, D. (1998):** «Last chance to stop and think on risks of xenotransplants», *Nature*, 391: 320-325.
33. **Heneine, W.; Tibell, A.; Switzer, W. M. et al. (1998):** «No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts», *Lancet*, 352: 695-699.
34. **Patience, C.; Patton, G. S.; Takeuchi, Y. et al. (1998):** «No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys», *Lancet*, 352: 699-701.
35. **Dinsmore, J. (1999):** *Presented at the Food and Drug Administration Advisory Panel on Xenotransplantation*, Washington DC., June.
36. **Paradis, K.; Langford, G.; Long, Z. et al. (1999):** «Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue», *Science*, 285: 1236-1241.
37. **Weiss, R. (1999):** «Xenografts and retroviruses», *Science*, 285: 1221-1222.
38. **Heneine, W.; Switzer, W. M.; Sandstrom, P. et al. (1998):** «Identification of a human population infected with simian foamy viruses», *Nat. Med.*, 4: 403-407.
39. **Donahue, R. E.; Kessler, S. W.; Bodine, D. et al. (1992):** «Helper virus induced T cell lymphoma in nonhu-

man primates after retroviral mediated gene transfer», *J. Exp. Med.*, 176: 1125-1135.

40. **Gessain, A. & Maheux, R. (1999):** «Genetic diversity and molecular epidemiology of HTLV and related simian retroviruses», in Dagleish, A. G. & Weiss, R. A. (eds.): *HIV and the New Viruses*. 2nd ed. London: Academic Press, pp. 281-327.
41. **Weiss, R. A. (1998):** «Transgenic pigs and virus adaptation», *Nature*, 391: 327-328.



# PROGRESS IN XENOTRANSPLANTATION \*

*Jeffrey L. Platt* †

Transplantation Biology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA

---

\* Adapted from *Graft*, 1: 19-24, 1998 (1).



## **Summary**

The transplantation of organs and tissues from animals into humans, that is xenotransplantation, has been a long sought objective to allow xenotransplantation to achieve its full impact in the clinical practice of medicine. The main hurdles to the application of xenotransplantation are the immunological reaction of the recipient against the transplant, the functional limitations of tissues and organs in biogenetically disparate recipients and the possibility of transferring infectious organisms from the graft into the recipient. Advances in a variety of fields have shed new light on these hurdles and have given rise to potential solutions and prospects for the clinical application of xenotransplantation, as is summarized in the essay that follows.

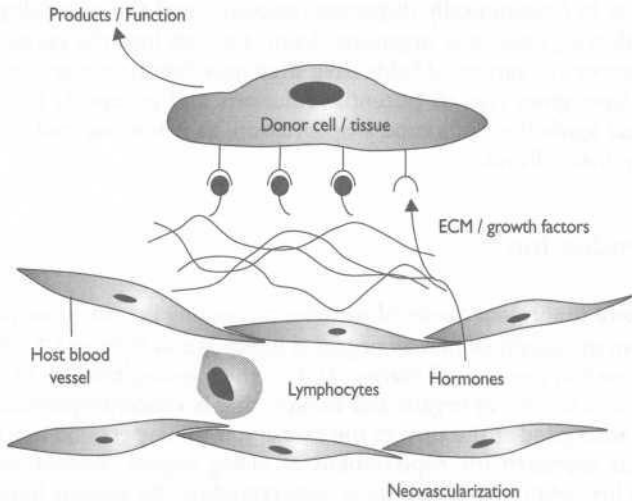
## **Introduction**

Despite the urgent needs of patients on waiting lists for transplantation, the supply of human organs is limited to as little as 5-15 % of the need in the United States (2). For this reason, the use of animals as a source of organs and tissues, that is xenotransplantation, first attempted at the turn of the century, is gaining ground as a potential approach for replacement of failing organs. Recent years have brought much progress in understanding the various hurdles to the clinical application of xenotransplantation and the development of novel strategies for dealing with these hurdles. What follows is a perspective on which hurdles to the clinical application of xenotransplantation might now seem preeminent and how the field might evolve over the next few years.

## Types of Xenografts

The biological properties of xenografts are determined, in part, by the way in which blood vessels in the graft are connected with the circulation of the recipient and by the origin of the microenvironment surrounding donor cells (*Figure 1*). Organ grafts, such as kidney, heart, liver and lung, provide their own vasculature and microenvironment. Isolated cells, such as hepatocytes or bone marrow, derive their vascular supply and microenvironment entirely from the host. Free tissues, such as pancreatic islets or skin, derive their vascular supply and microenvironment in part from the host and, in part, from the anastomosis of donor and recipient blood vessels. To the extent that the vascular supply and microenvironment depend on the host, incompatibilities of growth factors and hormones across species may limit engraftment, graft function or graft survival. On the other hand, the establishment of recipient microvasculature may provide a barrier between the immune system of the recipient and the cells of the graft. This barrier may, in turn, limit the immunological reaction of the recipient against the graft. Consistent with this idea, recent studies have suggested that cellular xenografts can be carried out between disparate species using conventional immunosuppressive regimens (3).

**FIGURE 1**  
**Hurdles to Cell and Tissue Xenotransplantation**



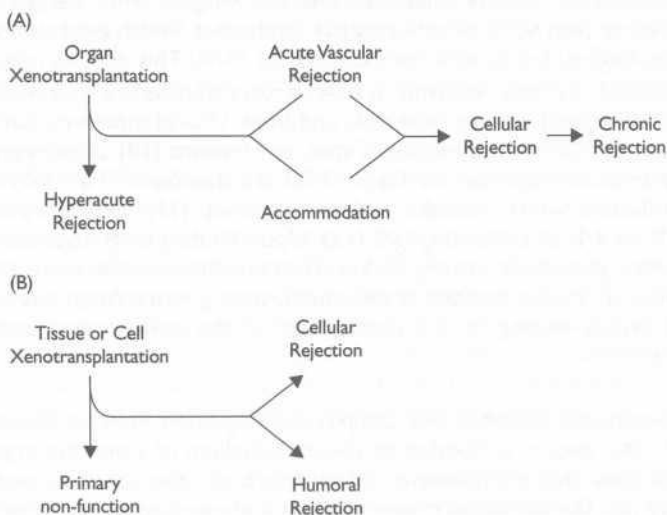
The outcome of cell and tissue xenografts is influenced by several factors not involved in determining the outcome of organ transplants. First, cell and tissue transplants must depend on host growth factors and hormones to support neovascularization and normal functions of the foreign cells. Second, the products of the foreign cell may induce pathophysiologic changes due to incompatibility (e.g., coagulation proteins) or failure of normal function (e.g., cytokines). Third, the recipient blood vessels may constitute a barrier that protects the grafted cells from injury caused by humoral or cellular immune responses of the recipient. Adapted from *Graft and LandesBioscience*, 1: 19-24, 1998 (1).



## Which Species should Serve as a source of Organs or Tissues?

While it might be intuitive that the best source of xenogeneic tissue for clinical use would be a species closely related to man, most investigators now focus on the pig as a potential donor. The reasons for using pigs number at least four. First, porcine organs are of an appropriate size for use in humans. Second, the supply of pigs, unlike the supply of primates, is unlimited. Third, pigs can be genetically engineered, whereas primates presently can not. Fourth, the risk of zoonotic infection from pigs is limited and more easily controlled. The hurdles to the use of pigs, however, are significant. First, the transplantation of pig organs or tissues into primates engenders severe rejection reactions as outlined in *Figure 2*. Second, there exist certain incompatibilities between the immune and coagulation systems of pigs and primates, which constitute substantive biological barriers to transplantation. Third, if the risk of zoonosis is limited, it is still very real, as underscored by recent

**FIGURE 2**  
**Biological Hurdles for Xenotransplantation**



(A) Organ transplantation between unmodified disparate species leads to hyperacute rejection. If hyperacute rejection can be averted by depletion of xenoreactive natural antibodies or inhibition of complement system, the xenograft may be subject to acute vascular rejection, or "accommodation" may occur. If acute vascular rejection is prevented, the graft will be subject to cellular rejection or chronic rejection.

(B) Tissue or cell xenotransplants are subject to failure caused by primary nonfunction which may reflect failure of engraftment or a very rapid immune response. If primary non-function is bypassed and the tissue or cells engraft, they are then subject to cellular or humoral rejection. Adapted from *Graft and LandesBioscience*, 1: 19-24, 1998 (1).

studies on an endogenous retrovirus of pigs (4, 5). Recent years have brought progress in understanding and, in some cases, overcoming these hurdles to pig-to-human transplantation. This communication will summarize that progress.

## **Immunological Hurdles to Xenotransplantation**

### **Hyperacute Rejection**

A pig organ, transplanted into an unmodified nonhuman primate or human, is subject to hyperacute rejection. Hyperacute rejection is characterized pathologically by interstitial hemorrhage and formation of platelet thrombi. The changes occur almost immediately upon perfusion of the organ by recipient blood, and they cause the very rapid loss of graft function. In pig-to-human transplantation, hyperacute rejection is initiated by the binding of human xeno-reactive IgM to the endothelium of the porcine organ (6). Antibody binding triggers activation of the complement system of the recipient, and it is the activation of complement on donor blood vessels that causes the dramatic manifestations of hyperacute rejection.

*Xenoreactive Natural Antibodies and the Antigens They Recognize.* Greater than 90 % of xenoreactive antibodies, which bind to porcine organs, are specific for Gal $\alpha$ 1-3Gal (7-9). This antigen is synthesized by the enzyme  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase ( $\alpha$ 1,3GT), which exists in lower mammals and New World monkeys, but is absent in Old World monkeys, apes, and humans (10). Xenoreactive antibodies specific for Gal $\alpha$ 1-3Gal are members of a family of antibodies which includes isohemagglutinins (11), and comprise 1 % to 4 % of circulating IgM (12). Upon binding to glycoproteins and/or glycolipids bearing Gal $\alpha$ 1-3Gal on the endothelial surface, these antibodies activate complement, setting into motion a series of events leading to the destruction of the newly transplanted organ.

*Complement Activation and Complement Regulatory Proteins.* Binding of xenoreactive antibodies to the endothelium of a porcine organ activates the complement system through the classical pathway (6). The activation of complement in the xenograft is an essential step in the pathogenesis of hyperacute rejection. Studies in rodents suggest that terminal complement complexes may be needed for the development of hyperacute rejection, as this process does not occur in recipients deficient in C6 (13). Although the membrane attack complex of complement is probably the most potent effector of hyperacute rejection, the susceptibility of CD59 transgenic organs, in which assembly of the membrane attack com-

plex is inhibited, to hyperacute rejection (14), and the finding that C5b67 complexes can disrupt endothelial integrity (15), suggest that the entire complement cascade may not be necessary to bring about hyperacute rejection and that C5b67 or C5b678 may be sufficient.

It is widely believed that nearly all porcine organ xenografts are subject to hyperacute rejection by primates. However, some reports suggest that the lung (16) and the liver (17) might resist antibody-mediated hyperacute rejection. Another recent report suggests that hyperacute rejection of porcine kidneys and hearts does not always occur in unmodified primates (18). In considering what now appears to be exceptions to the dogma of species susceptibility to hyperacute rejection, it will be important to assure that the exception does not simply reflect a low level of xenoreactive antibodies found in young animals and humans (19), or the use of treatments which inhibit complement or prevent endothelial damage.

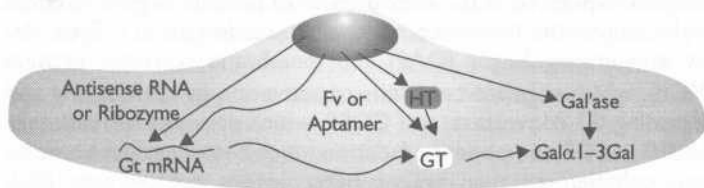
The susceptibility of porcine organs to complement-mediated damage is not entirely a function of the binding of xenoreactive natural antibodies. The very rapid activation of complement in xenografts reflects, in part, the failure of complement regulatory proteins expressed in the endothelium of porcine organs to effectively control the human complement cascade (20, 21). Thus, decay accelerating factor (DAF) and membrane co-factor protein (MCP), which regulate complement activation by dissociating and degrading C3 convertase, and CD59, which prevents formation of the C8 and C9 components, function much better against homologous complement than against heterologous complement (22). The failure of these complement regulatory proteins, to control activation of the complement system of the recipient, might make the xenograft more susceptible to hyperacute rejection (20). The importance of aberrant complement control was recently demonstrated by studies in which expression of low levels of human DAF and CD59, in transgenic pigs, was sufficient to prevent the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primates (23, 24).

*Prevention of Hyperacute Rejection.* Hyperacute rejection, once viewed as the most daunting hurdle to xenotransplantation, can now be circumvented by various therapeutic means. One specific approach to the prevention of hyperacute rejection is the inhibition of antibody binding to Gal $\alpha$ 1-3Gal. The first effort toward this end involved the infusion of soluble saccharides to block antibody binding (25). Unfortunately, this approach was not successful because the large amounts of sugar needed were toxic, and because the sugar used (Gal $\alpha$ 1-6Gal) would probably fail to block 30 % of the

xenoreactive antibodies (26). An alternative approach was to deplete anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies from the recipient. Sablinski (27) and Lin (28) used columns bearing Gal $\alpha$ 1-3Gal to immunodeplete xenoreactive natural antibodies from baboons, observing that this procedure alone, without depleting complement, would prevent hyperacute rejection.

Another approach for preventing the binding of xenoreactive natural antibodies involves the development of lines of pigs expressing low levels of Gal $\alpha$ 1-3Gal (29). Various approaches to decreasing expression of Gal1-3Gal have been considered (30). For example, one approach to decreasing antigen expression is to bring about expression of a glycosyltransferase which can compete with  $\alpha$ 1,3galactosyltransferase to catalyze the termination of saccharide chains. This second approach, as pursued by Sandrin (31) and Sharma (32), consists of expression of  $\alpha$ 1,2fucosyltransferase, which causes synthesis of H antigen, to which humans are tolerant, in transgenic animals (Figure 3).

**FIGURE 3**  
**Some Approaches to Decreasing Expression of  $\alpha$ 1-3Gal by Genetic Engineering**



Synthesis of Gal $\alpha$ 1-3Gal is catalyzed by a  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase (GT). The biosynthetic pathway is shown by the curved arrows. This enzyme adds galactose residues at the termini of oligosaccharide chains. Four approaches to preventing the synthesis of the sugar are shown by the straight arrows. First, the expression of antisense RNA or a ribozyme might disrupt the structure or function of the GT mRNA. Second, introduction of a gene for an inhibitory ligand for GT, such as an appropriate Fv (an antibody-like molecule) or an aptamer (a small oligonucleotide inhibitor) might inhibit the function of the enzyme. Third, overexpression of another glycosyl transferase, such as the H transferase, which adds fucose residues, might compete with  $\alpha$ 1,3GT. This has been achieved in pigs by the overexpression of a human H transferase, resulting in the addition of fucose rather than Gal $\alpha$ 1-3Gal to oligosaccharide side chains. Fourth, expression of a glycosidase, such as  $\alpha$ -galactosidase, might lead to cleavage of the antigenic saccharide chains. Adapted from *Nature*, 392 (Suppl.): 11-17, 1998 (30).

Another therapeutic approach to hyperacute rejection involves inhibition of complement. Infusion of complement inhibitors, such as cobra venom factor (CVF) (33), and soluble complement receptor type I (SCR I) (34) or IVIg (35) reliably prevents hyperacute rejection. Unfortunately, CVF and SCR I impair host defense by inhibiting complement early in the cascade. More enduring, inhibition of

complement mediated injury might be achieved through the use of organs from transgenic pigs expressing human complement regulatory proteins. This goal has now been achieved through the expression of human DAF and human CD59 in transgenic pigs (24, 36), as discussed above.

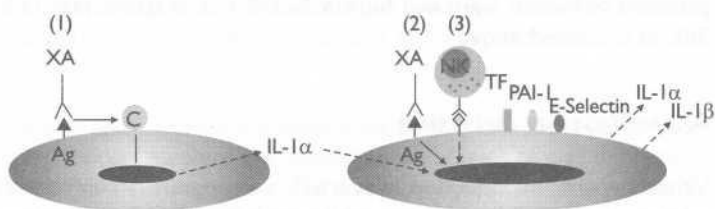
### Acute Vascular Rejection

When hyperacute rejection is averted, a xenograft is confronted with another rejection process, which we have called "acute vascular rejection" (37). Acute vascular rejection (sometimes referred to as "delayed xenograft rejection") may begin within 24 hours of reperfusion and leads to failure of the xenograft, within days to weeks, following transplantation. The pathologic features of acute vascular rejection of xenografts, like those of acute vascular rejection of allografts, include endothelial swelling, ischemia, and thrombosis. In light of recent success in preventing hyperacute rejection, acute vascular rejection looms as the next major hurdle to the enduring survival of xenografts.

*Role of Xenoreactive Antibodies in Acute Vascular Rejection.* There is accumulating evidence that acute vascular rejection is initiated by xenoreactive antibodies. First, acute vascular rejection of xenografts and allografts is commonly associated with antibody deposits on vascular endothelium (38). Second, the levels of xenoreactive antibodies in the blood increases following exposure to porcine tissues (39). Third, acute vascular rejection can be induced by infusion of antidonor antibodies (40). Fourth, depletion of antidonor antibodies, or inhibition of antibody synthesis, delays or averts acute vascular rejection (41).

*Activated Endothelial Cells in Acute Vascular Rejection.* The manifestations of acute vascular rejection are thought to be caused by activation of graft endothelium (37, 42). Activation of graft endothelium induces expression of prothrombotic and inflammatory molecules which might contribute to the diffuse thrombosis and inflammatory changes seen in these grafts (Figure 4). For example, acute vascular rejection is associated with expression of adhesion molecules, such as E-selectin, P-selectin, and inflammatory cytokines (42). We recently found that IL-1 $\alpha$ , an early product of the endothelial cell response to complement activation, acts as a paracrine factor, stimulating the expression of prothrombotic and proinflammatory genes in activated endothelium (43). While there is common agreement about the importance of endothelial cell activation in the pathogenesis of acute vascular rejection, there is only a little experimental evidence to confirm this idea.

**FIGURE 4**  
**Mechanism of Endothelial Cell Activation in Acute Vascular Rejection**



Endothelium might be activated in acute vascular rejection through one or more of three mechanisms. First, binding of xenoreactive antibodies may activate small amounts of complement (C), which causes transcriptional activation of IL-1 $\alpha$  which in turn activates endothelial cells (43). Second, antibody binding to endothelium might directly activate endothelial cells. Although there is limited evidence that xenoreactive antibodies activate endothelial cells directly, a recent study suggests that endothelial integrins are among the targets of these antibodies, and thus raises this possibility (63). Third, natural killer cells may directly trigger activation of endothelial cells (56). Regardless of how endothelial cells become activated, the activation process leads to expression of procoagulant molecules such as tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and proinflammatory molecules such as E-selectin, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Adapted from *Graft and LandesBioscience*, 1: 19-24, 1998 (1).

*Treatment of Acute Vascular Rejection.* Therapeutic strategies for preventing or treating acute vascular rejection have not been defined as clearly as for hyperacute rejection. To the extent that acute vascular rejection is a significant remaining hurdle, the development of therapeutic strategies will be vital to the successful application of xenotransplantation. Because the specificity of xenoreactive antibodies initiating acute vascular rejection remain to be determined, one current strategy aims at the depletion of anti-donor antibodies by column absorption (28). Prolonged depletion of these antibodies, and prevention of the synthesis of elicited antibodies, may well depend on the use of severe immunosuppressive regimens (36). A second strategy for preventing acute vascular rejection might involve the induction of immunological tolerance. To the extent that the major antigen in acute vascular rejection is Gal $\alpha$  1-3Gal, recent progress in inducing tolerance to that structure (44, 45) should be viewed as a significant step forward. A third strategy for preventing acute vascular rejection may involve the lowering of antigen expression in the xenograft, as discussed above. As a fourth approach, some have proposed genetic engineering of donors, to inhibit endothelial cell activation (46). Whether there will be a need to control the inflammatory and procoagulant end points associated with endothelial cell activation, in addition to controlling the inciting events, remains to be determined. A fifth, and perhaps most common, feasible "approach" involves induction of accommodation.

*Accommodation.* Accommodation refers to the apparent resistance of a graft to humoral rejection, despite presence of antidonor antibodies in the circulation of the recipient (20). Such resistance to injury was originally observed in ABO-incompatible transplants after antidonor antibodies were temporarily depleted from graft recipients. There is limited evidence that accommodation occurs in pig-to-primate xenografts (6). Accommodation may reflect a change in antibody repertoire, a change in antigen expression on the endothelium, or an acquired resistance by the endothelium to humoral immune injury. Recent studies in rodents have suggested that acquired resistance of endothelial cells may be especially important (47). Accommodation is a potentially important empirical approach to dealing with acute vascular rejection.

*Cellular Rejection.* The cellular immune response to a xenograft has been the subject of increasing attention in recent years. One important question has been the mechanism of T cell recognition of xenogeneic cells. The extent to which the direct versus the indirect pathways of T cell recognition might be utilized, in the cellular immune response to xenotransplantation, has been one topic of interest. The human anti-porcine T cell response is similar to the allogeneic response, in that human T cells can recognize porcine MHC class II antigens through the direct pathway (48, 49). On the other hand, potential defects in co-recognition by CD4 and CD8 and in co-stimulation (50), may distinguish the xeno-response from the allo-response. A more important difference between allogeneic and xenogeneic responses is that allogeneic responses are largely directed against MHC molecules, whereas xenogeneic responses might be directed at a wider set of protein antigens. In fact, given the diversity of foreign antigenic peptides in a xenograft, there is concern that antigen presentation by recipient antigen presenting cells, i.e., through the indirect pathway, will be especially potent. The mechanism by which T cells recognize xenogeneic cells is important for at least three reasons. First, as suggested above, the mechanism(s) may dictate the intensity of the immune response or the extent to which an elicited humoral response will ensue. Second, to the extent that the direct pathway predominates, genetic engineering of donors might be used to impair T cell activation. Third, the mechanism(s) of recognition may dictate the types of immunomodulatory therapies that can be directed at the recipient.

Given the potential strength of the T cell response to xenotransplantation and the potential importance of elicited antibodies, some have suggested that the success of xenotransplantation may depend on the generation of immunological tolerance (51). While there are a growing number of approaches to inducing tolerance

to allografts, there is a limited amount of information about inducing tolerance to xenografts. One approach may involve the generation of mixed chimerism, leading to deletion of "xenoreactive" cells (51). A related strategy may well involve the transplantation of donor thymus to allow the maturation of a mature T cell repertoire which will not be reactive with the donor (52). Another approach involves the manipulation of the mature T cell repertoire, through the generation of microchimerism or other means, so that xenoreactive cells are depleted or inhibited (53, 54).

Another aspect of cellular rejection is the potential importance of natural killer cells, the function of which might contribute to acute vascular rejection or cellular rejection (55). There is some evidence that natural killer cells accumulate in xenografts, recognize Gal $\alpha$ 1-3Gal, and may fail to be controlled by inhibitory receptors specific for MHC class I. Recent studies have revealed non-cytotoxic mechanisms, by which natural killer cells may injure xenogeneic endothelial cells - a change in morphology and endothelial cell activation (56). Yet to be determined, however, is the relative importance of natural killer cell mediated injury.

*Biological Incompatibility.* Biological incompatibility between the graft and the host may be an important hurdle to xenotransplantation. In addition to the incompatibility of complement regulatory proteins, there is compelling evidence that pig thrombomodulin may not recognize human thrombin and protein C leading a prothrombotic diathesis (57). Other incompatibilities may be important, especially in whole liver, free tissue and cellular xenografts, as discussed above.

## Zoonosis

There is concern about the possible transmission of "new" infectious agents from the graft into the recipient, especially if such agents might then be transmitted to the population as a whole. This issue was highlighted by the discovery that an endogenous porcine retrovirus might be able to infect human cells in culture (4, 5). Furthermore, a new porcine virus, related to human hepatitis virus E, was recently reported (58). However, it still remains to be proven whether or not these viruses, or other "new" agents, could actually infect humans and whether or not such infection could lead to transmission to other individuals or to disease. Thus far, no evidence has emerged that these agents can infect humans (59). Nevertheless, the subject of zoonosis will remain of importance, because genetic modifications of xenografts, that lower expression of Gal $\alpha$ 1-3Gal or increase resistance to complement, could allow viruses from the xenotransplant source animals to evade immune surveillance.



## Conclusion

The past few years have brought significant progress, in defining the hurdles to xenotransplantation, and in overcoming the immunologic and physiologic hurdles in this field. It is our view that the entry of xenotransplantation into the clinical area may be a step-by-step process. First, there will occur free tissue xenografts and extracorporeal use of xenogeneic organs. Limited clinical trials of this sort are in progress (60-62), and there is encouraging early evidence that porcine free tissue grafts may endure in a human recipient (62). Next, xenogeneic organs will probably be used as "bridge" or temporary transplants. Bridge transplants will not solve the problem of organ shortage, but the transplants will allow the gathering of vital information regarding the remaining immune and biological hurdles. Third, there will be the use of porcine organs as permanent replacements, but this use will probably be restricted to patients who can not receive a human organ allograft. Only through further refinements might there eventually be a fourth and final step, in which xenotransplantation is used as an alternative to allotransplantation.

## Acknowledgements

Supported by grants from the National Institutes of Health (HL52297 and HL46810).

## References cited

1. **Nagayasu, T. & Platt, J. L. (1998):** «Progress in xenotransplantation», *Graft*, 1: 19-24.
2. **Evans, R. W.; Orians, C. E. & Ascher, N. L. (1992):** «The potential supply of organ donors: an assessment of the efficiency of organ procurement efforts in the United States», *JAMA*, 267: 239-246.
3. **Gunsalus, J. R.; Brady, D. A.; Coulter, S. M.; Gray, B. M. & Edge, A. (1997):** «Reduction of serum cholesterol in watanabe rabbits by xenogeneic hepatocellular transplantation», *Nature Medicine*, 3: 48-53.
4. **Patience, C.; Takeuchi, Y. & Weiss, R. A. (1997):** «Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs», *Nature Medicine*, 3: 282-286.

5. **Martin, U.; Kiessig, V.; Blusch, J. H.; Haverich, A.; von der Helm, K.; Herden, T. et al. (1998):** «Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells», *Lancet*, 352: 692-694.
6. **Platt, J. L.; Fischel, R. J.; Matas, A. J.; Reif, S. A.; Bolman, R. M. & Bach, F. H. (1991):** «Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model», *Transplantation*, 52: 214-220.
7. **Good, A. H.; Cooper, D. K. C.; Malcolm, A. J.; Ippolito, R. M.; Koren, E.; Neethling, F. A. et al. (1992):** «Identification of carbohydrate structures that bind human anti-porcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans», *Transpl. Proc.*, 24: 559-562.
8. **Sandrin, M. S.; Vaughan, H. A.; Dabkowski, P. L. & McKenzie, I. F. C. (1993):** «Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal $\alpha$ (1,3)Gal epitopes», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 11391-11395.
9. **Collins, B. H.; Parker, W. & Platt, J. L. (1994):** «Characterization of porcine endothelial cell determinants recognized by human natural antibodies», *Xenotransplantation*, 1: 36-46.
10. **Galili, U.; Clark, M. R.; Shohet, S. B.; Buehler, J. & Macher, B. A. (1987):** «Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal  $\alpha$ 1-3Gal epitope in primates», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 1369-1373.
11. **Parker, W.; Yu, P. B.; Holzknrecht, Z. E.; Lundberg-Swanson, K.; Buckley, R. H. & Platt, J. L. (1997):** «Specificity and function of "natural" antibodies in immunodeficient subjects: clues to B-cell lineage and development», *J. Clin. Immunol.*, 17: 311-321.
12. **Parker, W.; Bruno, D.; Holzknrecht, Z. E. & Platt, J. L. (1994):** «Xenoreactive natural antibodies: isolation and initial characterization», *J. Immunol.*, 153: 3791-3803.
13. **Brauer, R. B.; Baldwin, III W. M.; Daha, M. R.; Pruitt, S. K. & Sanfilippo, F. (1993):** «Use of C6-deficient rats to evaluate the mechanism of hyperacute rejection of discordant cardiac xenografts», *J. Immunol.*, 151: 7240-7248.

14. **Diamond, L. E.; McCurry, K. R.; Oldham, E. R.; McClellan, S. B.; Martin, M. J.; Platt, J. L. et al. (1996):** «Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium», *Transplantation*, 61: 1241-1249.
15. **Saadi, S. & Platt, J. L. (1995):** «Transient perturbation of endothelial integrity induced by antibodies and complement», *J. Exp. Med.*, 181: 21-31.
16. **Kaplon, R. J.; Platt, J. L.; Kwiatkowski, P. A.; Edwards, N. M.; Xu, H.; Shah, A. S. et al. (1995):** «Absence of hyperacute rejection in pig-to-primate orthotopic pulmonary xenografts», *Transplantation*, 59: 410-416.
17. **Calne, R. Y.; Davis, D. R.; Pena, J. R.; Balner, H.; De Vries, M.; Herbertson, B. M. et al. (1970):** «Hepatic allografts and xenografts in primates», *Lancet*, 1: 103-106.
18. **Zaidi, A.; Friend, P.; Schmoeckel, M.; Bhatti, F. N. K.; Tolan, M.; Waterworth, P. et al. (1997):** «Hyperacute rejection is not consistent after pig to primate renal xenotransplantation (abstract)». *4th International Congress for Xenotransplantation*, Nantes, France: World Transplantation Society, O53.
19. **Kaplon, R. J.; Michler, R. E.; Xu, H.; Kwiatkowski, P. A.; Edwards, N. M. & Platt, J. L. (1994):** «Absence of hyperacute rejection in newborn pig-to-baboon cardiac xenografts», *Transplantation*, 59: 1-6.
20. **Platt, J. L.; Vercellotti, G. M.; Dalmaso, A. P.; Matas, A. J.; Bolman, R. M.; Najarian, J. S. et al. (1990):** «Transplantation of discordant xenografts: a review of progress», *Immunol. Today*, 11: 450-456.
21. **Dalmaso, A. P.; Vercellotti, G. M.; Platt, J. L. & Bach, F. H. (1991):** «Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay accelerating factor: Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection», *Transplantation*, 52: 530-533.
22. **Atkinson, J. P.; Oglesby, T. J.; White, D.; Adams, E. A. & Liszewski, M. K. (1991):** «Separation of self from non-self in the complement system: a role for membrane co-factor protein and decay accelerating factor», *Clin. Exp. Immunol.*, 86 (Suppl. 1): 27-30.

23. **McCurry, K. R.; Kooyman, D. L.; Alvarado, C. G.; Cotterell, A. H.; Martin, M. J.; Logan, J. S. et al. (1995):** «Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury», *Nature Medicine*, 1: 423-427.
24. **Byrne, G. W.; McCurry, K. R.; Martin, M. J.; McClellan, S. M.; Platt, J. L. & Logan, J. S. (1997):** «Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage», *Transplantation*, 63: 149-155.
25. **Ye, Y.; Neethling, F. A.; Niekrasz, M.; Koren, E.; Richards, S. V.; Martin, M. et al. (1994):** «Evidence that intravenously administered  $\alpha$ -Galactosyl carbohydrates reduce baboon serum cytotoxicity to pig kidney cells (PK15) and transplanted pig hearts», *Transplantation*, 58: 330-337.
26. **Parker, W.; Lundberg-Swanson, K.; Holzknecht, Z. E.; Lateef, J.; Washburn, S. A.; Braedehoeft, S. J. et al. (1996):** «Isohemagglutinins and xenoreactive antibodies are members of a distinct family of natural antibodies», *Hum. Immunol.*, 45: 94-104.
27. **Sablinski, T.; Latinne, D.; Gianello, P.; Bailin, M.; Bergen, K.; Colvin, R. B. et al. (1995):** «Xenotransplantation of pig kidneys to nonhuman primates: I, development of the model», *Xenotransplantation*, 2: 264-270.
28. **Lin, S. S.; Kooyman, D. L.; Daniels, L. J.; Daggett, C. W.; Parker, W.; Lawson, J. H. et al. (1997):** «The role of natural anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies in hyperacute rejection of pig-to-baboon cardiac xenotransplants», *Transplant Immunology*, 5: 212-218.
29. **Geller, R. L.; Rubinstein, P. & Platt, J. L. (1994):** «Variation in expression of porcine xenogeneic antigens», *Transplantation*, 58: 272-277.
30. **Platt, J. L. (1998):** «New directions for organ transplantation», *Nature*, 392 (Suppl.): 11-17.
31. **Sandrin, M. S.; Fodor, W. L.; Mouhtouris, E.; Osman, N.; Cohnen, S.; Rollins, S. A. et al. (1995):** «Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogeneic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity», *Nature Medicine*, 1: 1261-1267.

32. **Sharma, A.; Okabe, J. F.; Birch, P.; Platt, J. L. & Logan, J. S. (1996):** «Reduction in the level of gal ( $\alpha$ 1,3) gal in transgenic mice and pigs by the expression of an  $\alpha$ (1,2) fucosyltransferase», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7190-7195.
33. **Leventhal, J. R.; Sakiyalak, P.; Witson, J.; Simone, P.; Matas, A. J.; Bolman, R. M. et al. (1994):** «The synergistic effect of combined antibody and complement depletion on discordant cardiac xenograft survival in nonhuman primates», *Transplantation*, 57: 974-978.
34. **Pruitt, S. K.; Kirk, A. D.; Bollinger, R. R.; Marsh, Jr H. C.; Collins, B. H.; Levin, J. L. et al. (1994):** «The effect of soluble complement receptor type I on hyperacute rejection of porcine xenografts», *Transplantation*, 57: 363-370.
35. **Magee, J. C.; Collins, B. H.; Harland, R. C.; Lindman, B. J.; Bollinger, R. R.; Frank, M. M. et al. (1995):** «Immunoglobulin prevents complement mediated hyperacute rejection in swine-to-primate xenotransplantation», *J. Clin. Invest.*, 96: 2404-2412.
36. **Cozzi, E.; Yannoutsos, N.; Langford, G. A.; Pino-Chavez, G.; Wallwork, J. & White, D. J. G. (1997):** «Effect of transgenic expression of human decay-accelerating factor on the inhibition of hyperacute rejection of pig organs», in Cooper, D. K. C.; Kemp, E.; Platt, J. L. & White, D. J. G. (eds.): *Xenotransplantation: the transplantation of organs and tissues between species*. 2nd ed. Berlin: Springer, 665-682.
37. **Leventhal, J. R.; Matas, A. J.; Sun, L. H.; Reif, S.; Bolman, R. M.; Dalmaso, A. P. et al. (1993):** «The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to-rat model», *Transplantation*, 56: 1-8.
38. **Porter, K. A. (1992):** «Renal Transplantation», in Heptinstall, R. H. (ed.): *Pathology of the Kidney*, Volume III. 4 ed., Boston, MA: Little, Brown, and Company, 1799-1933.
39. **Cotterell, A. H.; Collins, B. H.; Parker, W.; Harland, R. C. & Platt, J. L. (1995):** «The humoral immune response in humans following cross-perfusion of porcine organs», *Transplantation*, 60: 861-868.
40. **Perper, R. J. & Najarian, J. S. (1967):** «Experimental renal heterotransplantation. III. Passive transfer of transplantation immunity», *Transplantation*, 5: 514-533.

41. **Lin, S. S.; Weidner, B. C.; Byrne, G. W.; Diamond, L. E.; Lawson, J. H.; Hoopes, C. W. et al. (1998):** «The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants», *J. Clin. Invest.*, 101: 1745-1756.
42. **Blakely, M. L.; Van Der Werf, W. J.; Berndt, M. C.; Dalmaso, A. P.; Bach, F. H. & Hancock, W. W. (1994):** «Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection», *Transplantation*, 58: 1059-1066.
43. **Saadi, S.; Holzkecht, R. A.; Patte, C. P.; Stern, D. M. & Platt, J. L. (1995):** «Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium», *J. Exp. Med.*, 182: 1807-1814.
44. **Yang, Y.-G.; DeGoma, E.; Ohdan, H.; Bracy, J. L.; Xu, Y.; Iacomini, J. et al. (1998):** «Tolerization of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal natural antibody-forming B cells by induction of mixed chimerism», *J. Exp. Med.*, 187: 1335-1342.
45. **Bracy, J. L.; Sachs, D. H. & Iacomini, J. (1998):** «Inhibition of xenoreactive natural antibody production by retroviral gene therapy», *Science*, 281: 1845-1847.
46. **Bach, F. H.; Winkler, H.; Ferrán, C.; Hancock, W. W. & Robson, S. C. (1996):** «Delayed xenograft rejection», *Immunol. Today*, 17: 379-384.
47. **Bach, F. H.; Ferrán, C.; Hechenleitner, P.; Mark, W.; Koyamada, N.; Miyatake, T. et al. (1997):** «Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment», *Nature Medicine*, 3: 196-204.
48. **Yamada, K.; Sachs, D. H. & DerSimonian, H. (1995):** «Human anti-porcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition», *J. Immunol.*, 155: 5249-5256.
49. **Murray, A. G.; Khodadoust, M. M.; Pober, J. S. & Bothwell, A. L. M. (1994):** «Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: Direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28», *Immunity*, 1: 57-63.

50. **Moses, R. D.; Winn, H. J. & Auchincloss, Jr. H. (1992):** «Multiple defects in cell surface molecule interactions across species differences are responsible for diminished xenogeneic T cell responses», *Transplantation*, 53: 203-209.
51. **Sachs, D. H. & Sablinski, T. (1995):** «Tolerance across discordant xenogeneic barriers», *Xenotransplantation*, 2: 234-239.
52. **Zhao, Y.; Swenson, K.; Sergio, J. J.; Arn, J. S.; Sachs DH. & Sykes, M. (1996):** «Skin graft tolerance across a discordant xenogeneic barrier», *Nature Medicine*, 2: 1211-1216.
53. **Li, H.; Ricordi, C.; Demetris, A. J.; Kaufman, C. L.; Korbanic, C.; Hronakes, M. L. et al. (1994):** «Mixed xenogeneic chimerism (mouse + rat\* > mouse) to induce donor-specific tolerance to sequential or simultaneous islet xenografts», *Transplantation*, 57: 592-598.
54. **Starzl, T. E.; Demetris, A. J.; Murase, N.; Ildstad, S.; Ricordi, C. & Trucco, M. (1992):** «Cell migration, chimerism, and graft acceptance», *The Lancet*, 339: 1579-1582.
55. **Inverardi, L.; Samaja, M.; Motterlini, R.; Mangili, F.; Bender, J. R. & Pardi, R. (1992):** «Early recognition of a discordant xenogeneic organ by human circulating lymphocytes», *J. Immunol.*, 149: 1416-1423.
56. **Malyguine, A. M.; Saadi, S.; Holzkecht, R. A.; Patte, C. R.; Sud, N.; Platt, J. L. et al. (1997):** «Induction of procoagulant function in porcine endothelial cells by human NK cells», *J. Immunol.*, 159: 4659-4664.
57. **Lawson, J. H.; Daniels, L. & Platt, J. L. (1997):** «The evaluation of thrombomodulin activity in porcine to human xenotransplantation», *Transplant Proc.*, 29: 884-885.
58. **Meng, X. J.; Purcell, R. H.; Halbur, P. G.; Lehman, J. R.; Webb, D. M.; Tsareva, T. S. et al. (1997):** «A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 9860-9865.
59. **Heneine, W.; Tibell, A.; Switzer, W. M.; Sandstrom, P.; Rosales, G. V.; Mathews, A. et al. (1998):** «No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts», *Lancet*, 352: 695-699.

60. **Groth, C. G.; Korsgren, O.; Tibell, A.; Tollemar, J.; Moller, E.; Bolinder, J. et al. (1994):** «Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients», *Lancet*, 344: 1402-1404.
61. **Chari, R. S.; Collins, B. H.; Magee, J. C.; Kirk, A. D.; Harland, R. C.; McCann, R. L. et al. (1994):** «Treatment of hepatic failure with ex-vivo pig liver perfusion followed by liver transplantation», *New Eng. J. Med.*, 331: 234-237.
62. **Deacon, T.; Schumacher, J.; Dinsmore, J.; Thomas, C.; Palmer, P.; Kott, S. et al. (1997):** «Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease», *Nature Medicine*, 3: 350-353.
63. **Holzknicht, Z. E. & Platt, J. L. (1995):** «Identification of porcine endothelial cell membrane antigens recognized by human xenoreactive antibodies», *J. Immunol.*, 154: 4565-4575.



# PROBLEMAS ÉTICOS Y SOCIALES DE LOS TRASPLANTES

*Francisco Vilardell*

Hospital de la Santa Creu i San Pau, Barcelona



## Introducción

Desde la demostración en los años veinte de la viabilidad de los implantes viscerales (1), los trasplantes de órganos se han convertido en una parte importante de la terapéutica. En 1954 se realizó el primer trasplante renal con resultado favorable (2). El primer trasplante de corazón, que recibió amplia publicidad, tuvo lugar en 1967 (3). En el mismo año se hizo el primer trasplante hepático (4). El páncreas se trasplantó por vez primera en 1967 (5) y el doble trasplante de corazón y pulmón en 1969 (6). Tras varios intentos, el primer trasplante intestinal con resultado satisfactorio se realizó en 1987 (7). En fecha reciente se ha trasplantado una mano con su antebrazo, que sigue viable a los seis meses (8). La intolerancia, el rechazo y la falta de experiencia crearon muchos problemas hasta el advenimiento de la ciclosporina y otros inmunodepresores, que han conseguido modificar considerablemente el porvenir a medio y largo plazo de estos enfermos (9).

Por otra parte, el trasplante de córnea, casi centenario, ha ido progresando sin trabas debido a sus características peculiares ligadas a la baja antigenicidad del tejido corneal.

El trasplante renal constituye un procedimiento terapéutico rutinario con un claro costo-beneficio sobre la diálisis periódica. Tanto los trasplantes de corazón como los de hígado han aumentado su número en proporción geométrica y su costo/beneficio parece claro en por lo menos algunas afecciones y en pacientes debidamente seleccionados. Los trasplantes de médula ósea, huesos, fascia, piel, tímpano han alcanzado madurez, especialmente los de médula ósea.

Se han publicado numerosos estudios sobre los aspectos legales de los trasplantes y la gran mayoría de países han legislado al respecto (10). Sin embargo, además de los problemas técnicos legales y científicos relacionados con los trasplantes, se plantean numerosas preguntas respecto a la relevancia ética de estos procedimientos que sólo pueden contestarse de modo parcial e impreciso, aunque el consenso es cada vez mayor respecto a la permisibilidad moral e incluso la necesidad de practicarlos (11). Hay entidades religiosas y culturales que presentan reservas importantes acerca de algunos aspectos de los trasplantes, tales como la obtención de órganos o la definición de muerte (12).

## **Los trasplantes de órganos en la actualidad**

¿Qué podemos esperar hoy día de los trasplantes? Las estadísticas del mundo occidental son convincentes: en 1997 se ha publicado un análisis de la supervivencia de injertos y pacientes basado en 97.587 trasplantes de órganos sólidos realizados en los Estados Unidos entre enero 1988 y abril 1994, demostrando un progreso evidente sobre los resultados de años anteriores (13). Los resultados obtenidos en España son equiparables a los mejores del mundo, con cifras de donaciones no superadas por ningún otro país (14).

### **Riñón**

Los trasplantes renales siguen estando en primer término por su facilidad técnica y por el hecho de que el enfermo suele llegar a la intervención en buenas condiciones gracias a la diálisis. Los trasplantes se realizan en individuos de hasta setenta años de edad; un 40 % de pacientes que entra en programas de diálisis tiene más de cincuenta y cinco años (15). El número de trasplantes sería probablemente todavía mayor si no hubiera en algunos lugares incentivos económicos para mantener al paciente en diálisis (16). La supervivencia del injerto depende de la naturaleza del donante: en trasplantes de familiares con el mismo HLA la supervivencia es mayor del 90 %, a los dos años llega a ser del 83 %, aunque en muchos centros no pasa del 70 % (15).

En una serie de 62.572 trasplantes realizados en los EE.UU., la supervivencia del injerto a los tres años era del 86,2 % y la de los pacientes de 96,0 % (13). Los resultados fueron superiores en el caso de donantes vivos que con órganos de cadáveres (13). La edad del donante influye negativamente sobre la supervivencia del injer-

to (13). Los injertos múltiples (riñón y páncreas) tienen un pronóstico menos favorable (13).

En Cataluña se han practicado entre 1971 y 1996 4.373 trasplantes renales, de los cuales 4.004 de cadáver y 369 de donantes vivos (17). En toda España hay 4.467 pacientes renales en espera de trasplante y los que viven con un injerto funcionando superan los 10.700 (14).

## **Corazón**

La supervivencia global de los 12.627 pacientes sometidos a trasplante en EE.UU. (1988-1994) fue de 82,5 % al año y del 74,8 % a los tres años (13). El riesgo de fallo del injerto fue superior en las mujeres que en los varones. El retrasplante conlleva un riesgo de fallo del injerto que triplica al del trasplante inicial (13). Entre 1984 y 1996 se han realizado 283 trasplantes cardíacos en Cataluña (39 en 1996) (17). En España la tasa de trasplantes permanece estable desde hace tres años (278 en 1995) (14). Es de notar que en estos últimos años en un número importante de pacientes enviados para ser trasplantados se consigue solucionar el caso mediante intervenciones a veces difíciles (entre ellas, la resección ventricular), pero que pueden evitar el trasplante (19).

## **Hígado**

Los trasplantes de hígado han ido aumentando de forma espectacular (20,21). De 16.658 trasplantes analizados por un mismo grupo en Estados Unidos (13) la supervivencia al año fue de 79,0 % y de 71,4 % a los tres años. Afectaron negativamente la viabilidad del injerto el empleo de hígados reducidos de tamaño y la incompatibilidad de grupo AB0 entre donante y receptor. Como en otros trasplantes, la edad del donante influyó desfavorablemente sobre el resultado.

En toda España se han realizado más de 3.400 trasplantes hepáticos con una tasa de 18 por millón de habitantes, una de las más altas de Europa (14). En Cataluña, a fines de 1996 se habían realizado 1.225 trasplantes hepáticos, de los cuales 1.104 en adultos y 121 en niños (17).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos continuados para aumentar las donaciones, se estima que en el año 2000 se harán 5.319 trasplantes en los Estados Unidos, pero que la lista de espera aumenta-

rá a 24.801 pacientes. En aquel país, los fallecimientos en lista de espera han aumentado casi cinco veces entre 1988 y 1996 (21).

## **Páncreas**

En los EE.UU., de los 3.222 trasplantes realizados en el transcurso de seis años, la supervivencia al año fue del 91,1 % y de 84,1 % a los tres años, mientras que la del injerto fue de 73,5 y de 67,1 a los uno y tres años, respectivamente (13). En España se realizaron en 1995 24 trasplantes combinados de páncreas y riñón (14). Entre 1984 y 1996 se han registrado 153 trasplantes de páncreas (17) en Cataluña, la mayoría de los cuales son de trasplante combinado (22).

## **Pulmón**

Las estadísticas norteamericanas indican que en el mismo período de tiempo se realizaron 2.135 trasplantes de pulmón y 373 de corazón-pulmón. La supervivencia de los pacientes fue de 71,9 % al año y de 54,6 % a los tres años para el trasplante de pulmón y las cifras disminuyeron a 61,9 % al año y 50,3 a los tres años para corazón-pulmón (13). En 1995 se realizaron 45 en toda España, de los cuales la mayoría fueron bipulmonares (14). En Cataluña se han practicado 58 trasplantes desde 1990 (17).

## **Médula ósea**

En España los trasplantes de médula ósea comenzaron en 1981; en 1995 se realizaron 1.797 de ellos, de los cuales la gran mayoría fueron autólogos, un 16 % de donante emparentado y un 1,7 % de donante no emparentado (14). Desde 1988 hasta 1996 se han practicado en Cataluña 1.994 trasplantes de médula ósea en 13 centros autorizados (17).

## **Intestino**

Después de numerosos fracasos, el trasplante intestinal parece proporcionar finalmente mejores perspectivas (23). La serie más extensa de trasplantes intestinales es la de la Universidad de Pittsburgh, que consta de 115 intervenciones practicadas a 109 enfermos, con una supervivencia acumulada de 72 % al año y de 48 % a los cinco años, siendo los resultados mejores en los niños (24).

## **Perspectivas de futuro**

En los próximos años hay que esperar un aumento todavía mayor de la demanda de trasplantes. Los progresos quirúrgicos e inmunológicos harán que muchos análisis de costo/eficacia y de riesgo/beneficio favorezcan y amplíen las indicaciones de estas intervenciones. Las presiones por parte de enfermos, familiares y de la sociedad en general, exigiendo una ampliación de las indicaciones y menos restricciones en la práctica de los trasplantes serán cada vez mayores (16). Cada vez se trasplantan órganos de individuos más ancianos; en 1995 el 25 % de cadáveres donantes procedían de individuos con más de sesenta años de edad. (25). La falta de observancia de criterios establecidos para la selección tanto de donantes como de receptores ha sido responsable de la mayoría de muertes precoces después de la intervención (26).

## **Implantación de órganos artificiales**

La implantación de órganos artificiales ha sido objeto de numerosos estudios en estos últimos años. Para algunos enfermos con lesiones cardíacas terminales, que no pueden beneficiarse del trasplante por existir una o varias contraindicaciones, un corazón artificial podría ser una alternativa. En 1982 se implantó por vez primera un aparato de este tipo al Dr. Barney Clark, dando lugar a múltiples cuestiones éticas. Hubo muchos problemas con el consentimiento informado (11 páginas impresas). El posible riesgo/beneficio de estas implantaciones, cuyo desarrollo se espera con interés, está muy lejos de quedar establecido (27).

## **Selección de pacientes para trasplante**

No parece sea fácil establecer indicaciones específicas para los trasplantes, ya que éstas no son idénticas de un centro a otro (por ejemplo, el carcinoma hepatocelular constituye una indicación precisa en unos centros y no lo es en otros). No hay duda que las indicaciones varían según la experiencia de los equipos trasplantadores. Probablemente se pueda decir sin causar controversia que «el trasplante está indicado cuando las esperanzas de una calidad de vida aceptable son mínimas y el tratamiento en curso no va a aportar beneficio alguno». Esta definición que se ha utilizado para justificar una intervención negativa como la eutanasia; paradójicamente, creemos que es también aplicable a algo tan positivo como los trasplantes.

Cada candidato debe ser valorado individualmente en términos de beneficio y riesgo del procedimiento. Los criterios de aceptación deben ser lo más objetivos posible y deben ser sometidos a un examen cuidadoso para asegurar que el injerto tenga el máximo potencial para salvar la vida del receptor. El criterio de selección más usado es el de la probabilidad de éxito del trasplante. Ello implica una serie de condicionantes tanto médicos como psicológicos.

Los límites de la asistencia médica no siempre son precisos: si uno selecciona para trasplante un paciente en grave estado cuya esperanza de vida es mínima, es más fácil que la intervención fracase debido al mal estado del enfermo. Existe, por otra parte, el peligro que en algunas instituciones pequeñas, en países en donde existen cuotas mínimas que cumplir y resultados que presentar para conseguir la acreditación de centro trasplantador, se operen individuos con indicaciones cuestionables.

El período más peligroso en la vida del paciente estudiado para trasplante es precisamente el período preoperatorio; muchas muertes ocurren mientras el paciente está en lista de espera, a menudo más que en el posoperatorio (28). Además de las indicaciones puramente médicas, hay otros factores que juegan un papel en la selección de enfermos. La evolución de las listas de espera en España ha sido paulatinamente favorable y en los niños la lista se renueva por completo anualmente (14). Para el trasplante hepático, la lista de espera es de dos a tres meses y la mortalidad en la lista de espera no llega al 5 % (14). Cifras similares, aún más reducidas, se registran en el trasplante cardíaco y son inferiores a la de otros países (14). En Gran Bretaña en 1996 había 5.297 enfermos renales, 305 cardíacos y 157 hepáticos en lista de espera (29).

## **Criterios de selección**

*Edad:* La edad se considera cada vez menos como una contraindicación, ya que la supervivencia en personas ancianas no es distinta de la de grupos de individuos más jóvenes (30). Los programas de diálisis aceptan hoy día más personas de edad avanzada y el número de enfermos en lista de espera irá probablemente aumentando con el envejecimiento de la población. Por otra parte, las edades de los cadáveres donantes son cada vez mayores (más del 25 % de donantes de más de sesenta y cinco años en España en 1995) (25). A pesar de que muchos creen que no se pueda excluir a nadie por la fecha de nacimiento, en la mayoría de centros se pone un límite a la edad del receptor, del mismo modo que en ciertos países se ponen límites a la edad en los casos de diálisis (31).



*Falta de adaptación al entorno:* Tal es el caso de las enfermedades mentales, de una discapacidad física importante y de ciertos problemas psicológicos (32).

*Falta de apoyo a la persona:* Muchos consideran como factor muy importante la falta de apoyo al enfermo (familiar u otro) una vez de regreso a su domicilio; factor difícilmente valorable por el médico (33).

*Conducta social del paciente:* La limitación del número de posibles trasplantes en muchos lugares, debido a la carencia de órganos, obliga a analizar factores tales como el consumo de drogas o el alcoholismo, que se consideran a menudo contraindicaciones para el trasplante. Sin embargo, especialmente en lo que se refiere al alcoholismo, el éxito del trasplante hepático en estos enfermos no es inferior, sino incluso mejor, que el de los intervenidos por otros motivos (34).

El problema radica más bien en la dificultad que tienen muchos facultativos para indicar un trasplante a un enfermo afecto de una enfermedad provocada por él mismo, como es la cirrosis alcohólica. Por otra parte, aunque por lo menos a corto plazo la mayoría de enfermos que han pasado por un período de seis meses de abstinencia antes de la operación no suele reincidir en su adicción (35), en ciertos grupos de enfermos la recidiva alcohólica puede tener consecuencias extraordinariamente graves (36). Alguien ha llegado a decir que el gasto ocasionado por el paciente de cuya enfermedad es responsable debiera ser sufragado por él mismo (37).

Como caso extremo de permisividad citaremos el caso de una paciente alcohólica que intentó suicidarse con paracetamol y presentó hepatitis fulminante; se le trasplantó el hígado a pesar de que no cumplía con los criterios del centro, que incluían seis meses o más de abstinencia, la ausencia de trastornos psiquiátricos asociados y una estabilidad socio-económica y familiar satisfactoria. Se utilizó como argumento en favor del trasplante que no podía asegurarse que la paciente fuera realmente responsable de su tendencia auto-destructora (38). A pesar de este antecedente, muchos se oponen decididamente a incluir a estos pacientes en la lista de espera (39), mientras que otros adoptan una postura más ecléctica (40).

Las decisiones nunca son fáciles y es posible incluso que escondan otras motivaciones, como en el caso de la comedia *El Dilema del Doctor*, de Bernard Shaw (41), obra en la que la decisión del médico de prescribir la única dosis del fármaco salvador a un enfermo en lugar de otro, aparentemente influenciada sólo por criterios utilitarios, escondía otros motivos exclusivamente personales.

*Criterios basados en la persona:* Algunos pensadores utilitarios valoran otros factores, como la personalidad cívica del enfermo y su importancia para la sociedad o bien su papel en el seno de su propia familia. Una reunión de trabajo dentro de la XVIII conferencia de CIOMS (42) no logró ningún consenso respecto a estos criterios utilitarios, tanto por la dificultad de aceptar una cuantificación de valores como de poder predecir el posible éxito en el futuro del individuo en cuestión.

En la opinión de la mayoría de participantes, la situación económica del enfermo tampoco debería ser un factor excluyente. Sin embargo, la posibilidad de pago por un trasplante (enfermo no asegurado), situación excepcional en nuestro país, pero que se presenta en alguna ocasión (43), podría favorecer o condicionar la decisión de trasplantar por parte del médico. El grupo recomendó que la selección de pacientes en las listas de espera y la distribución de órganos se haga con criterios exclusivamente médicos, teniendo en cuenta la necesidad del trasplante y las probabilidades de éxito. La selección debiera hacerse según el tiempo de espera en la lista y no por otros criterios. Algunos moralistas consideran la lista de espera como un equivalente de la selección al azar o de una lotería (44, 45). A pesar de todo, existen dudas de que el facultativo seleccione siempre al paciente por criterios estrictamente médicos. Algunos creen que los juicios aparentemente clínicos están influenciados por juicios de valor social del enfermo que se presentan como decisiones «médicas» (42).

Un interesante estudio realizado en California comparando los criterios de selección propugnados por estudiantes de segundo año de distintas razas, comparados con los de los directores del programa de trasplantes, indica que hay diferencias en cuanto a la percepción del alcoholismo, el ser extranjero o el ser HIV positivo, historia de uso de drogas como contraindicaciones al trasplante (46), según la raza y la cultura del estudiante.

Es probable que muchas indicaciones sean determinadas inconscientemente por factores personales o por la disponibilidad de recursos (29). Esta selección «médica» puede ocurrir en cualquier momento del proceso, desde el momento en que el médico de asistencia primaria decide enviar al paciente al especialista para diálisis o trasplante a su ingreso en cuidados intensivos y su evaluación por internistas, cirujanos, psiquiatras, etc. ¿Estamos seguros de que todos estos profesionales juzgarán del mismo modo el riesgo de un premio Nobel de sesenta y cinco años, el de un delincuente juvenil drogadicto de dieciocho, el del escritor alcohólico, el de la viuda con muchos hijos que está en el paro o el del extranjero millonario que no puede ser trasplantado en su país?

## Donaciones a personas concretas

Especialmente en el grupo de los enfermos pediátricos ha habido ocasionalmente movilizaciones de los medios de comunicación y de organizaciones sociales y caritativas para conseguir un órgano para un niño determinado. Estas donaciones «específicas» indudablemente plantean problemas porque vulneran el principio general de equidad y justicia. ¿Por qué debe privilegiarse a un individuo dándole prioridad en la lista de espera, soslayando los reglamentos establecidos? (47).

## El problema de los enfermos forasteros

¿Hay que ofrecer las mismas oportunidades a los forasteros que a los residentes de un determinado país? En algunas instituciones un número importante de trasplantes se efectúa a individuos de otras nacionalidades a menudo con un importante beneficio económico para el centro. La Task Force on Organ Trasplantation (48) de los Estados Unidos recomendó que los inmigrantes no debían representar más del 10 % del número total de receptores de riñones trasplantados y que no se les debía ofrecer otros órganos a menos que no hubiera en vista ningún otro candidato a trasplante. Se han publicado directrices que confirman el trato preferencial a los nativos sobre los extranjeros, que se restringen a un 5 % del total (49). Los problemas éticos surgirán sin duda cuando se enfrenten los médicos y pacientes a situaciones de urgencia. Será difícil negar un trasplante a un forastero ¡porque la cuota para extranjeros está ya saturada!

## El consentimiento del receptor

La naturaleza del consentimiento varía mucho según el tipo de intervención: si se trata de una intervención de urgencia sin alternativa válida (por ejemplo, hepatitis fulminante) o una operación electiva para mejorar la calidad de vida. La información no sólo debe comprender una explicación de los riesgos y de las posibilidades de éxito, sino también de las esperanzas de supervivencia a largo plazo y de los beneficios potenciales en la calidad de vida. Como dice Jonsen, «el valor de los procedimientos de rescate derivan de la futura calidad de la vida que se ha salvado, no del hecho que se ha simplemente alejado la muerte» (50). El consentimiento es fácil de obtener en procedimientos plenamente establecidos como trasplantes de córnea y de riñón y posiblemente también en los de hígado y corazón, en los que la supervivencia, cuanto menos al año,

es satisfactoria (51). Pero los problemas se plantean cuando se van a usar técnicas novedosas cuya naturaleza experimental debe ser reconocida y discutida con franqueza. El paciente debiera siempre poder negar su consentimiento en cualquier fase del proceso del trasplante (52).

El consentimiento informado debe incluir una discusión de lo que se espera del paciente, concretamente del cumplimiento de lo que se le indica, tal como la abstención del alcohol o la adhesión a un régimen de vida estricto (53).

Éticamente hay que considerar también los derechos del receptor en el caso de trasplantes de partes de órganos, por ejemplo, de lóbulos hepáticos. Aunque los riesgos de complicación grave han disminuido mucho, siguen existiendo. La mayoría de injertos hepáticos parciales se han realizado en niños, pero también se ha trasplantado a adultos con hepatitis fulminante un lóbulo hepático izquierdo, a la espera de la regeneración del órgano enfermo. ¿Hay que obtener el consentimiento del receptor de un lóbulo hepático antes de proceder a la sección del órgano? (54).

## **El consentimiento en pediatría**

El consentimiento en el caso del enfermo pediátrico presenta muchos interrogantes. Sin duda, niños de cierta edad se dan cuenta de que están muy enfermos y tienen además que enfrentarse a las reacciones emocionales de sus familiares, que generalmente presionan a favor del trasplante. ¿Debe el niño dar su consentimiento al trasplante? Muchos creen que, en general, los niños por encima de siete años deben ser tomados en serio cuando expresan sus opiniones en favor o en contra del procedimiento.

Aunque la ley autoriza a los padres a dar el consentimiento por sus hijos ¡no siempre queda claro que actúan en el mejor interés del enfermo sin ser presa de actitudes emocionales posiblemente mal aconsejadas! La calidad de vida es tan importante como la misma supervivencia; una supervivencia corta acompañada de sufrimientos prolongados no parece ser una finalidad satisfactoria para un procedimiento médico. Sin embargo, muchos padres desean la supervivencia al precio que sea, aunque quizá, el hijo lo deseara sólo si se acompañase de una calidad de vida decente.

Así como el trasplante renal y el hepático pueden salvar vidas de niños con resultados muy aceptables, el trasplante cardíaco infantil tiene un valor riesgo/beneficio a largo plazo más dudoso (55).

Hay todavía demasiada poca información respecto a los riesgos a largo plazo de órganos únicos, tales como el hígado y el corazón, que incluyen procedimientos invasores como biopsias para controlar el rechazo, aparte de la limitación de movimientos y los problemas psicológicos que conlleva el aislamiento de los familiares. Otros riesgos incluyen el apoyo constante que requerirá el niño, la posibilidad de que desarrolle problemas de personalidad y de inestabilidad familiar si hay otros hijos, así como el gasto permanente directo e indirecto que ocasiona la enfermedad.

Está permitido dudar de que Ronnie de Silvers, un niño que falleció en medio de grandes sufrimientos mientras esperaba su cuarto trasplante hepático, quería realmente que se le continuase trasplantando, como decían sus familiares a los medios de comunicación (56).

### **Trasplantes sin consentimiento**

Se ha practicado en la India un trasplante de riñón sin consentimiento, de un donante vivo, ciego, con facultades mentales perturbadas, a un hermano con insuficiencia renal terminal (57), previos diversos asesoramientos legales favorables a la intervención. Por otra parte, también se ha realizado un trasplante cardíaco sin consentimiento del receptor a un paciente italiano afecto de insuficiencia cardíaca terminal, con resultado positivo (58).

### **Donantes vivos**

Las donaciones de órganos vivos se han utilizado ampliamente para trasplantes de órganos pares como el riñón o el pulmón y de tejidos renovables como la médula ósea. También se ha utilizado el lóbulo izquierdo hepático para trasplante en niños; en el Japón se han realizado cerca de 400 intervenciones de este tipo (59) y unas 40 en Francia (60). Está bien comprobado que los resultados de los trasplantes de gemelos idénticos y de parientes cercanos son superiores a los obtenidos con órganos de cadáveres. En los niños intervenidos en Japón, la supervivencia al año es del 90 %. Ciertamente esta técnica requiere una gran maestría en la práctica de hepatectomías.

En 1986, en los EE.UU., más de 30 % de todos los trasplantes de riñón se obtuvieron de donantes vivos (61). Se ha dicho que los resultados son mejores que en los de donaciones cadavéricas porque se evitan las complicaciones secundarias a la conservación del in-

jerto trasplantado (61). Las donaciones en vivo de segmentos hepáticos a niños están bien establecidas en trasplantes no urgentes, pero permanecen dudas acerca de la autenticidad del consentimiento del donante cuando se trata de situaciones de extrema urgencia, cual ocurre en las hepatitis fulminantes, en las que el dador debe ser sometido a un rápido examen físico y psicológico y puede sentirse forzado a hacer la donación (54).

Un paciente puede recibir un trasplante de un familiar cercano con una buena expectativa de funcionamiento del injerto, sin tener que esperar largos períodos de tiempo por un órgano cadavérico, posiblemente ahorrando el gasto mayor de la diálisis continua. ¿Qué familiar debe ser requerido para la donación? Una encuesta de 1987 indica que la mayoría de allegados cree que debe ser la madre la que se sacrifique (62). La legislación francesa requiere que el donante sea un pariente en línea directa (60).

¿Deben usarse órganos de individuos vivos no emparentados, aunque estén «emocionalmente» cercanos al paciente? Parece razonable usar órganos de esposos o incluso de amigos que demuestran extraordinario interés en el bienestar por el porvenir del enfermo, pero se han hecho las siguientes objeciones a estos planteamientos:

- 1) La extracción de un riñón, a pesar de que hay evidencia estadística de su escasa morbilidad, no es inocua (61); unos veinte donantes han fallecido de resultados de la nefrectomía (63). Las exploraciones necesarias previas a la extracción incluyen algunas de carácter invasor, como la angiografía, que siempre conlleva un riesgo.
- 2) Es posible que el donante potencial sea sometido a presiones para que acceda a la donación; en ocasiones se ha tratado de un verdadero chantaje moral acompañado incluso de acciones judiciales, como ha sucedido en casos de donaciones de médula ósea (64).
- 3) Es difícil proteger la identidad de los posibles donantes cuyos nombres se guardan en los ordenadores de los centros, en especial desde la difusión de Internet. Este problema quizá se pueda obviar creando registros nacionales de donantes que han dado su consentimiento (64). Para evitar una relación donante-receptor que pueda estar desvirtuada por una posible obligación moral del uno por el otro, la operación debería permanecer en el anonimato, pero ello parece muy difícil de conseguir (65).

- 4) El fallo del trasplante puede provocar situaciones personales muy conflictivas. No hay que olvidar que cada año, sólo en los Estados Unidos, cerca de 1.500 portadores de un trasplante renal vuelven a la diálisis por rechazo del trasplante (61); a medida que aumente el número de trasplantados también es de temer que lo haga el de rechaces.
- 5) El derecho que tiene el donante potencial de denegar el órgano para el trasplante puede no ser respetado por la familia o por los medios de comunicación.
- 6) Las donaciones en vivo abren la puerta a la comercialización.

### Comercialización de los trasplantes

¿Son las personas «propietarias» de sus órganos? En algunos países se publican en la prensa anuncios de ofertas de órganos para la venta (66). Algunos informes sobre la situación en la India son sobrecogedores para un occidental: en 1992 el receptor «compraba» un riñón por 56.000 rupias (unas 435.000 pesetas), de las cuales menos de la mitad terminaban en manos del donante y todo lo demás al intermediario (67).

En las Filipinas se han descrito casos de reclusos que están dispuestos a ceder órganos para conseguir una rebaja en sus penas, y algunos usureros japoneses permiten a sus deudores anular la deuda a condición de comprometerse a vender un riñón, en una moderna versión del Shylock shakespeariano (68). El comercialismo puede ocultarse incluso detrás de hechos tales como modificar la lista de espera, favoreciendo a algunos dispuestos a pagar cantidades considerables de dinero para conseguir la prioridad en la lista (68).

Por otra parte, los resultados de estos trasplantes de donantes no emparentados son generalmente inferiores a los esperados y es posible que algún donante esconda incluso una enfermedad que padece y que puede influir en el resultado final de la intervención (69).

Las objeciones a cualquier tipo de comercialización de los trasplantes son prácticamente unánimes en el mundo occidental, tanto en los Estados Unidos (70) como en los países representados en el Consejo de Europa (71), en los que se prohíbe la compra de órganos para ser trasplantados. En España está incluso castigada por el Código Penal (25).

El Consejo de la Sociedad de Trasplantes ha elaborado pautas muy restrictivas respecto a la selección, protección o utilización de donantes vivos (72). Entre ellas, que los donantes vivos no consanguíneos deben emplearse sólo excepcionalmente, que los motivos del donante deben ser altruistas y que no está permitido solicitar órganos de individuos no emparentados con ánimo de lucro y que en todo caso el donante no emparentado debe satisfacer los mismos criterios éticos, médicos y psiquiátricos que en el caso de donantes que lo son. No deben hacerse pagos por órganos, pero está permitido el reembolso de gastos, días perdidos de trabajo, etc., por culpa de la intervención.

Sin embargo, recientemente, un grupo de personalidades médicas plantea de nuevo el caso. Según ellos, ninguno de los argumentos contrarios a la venta de órganos, como por ejemplo la explotación del donante, la falta de consentimiento informado, el nivel del riesgo asumido por el vendedor, las dificultades para regular o controlar la venta de órganos, la injusticia para los pobres o la ausencia de altruismo, tiene una validez indiscutible (73, 74). Dickens, un conocido jurista (75), nota con cierta ironía que así como hospitales, médicos, cirujanos, la industria farmacéutica y los laboratorios de análisis, etc., se benefician económicamente con los trasplantes, ¡sólo el donante no puede beneficiarse! Sells (76) cree que una persona tiene derecho a utilizar su cuerpo como le parezca y que un mercado de órganos libre mejoraría la escasez de donaciones. Según Sells, la legislación actual deniega el principio de autonomía, es decir, la acción determinada por el donante de vender parte de sí mismo.

A estas ideas se oponen otras voces que opinan que las operaciones de trasplante, como cualquier otra, deben hacerse sólo por una indicación terapéutica y que ganar dinero con una intervención evidentemente no lo es. Otros expresan dudas de que un donante pagado esté dando un consentimiento realmente voluntario, ya que el pago de una suma elevada de dinero influye mucho en dicho consentimiento. Algunos temen también que el pago atente a la dignidad humana, dividiendo a la población en donantes pobres y receptores ricos y aumentando así las diferencias económicas entre unos y otros. La presión económica puede deteriorar los criterios de las indicaciones para trasplante (76). Incluso en un mercado regulado por el Estado, hay el riesgo de transmisión de enfermedades de donante a receptor (69, 77).



## Trasplante de órganos de individuos ejecutados

En China, y quizá en algún otro país, se utilizan para el trasplante órganos de individuos ejecutados. En 1989 se hicieron 1.000 trasplantes en China con este sistema (76). En los Estados Unidos, en donde existe también la pena de muerte, se ha planteado el uso de órganos obtenidos tras la ejecución, sin que se haya llegado a ninguna decisión. Las mayores objeciones a este tipo de trasplantes radican en la prohibición a los médicos de tomar parte, aunque sea indirectamente, en una ejecución y a la posible falta de consentimiento del donante forzado por las circunstancias (78). Por otra parte, uno puede imaginar los abusos que, para obtener órganos, podrían producirse en un Estado dictatorial en donde los derechos humanos no estén debidamente garantizados.

## Definición de muerte

No existe un criterio uniforme de muerte y se sigue debatiendo si la muerte es un «proceso» o un «acontecimiento» (79). La mayoría de definiciones de muerte incluyen no sólo los criterios clásicos de cese irreversible de la respiración y del latido cardíaco (lo cual tomado literalmente impediría el mantenimiento de órganos por ventilación asistida), pero también el criterio de «muerte cerebral», producto de las tecnologías actuales. Se suele definir la muerte cerebral como la «pérdida irreversible de las funciones cerebrales, incluyendo el tronco cerebral». Esta definición permite mantener el latido cardíaco y la ventilación pulmonar para conservar los órganos a trasplantar en las mejores condiciones posibles. La mayoría de directrices que definen la muerte cerebral aceptan estas dos alternativas (79, 80, 81). La definición de muerte cerebral sólo ha sido aceptada muy recientemente en Japón, país en donde se han desarrollado considerablemente las técnicas de donaciones de órganos vivos.

Existen todavía discusiones respecto a si muerte cerebral significa el fallo de todo el cerebro (82) como único criterio o, como otros parecen preferir, «la pérdida irreversible de conciencia y de conocimiento» (83). Evidentemente, el significado pronóstico de la muerte cerebral y el estado vegetativo son distintos. Estos criterios pueden servir para el análisis ético respecto a la obtención de órganos de fetos anencefálicos que fallecen inevitablemente. ¿Deben considerarse los anencefálicos como casos de muerte cerebral? (84). Este concepto de que el feto anencefálico nunca ha estado «vivo» a pesar del latido cardíaco es aceptado judicialmente en Alemania (85), equiparando el concepto de «cerebro ausente» al de «cerebro muerto», facilitando así la obtención temprana de órganos.

## **Obtención de órganos y consentimiento del donante**

En Estados Unidos se estima que no más del 15 % de órganos de las 20.000 personas que podrían ser donantes es aprovechado para trasplantes (86). Entre las causas están la falta de consentimiento de los familiares, los problemas técnicos de la intervención, las contraindicaciones que no parecían existir en el momento de la evaluación clínica y también la actitud ocasional de los miembros del equipo de cuidados intensivos involucrados en la atención del futuro donante durante el período anterior al trasplante. En España, un 25 % de familiares se oponen a la donación de corazones de sus fallecidos (87). Lo ideal es que el propio donante dé previamente su consentimiento, aunque ningún procedimiento ha resultado ser enteramente satisfactorio (86). Entre los métodos utilizados, tanto las cartillas de donante, los testamentos vitales, como las señales identificadoras en el permiso de conducir, han tenido un éxito relativo. No todas las culturas perciben la donación de órganos de la misma manera: por ejemplo, en general, los individuos de raza blanca parecen más dispuestos a dar órganos que los asiáticos y todavía más que los de raza negra (46).

En por lo menos 13 países, entre ellos España, existen legislaciones de «consentimiento presunto» (*contracting out*), según las cuales, a menos que el individuo no haya expresado previamente por escrito su deseo de no donar sus órganos, se presume que desea hacerlo (10). A pesar de ello, en España, el consentimiento familiar se recaba prácticamente en todos los casos. El consentimiento tácito parece haber aumentado las donaciones de órganos en algunos países, como Bélgica, en comparación a la situación anterior. Para aumentar el número de donaciones se ha propuesto en Gran Bretaña dar prioridad, a la hora de trasplantar, a aquellas personas que han manifestado su deseo previo de donar sus propios órganos; sin embargo, se ha objetado que esta propuesta puede vulnerar el principio de justicia (88).

Las dificultades para obtener el consentimiento de los familiares se originan también en las actitudes del personal hospitalario. Hay barreras que interfieren en la petición de donar órganos: 1) falta de familiaridad con el procedimiento, 2) impedimentos legales, 3) sentimientos personales hacia las donaciones de órganos, especialmente la inhibición del personal médico ante el dolor de los familiares, 4) sentimientos de culpabilidad al tener que mantener en condiciones vitales un paciente declarado muerto y consentir además la mutilación de una persona que hasta entonces había sido tratada con la más avanzada tecnología para que viviera, suprimiendo todo tratamiento una vez extraídos los órganos (89, 90). Los

problemas emocionales que padecen las enfermeras son tan importantes o más que los de los médicos (89, 91). No hay que olvidar tampoco que muchos familiares desean saber adónde ha ido a parar el órgano donado y cuál ha sido el resultado del trasplante (92).

Las creencias influyen sin duda en estas decisiones, ya que para muchos familiares la donación es entendida como la forma más alta de caridad. Pero, en otros casos, es posible que los sentimientos religiosos constituyan un inconveniente para la donación. Probablemente sea más eficaz que las peticiones de donación las haga una persona que no haya estado involucrada directamente en el tratamiento del futuro donante (93).

### **Extracción de órganos a corazón parado**

La carencia de órganos ha hecho que desde 1986 se haya desarrollado la extracción de órganos de individuos fallecidos por parada cardíaca sin utilizar los criterios de muerte cerebral (94). La Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias define la parada cardíaca irreversible como «la ausencia de actividad eléctrica efectiva tras al menos treinta minutos de resucitación cardiopulmonar (RCP) avanzada en ausencia de fármacos depresores del sistema nervioso central e hipotermia inducida. Debe presentar ausencia total de actividad circulatoria, respiración espontánea y todo tipo de respuesta cerebral y de reflejos tronco-encefálicos».

En una conferencia que tuvo lugar en Maastricht (95) se consensuó que deben pasar por lo menos diez minutos de ausencia de función cardiopulmonar antes de pronunciar como muerto el posible donante a corazón parado. La técnica de obtención de órganos incluye la práctica de una inyección intraarterial de sustancias conservantes, a menudo antes de que sea posible recabar el consentimiento de los familiares. La indicación más apropiada, aparte los trasplantes de córnea, tejidos, huesos y vasos que no requieren, según la legislación española, un diagnóstico de muerte cerebral, es el trasplante renal. La escasez de órganos ha hecho que esta técnica se vaya imponiendo en diversos centros, tales como la Universidad de Pittsburgh o el King's College de Londres. Algunos creen que incluso sería bueno abandonar el criterio de muerte cerebral y volver a los criterios antiguos (96). En todo caso, la posibilidad de la obtención de órganos después de la muerte no debiera influir en la decisión de dar a un individuo como muerto (97). El uso de donantes a corazón parado puede entrar en conflicto con el sistema de distribución de órganos, desviando donaciones de los receptores potenciales en la lista de espera. A pesar de que algunos cen-

tros estipulan que el órgano obtenido con este criterio debe entrar en la distribución general, es fácil que ello no ocurra en todos los casos (97). Por otra parte, siempre existe el peligro de que se facilite la muerte (sedantes, etc.) para conseguir órganos. Los hospitales con programas importantes de trasplantes tienen intereses económicos y académicos que se lesionan por la falta de órganos y ello puede inducir a presionar a los familiares para acelerar las donaciones y a no utilizar al máximo los recursos disponibles (98). Ello equivaldría a «acelerar una muerte para prolongar otra vida» (99). Si se utilizan los criterios más estrictos, es probable que un 20 % de órganos no pueda ser aprovechado por razones técnicas (100). Alrededor del 3 % del total de riñones trasplantados en España provienen de individuos fallecidos en los pocos hospitales en donde se practica este tipo de extracción. Es de esperar que la legislación reguladora pendiente permita generalizar la aplicación de estas técnicas.

### **Los trasplantes de órganos: ¿son éticos?**

Con este título publicamos hace unos años unas observaciones (101) sobre el costo/beneficio y el costo/eficacia de los trasplantes de órganos y la posible utilización de los recursos necesarios para los mismos para otras actividades más «rentables» para la sociedad. Las cosas han cambiado desde entonces gracias al progreso tecnológico. En 1993 se calculaba el costo medio de un trasplante hepático con un año de seguimiento ambulatorio en España, en más de 11 millones de pesetas. Dejamos al lector la tarea de calcular lo que han costado los 3.400 trasplantes de hígado que se han realizado en nuestro país. Es probable, sin embargo, que estos costes vayan disminuyendo con el tiempo en los centros de mayor experiencia donde se efectúan muchas intervenciones. Indudablemente algunos pensarán que este dinero estaría mejor gastado vacunando a la población contra la hepatitis B, una causa frecuente de cirrosis hepática y de hepatocarcinoma (el precio de un trasplante de hígado equivaldría al de vacunar contra la hepatitis B a 1.141 adultos susceptibles de adquirir la enfermedad), pero hay que tener en cuenta también lo que representa para el erario público el costo de un enfermo con cirrosis avanzada que requiere numerosas hospitalizaciones por infecciones, hemorragias, etc.

Un análisis objetivo de costo/beneficio requiere averiguar la supervivencia con y sin trasplante, los costes con y sin trasplante, el costo-efectividad del trasplante en sí y una evaluación de la necesidad del trasplante y de la oferta de órganos disponible (102). El análisis de los costes requiere distinguir entre los costes medios por paciente en cada etapa del proceso y el coste medio por trasplante.

La diferencia está en imputar a los trasplantes realizados los costes de los individuos no trasplantados (estudios de valoración realizados en pacientes no aceptados, permanencia en lista de espera de enfermos que fallecen antes de ser trasplantados, órganos extraídos y desechados) (102). En 1994 en España se desecharon el 14 % de hígados extraídos.

Una de las modalidades de evaluación de los beneficios de los trasplantes es el estudio de la supervivencia, pero no hay estudios aleatorizados que comparen seguimientos con y sin trasplante. En el trasplante hepático, la probabilidad de vivir a los tres años basándose en el seguimiento de 8.501 receptores era del 68 % (103). Usando un modelo pronóstico matemático se han calculado las probabilidades de supervivencia en la cirrosis biliar sin trasplante en menos del 20 % a los diez años, mientras que con trasplante las probabilidades serían de por lo menos 65 % (104). En dicha enfermedad el número de años de vida ganados gracias al trasplante sería de 6,3 años. Los datos en favor del trasplante parecen elocuentes.

Los AVAC (años de vida ajustados por calidad, QALY en la literatura anglosajona) constituyen una medida de los beneficios de la atención sanitaria que considera tanto el aumento de la esperanza de vida postrasplante como la calidad de la misma. El trasplante de riñón obtiene 11,7 AVAC (más de tres veces los de la hemodiálisis hospitalaria). En los trasplantes de hígado y de corazón el coste-efectividad es menor, de 7 AVAC (102).

Un análisis realizado en Holanda sobre calidad de vida antes y después del trasplante hepático calcula en 0,85 el índice de utilidad de los mismos, con un índice de Karnovsky al año que se aproxima a 90 (rango 0-100), cifras muy esperanzadoras (104.) En la cirrosis biliar primaria, una de las indicaciones más aceptadas de trasplante hepático, la supervivencia a los cinco años, rebasaba en varios años la esperanza de vida sin trasplante (104), siendo los beneficios mayores en los individuos con lesiones más avanzadas. En el trasplante hepático, la mejoría de calidad de vida es evidente a los tres meses y se mantiene más o menos a los cinco años a nivel de la población normal (104). Para el grupo en cuestión la ganancia era de 5,6 AVACs. El mismo grupo calcula una *ratio* de 76.500 DFI (más de 5.700.000 pesetas) por AVAC ganado. Parece probable que estos cálculos sean utilizados en el futuro para ayudar a decidir qué tipo de enfermo ganaría más AVACs y aprovecharía mejor los órganos trasplantados.

Estas cifras son bastante convincentes, pero se necesitan muchas más evaluaciones de este tipo en otras afecciones y en otras modalidades de trasplante. En los Estados Unidos, en el ambiente actual

de *managed care*, los trasplantes siguen siendo vistos por los administradores de las compañías de seguros como procedimientos caros y poco beneficiosos (105).

Algunos creen que la comercialización no haría más que encarecer los costos del trasplante (105).

En España hay pleno apoyo de las instituciones hacia los trasplantes. Los costos calculados de un trasplante renal durante su primer año (3,5-4 millones de pesetas) pueden igualar los costos de hemodiálisis de un año y descienden a medio millón en años sucesivos (87). Los 10.000 individuos que viven con un riñón trasplantado en 1995 ahorran al contribuyente unos 30.000 millones, que es el precio de su mantenimiento en diálisis (87). Según los datos más recientes, el tiempo de espera en España para un trasplante renal es de 2,8 años y existen 4.063 pacientes en la lista.

## **Retrasplantes**

Los retrasplantes ponen en evidencia el dilema de escoger entre dos maneras distintas de enfocar estos problemas: por un lado, distribuir los órganos según el lugar del enfermo en la lista de espera y por otro utilizar el criterio de la máxima eficacia. Los partidarios de no hacer retrasplantes insisten en los resultados peores del retrasplante en relación a la operación inicial y por otra parte alegan que retrasplantar deniega un órgano a otro paciente tan necesitado o más que el enfermo en cuestión, contribuyendo de paso a la penuria de órganos. Entra en conflicto el principio de justicia, según el cual todos deberían tener una oportunidad igual de recibir un trasplante, y el paciente operado ya la tuvo.

Sin embargo, no parece ético abandonar a su suerte un paciente en el que ha fallado el trasplante, porque el médico tiene con él un «contrato moral» (54). O se hace todo lo posible para salvar una vida de un paciente que se entrega a los cuidados del cirujano, sea cual sea el riesgo de que haya fallos, o bien se asegura que los órganos se utilicen de la manera más justa y eficaz posible. Restringir el acceso a retrasplante debe hacerse con muchas reservas. Algunos estudios indican que algunos pacientes trasplantados dos y hasta tres veces en centros de excelencia pueden tener un resultado tan favorable como otros enfermos trasplantados por primera vez (54). Los xenotrasplantes, si algún día llegan a término, podrían aportar soluciones a muchos de estos conflictos.

## Conclusiones

Esta rápida revisión permite solamente hacer un inventario de las distintas cuestiones que se plantean a los enfermos, a las instituciones, al equipo médico, a los familiares y a la sociedad cuando se programa un trasplante. Las respuestas pueden ser muchas, pero desgraciadamente no parece que existan principios que logren resolver los dilemas en todos los casos. Todos los principios básicos de la bioética, beneficencia, no-maleficencia, justicia y autonomía (106, 107) entran en juego en la mayoría de situaciones; los trasplantes constituyen un paradigma de la interrelación entre todos ellos. Por ejemplo, sigue sin haber unanimidad en la definición de muerte (108, 109). Las respuestas varían con las culturas y en los distintos países incluso de una misma cultura. Por ejemplo, en religiones como el Islam, ciertos teólogos creen que el trasplante atenta a la creencia en la resurrección. Quizá ello explicaría en parte el número elevado de individuos de esta religión que se trasplantan en países occidentales (110).

La mayoría de trasplantes tuvieron su origen en instituciones en las que había cirujanos ambiciosos y resueltos que comenzaron a intervenir enfermos por propia iniciativa, posiblemente sin el conocimiento de las autoridades sanitarias que luego no tuvieron más remedio que aceptar los trasplantes como hechos consumados que proporcionaban muchas ventajas: un ambiente político favorable, prestigio y probables beneficios económicos para la institución y para el equipo médico.

Es probable que nunca se consiga que la oferta de órganos humanos logre atender a la demanda creciente de trasplantes. Hay que advertir al público, a los dadores potenciales y a sus familias de las consecuencias nefastas de rehusar donar órganos, que para profesionales como Evans (105) puede constituir un crimen, una forma de homicidio. Todavía en muchos países las negativas familiares a la donación sobrepasan el 40 %, como en Francia (111) o en los Estados Unidos (112). En los EE.UU. la legislación se basa en el hecho de que la donación de un órgano viene a ser un regalo (al que no se está obligado); cambiar la mentalidad a que en lugar de algo que se regala, se trate de algo que se tiene derecho a «recoger», posiblemente contribuiría a que la gente acepte más ser donante o dar permiso para que lo sea el familiar (113). Este es el concepto del donante presunto que rige en España y otros países europeos y que ha tenido un éxito considerable.

Da la impresión de que dentro de pocos años todo podrá trasplantarse: hay cirujanos que hablan de trasplantar senos, penes e incluso úteros, de reconstruir mandíbulas y caras enteras, de trasplantar la lengua. Recientemente se han trasplantado rodillas en Alema-

nia y laringes en los EE.UU. (114). Pero no hay seguimientos adecuados en la mayoría de estos casos anecdóticos y no hay manera de averiguar cuántas personas podrían beneficiarse de los mismos si los resultados a largo plazo fuesen satisfactorios.

Quedan evidentemente muchas cuestiones por resolver: en vista de la difusión cada vez mayor de trasplantes de tejidos no esenciales para la vida, aparte de los que acabamos de citar, tales como nervios, músculos, huesos, etc., de los cuales poco se sabe porque no suelen estar incluidos en registros de ningún tipo, uno se pregunta si seguirá habiendo el mismo consenso que hay ahora por parte de enfermos y familiares para dar el consentimiento en vista a posibles donaciones.

Excepto en contadas excepciones, los receptores de trasplantes deben tomar fármacos inmunosupresores potentes para evitar el rechazo del trasplante, cuyos efectos secundarios, bien conocidos, incluyen el peligro de infecciones y de la aparición de neoplasias. ¿Quién debe decidir si el riesgo merece la pena? ¿Quién debe pagar por los trasplantes sobre todo en el caso de intervenciones no esenciales como las que hemos descrito?

Todos consideran justificado usar terapéuticas inmunosupresoras peligrosas en pacientes a los que se ha trasplantado un órgano como el corazón o el hígado, porque la alternativa es la muerte, pero para otros trasplantes cuyos beneficios son más marginales, las decisiones están llenas de interrogantes. Es evidente que en caso de intolerancia, siempre se puede extirpar el trasplante realizado y volver a la situación anterior, pero tampoco se conocen los efectos a largo plazo de la terapéutica inmunosupresora que el paciente habrá tenido que recibir. Es de esperar que el futuro desarrollo de inmunosupresores de baja toxicidad solucione algunas de estas cuestiones.

Decía Hipócrates que la medicina debe curar o cuanto menos aliviar. Los trasplantes no son una panacea, pero tampoco se limitan a aumentar la supervivencia, prolongando la vida y alejando la muerte como se ha dicho, sino que contribuyen a menudo a que los enfermos salvados tengan además una calidad de vida más que aceptable.

Pero queda por ver si están justificados socialmente los trasplantes cuando no hay peligro vital, cuando se practican únicamente para mejorar esta calidad de vida. Cada sociedad debe decidir qué procedimientos están justificados y a quién deben aplicarse (78). Mientras tanto, el rápido progreso tecnológico es de esperar que permita poco a poco encontrar soluciones que proporcionen un consenso lo más amplio posible.



**Bibliografía**

1. **Calne, R. (1994):** «The history and development of organ transplantation: biology and rejection», *Baillière's Clin. Gastroenterol.*, 8: 389-398.
2. **Merrill, J. F.; Murray, J. E.; Harrison, J. R. et al. (1956):** «Successful homotransplantation of human kidney between identical twins», *JAMA*, 160: 277-279.
3. **Barnard, C. N. (1967):** «A human cardiac transplant», *S. Afr. Med. J.*, 41: 1271-1275.
4. **Starzl, T. E. (1994):** «El Hombre Puzzle. Memorias de un Cirujano de Trasplantes», *JR Prous SA*, Barcelona.
5. **Kelly, W. D.; Lillehei, R. C.; Merkel, F. K. et al. (1967):** «Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy», *Surgery*, 61: 827-837.
6. **Cooley, D. A.; Bloodwell, R. D.; Hallman, G. L. et al. (1969):** «Organ transplantation in advanced cardiopulmonary disease», *Ann. Thorac. Surg.*, 8: 30-36.
7. **Deltz, E.; Schroeder, P.; Gundlach, M. et al. (1990):** «Successful clinical small bowel transplantation», *Transplant Proc.*, 22: 2051.
8. **Dubernard, J. M.; Owen, E.; Herzberg, G. et al. (1999):** «Human hand allograft: report on first 6 months», *Lancet*, 3, 53: 1315.
9. **Borel, J. F.; Feurer, C.; Gubler, H. U. et al. (1976):** «Biological effects of cyclosporin: a new antilymphocytic agent», *Agents Actions*, 6: 468.
10. **Fluss, S. S.:** Comunicación personal.
11. **Romeo Casabona, C. (1979):** *Los trasplantes de órganos*, Bosch, Barcelona.
12. **Pellegrino, E. D. (1985):** «Life, death and suffering from a Christian perspective, Their impact on health policy», in *Health Policy, Ethics and Human Values*, Z. Bankowski, J. H. Bryant (eds.): CIOMS, Geneva, 266-273.

13. **Lin, H. M.; Kauffman, M.; McBride, M. A. et al. (1998):** «Center-specific graft and patient survival rates 1997 United Network for Organ Sharing (UNOS) Report», *JAMA*, 280: 1153-1160.
14. **Matesanz, R.; Miranda, B.; De Felipe, C. y Naya, M. T. (1997):** «Evolución de la donación y la actividad transplantadora en España», en *El Donante de Órganos y Tejidos*. A. López Navidad, J. Kulisevsky y F. Caballero (eds.): Barcelona, Springer Verlag Ibérica.
15. **Lundgren, G. (1987):** «Widening indications of kidney transplantation-are there limits?», *Transplant Proc.*, 19: 63-65.
16. **Castro, L. A. (1986):** «Indications for renal transplantation-an introduction», *Transplant Proc.*, 4 (Suppl. 3), 5.
17. **Catalunya Trasplantament (1996):** *Informe sobre donació, extracció i trasplantament d'òrgans i teixits*, Sèrie trasplantament-4. OCATT, Servei Català de la Salut.
18. **Almenar Bonet, L. (1999):** «Registro Nacional de Trasplante Cardíaco IX Informe Oficial (1984-1997)», *Rev. Esp. Cardiol.*, 52: 153-158.
19. **Caralps, J. M.:** Comunicación personal.
20. **Keeffe, E. B. (1998):** «Summary of guidelines on organ allocation and patient listing for liver transplantation», *Liver Transplant Surg.*, 4: S108-S114.
21. **Brown, K. A. & Moonka, D. K. (1999):** «Liver Transplantation», *Current Opinion in Gastroenterology*, 15: 278-282.
22. **Martin, X.; Dubernard, J. M. & Lefrançois, N. (1994):** «Pancreatic transplantation: indications and results», *Baillière's Clin. Gastroenterol.*, 8: 533-560.
23. **Mayer, A. D. (1994):** «Small bowel transplantation», *Baillière's Clin. Gastroenterol.*, 8: 561-580.
24. **Abu-Elmagd, K. M.; Reyes, J.; Fung, J. J. et al. (1999):** «Evolution of clinical intestinal transplantation: improved outcome and cost-effectiveness», *Transplant Proc.*, 31, 582-584.

25. **López Navidad, A. (1997):** «El donante de órganos», en *El Donante de Órganos y Tejidos*, A. López Navidad, J. Kulisovsky y F. Caballero (eds.): Barcelona, Springer Verlag Ibérica.
26. **Margreiter, R. (1987):** «What can be done about the insufficient supply of grafts?», *Transplant Proc.*, 19: 79-83.
27. **Wooley, F. R. (1984):** «Ethical issues in the implantation of the total artificial heart», *N. Engl. J. Med.*, 310: 292-295.
28. **Ghent, C. N. (1986):** «Selection of patients», *Transplant Proc.*, 18 (Suppl. 4), 160.
29. **Price, D. P. T. (1997):** «Organ transplant initiatives: the twilight zone», *J. Med. Ethics*, 23: 170-175.
30. **Roehl, L.; Dreikorn, K. & Horsch, R. (1986):** «Renal transplantation in recipients aged over 50 years», *Transplant Proc.*, 18: 1012-1013.
31. **Parsons, V. & Lock, P. (1980):** «Triage and the patient with renal failure», *J. Med. Ethics*, 6: 173-176.
32. **Doudera, A. E. (1986):** «Conference on legal and ethical issues surrounding organ transplantation», *Int. Digest Health Leg.*, 37: 154.
33. **Van der Werff, A. (1985):** «Health Policy, ethics and organ transplantation», in *Health Policy, Ethics and Human Values*, Z. Bankowski & J. H. Bryant (eds.): CIOMS Geneva: 206-216.
34. **Atterbury, C. E. (1986):** «The alcoholic in the lifeboat. Should drinkers be candidates to liver transplantation?», *J. Clin. Gastroenterol.*, 8: 1-4.
35. **Berlakovich, G.; Steininger, R.; Herbst, F. et al. (1994):** «Efficacy of liver transplantation for alcoholic cirrhosis with respect to recidivism and compliance», *Transplantation*, 58: 560-565.
36. **Lucey, M. R.; Carr, K.; Beresford, T. P. et al. (1997):** «Alcohol use after liver transplantation in alcoholics: a clinical cohort follow-up study», *Hepatology*, 25: 1223-1227.

37. **Engelhardt, H. T. Jr. (1984):** «Allocating scarce medical sources and the availability of organ transplantation», *N. Engl. J. Med.*, 311: 66-69.
38. **Forster, J.; Bartholome, W. G. & Delcore, R. (1996):** «Should a patient who attempted suicide receive a liver transplant?», *J. Clin. Ethics*, 7: 257-267.
39. **Moss, A. H. & Siegler, M. (1991):** «Should alcoholics compete equally for liver transplantation?», *JAMA*, 265: 1295-1298.
40. **Atterbury, C. E. (1996):** «Anubis and the feather of truth: judging transplant candidates who engage in self-damaging behavior», *J. Clin. Ethics*, 7: 268-276.
41. **Shaw, B. (1948):** *The Doctor's Dilemma*, Dodd, Mead & co., New York.
42. **Vilardell, F. (1988):** «Organ transplantation -ethical issues», in *Health Policy, Ethics and Human Values*, Bankowski, Z. & Bryant, J. H. (eds.): CIOMS, Geneva.
43. **Ballester, M.:** (Comunicación personal).
44. **Winslow, G. R. (1982):** *Triage and Justice*, University of California Press, Berkeley.
45. **Rescher, N. (1969):** «The allocation of exotic medical life-saving therapy», *Ethics*, 79: 173-179.
46. **Wilkes, M. S. & Slavin, S. (1998):** «Heart transplantation selection criteria: attitudes of ethnically diverse medical students», *J. Clin. Ethics*, 9: 147-155.
47. **Kluge, Eike-Henner W. (1989):** «Designated organ donation: private choice in social context», *Hastings Center Report*, 19: 10-16.
48. **US Department of Health and Human Services (1986):** «Organ transplantation issues and recommendations», *Report of the Task Force on Organ Transplantation*, US Government Printing Office, April.
49. **Monaco, A. P. (1987):** «Problems of transplantation-ethics, education and expansion», *Transplantation*, 43: 1-6.

50. **Jonsen, A. K. (1984):** «On Baby Fae: Defining a rescue ethic», *Herald Tribune*, 31 oct.
51. **Viedma, M. A. y Porta, O. (1998):** «Bioética i trasplantament d'òrgans», *Bioètica & Debat IV*, 13: 1-13.
52. **Parks, W. E.; Barber, R. & Painvin, G. A. (1986):** «Ethical aspects of transplantation», *Surg. Clin. North Am.*, 66: 653-659.
53. **Kanoti, G. A. (1986):** «Ethical considerations in solid organ pediatric transplants», *Transplant Proc.*, 18 (Suppl. 2): 43-46.
54. **Superina, R. A.; Harrison, C. & Whittington, P. F. (1999):** «Ethical issues in pediatric liver transplantation», *Transplant Proc.*, 31: 1342-1344.
55. **Moskop, J. C. (1987):** «Organ transplantation in children», *Ethical Issues J. Pediatrics*, 110: 175-178.
56. «Time», 11 mayo 1987.
57. **Sharma, D. C. (1999):** «Indian organ donation goes ahead without consent», *Lancet*, 353: 1076.
58. **Grande, A. M.; Rinaldi Goggi, C. et al. (1998):** «Heart transplantation without informed consent: discussion of a case», *Intensive Care Med.*, 24: 251-254.
59. **Tanaka, K.; Uemoto, S.; Tokunaga, Y. et al. (1993):** «Surgical techniques and innovations in livers related transplantation», *Ann. Surg.*, 217: 82-91.
60. **Belghiti, J. (1999):** «La transplantation hépatique avec donneur vivant», *Med. Chir. Dig. (Paris)*, 28: 49-51.
61. **Rapaport, F. T. (1986):** «The case for a living emotionally related international kidney donor exchange registry», *Transplant Proc.*, 18 (suppl. 2) 5.
62. **Margreiter, R. (1987):** «What can be done about the insufficient supply of grafts?», *Transplant Proc.*, 19: 79.
63. **Starzl, T. E. (1986):** *Will live organ donations no longer be justified?* *Hastings Center Report (April)* 5.

64. **Caplan, A. L. (1995):** «Organ and tissue transplants: ethical issues», *Encyclopedia of Bio-ethics*, Simon & Schuster-McMillan, New York, 1888-1894.
65. **Jameton, A. L. (1978):** «Organ donation, ethical issues», *Encyclopaedia of Bio-Ethics*, McMillan and Free Press New York, 1153.
66. **Marcus, C. (1985):** «Spectre of comercialism dominates transplant symposium», *Can. Med. Ass. J.*, 133: 314-316.
67. **Duroy, L. (1991):** «Les greffes de la honte», *L'Événement du Jeudi* (18-24 julio).
68. **Dickens (1987):** «BM Legal and ethical issues in buying and selling organs», *Transplantation/Implantation Today* (Feb.), 15.
69. **Salahudeen, A. K.; Woods, H. F.; Pingle, A. et al. (1990):** «High mortality among recipients of bought living unrelated donor kidneys», *Lancet*, 336: 725-728.
70. **US Department of Health and Human Services (1986):** *Organ Transplantation Issues and Recommendations*, US Government Printing Office. April.
71. **Council of Europe (1978):** *Harmonisation of legislations of member states relating to the removal, grafting and transplantation of human substances*, Strasbourg.
72. **The Council of the Transplantation Society (1986):** «Commercialisation in transplantation. The problems and some guidelines for practice», *Transplantation*, 41: 1-3.
73. **Radcliffe-Richards, J.; Daar, A. S.; Guttman, R. D. et al. (1998):** «The case for allowing kidney sales», *Lancet*, 351: 1950-1951.
74. **Daar, A. S. (1998):** «Paid organ donation - the grey basket concept», *J. Med. Ethics*, 24: 365-368.
75. **Dickens, B. M. (1992):** «Legal aspects of transplantation», *Transplant Proc.*, 24: 1054-1057.
76. **Sells, R. A. (1994):** «Ethical issues in transplantation», *Baillière Clinical Gastroenterology*, 8: 465-479.

77. **Sells, R. A. (1999):** «Informed consent from recipients of marginal donor organs», *Transplant Proc.*, 31: 1324-1325.
78. **Guttmann, R. (1992):** «On the use of organs from executed criminals», *Transplantation Reviews*, 6: 189-193.
79. **President's Commission for the Study of Ethical Problems in Medicine and Biomedical Behavioral Research (1982):** *Defining Death*, Washington DC US Government Printing Office.
80. **Working party on behalf of the Heath department of Great Britain and Northern Ireland (1983):** *Cadaveric Organs for transplantation. A code of practice including the diagnosis of brain death*, (Feb.).
81. **Working party of the Pontifical Academy of Sciences (1985):** «Report on artificial prolongation of life and the exact moment of death», *L'Osservatore Romano* (31 octubre).
82. **Bernat, J. L.; Culver, C. M. & Gert, B. (1981):** «On the definition and criterion of death», *Ann. Intern. Med.*, 94: 389-391.
83. **Youngner, S. J. & Bartlett, E. T. (1983):** «Human death and high technology. The failure of the whole brain formulations», *Ann. Intern. Med.*, 99: 252.
84. **Harrison, M. R. (1986):** «Organ procurement for children. The anencephalic fetus as a donor», *Lancet*, 2: 1383-1384.
85. **Holzgrave, W.; Beller, F. K.; Buchholz, B. et al. (1987):** «Kidney transplantation from anencephalic donors», *N. Engl. J. Med.*, 316: 1069-1071.
86. **Caplan, A. L. (1984):** «Ethical and policy issues in the procurement of cadaver organs for transplantation», *N. Engl. J. Med.*, 311: 981-984.
87. **Matesanz, R. (1995):** «Presente y futuro de los trasplantes en España», *Rev. Clin. Esp.*, 195: 203.
88. **Gillon, R. (1995):** «On giving preference to prior volunteers when allocating organs for transplantation», *J. Med. Ethics*, 21: 195-196.

89. **Youngner, S. J. & Arnold, R. M. (1993):** «Ethical, psychosocial and public policy implications of procuring organs from non-heart-beating cadaver donors», *JAMA*, 269: 2769-2774.
90. **Theis, E. C. (1986):** «Ethical issues. A nursing perspective», *New Engl. J. Med.*, 315: 1222-1224.
91. **Robinette, M. A.; Stiller, C. R. & Marshall, W. J. S. (1986):** «Barriers to organ donation within hospitals and involving health care professionals: finding of the Ontario Government Task Force on Kidney Donation», *Transplant Proc.*, 18: 387-389.
92. **Bartucci, M. R. & Seller, M. C. (1986):** «Donor family responses to kidney recipient letters of thanks», *Transplant Proc.*, 18: 401.
93. **Tolle, S. W.; Bennett, W. M.; Hickam, D. H. et al. (1987):** «Responsibilities of primary physicians in organ donation», *Ann. Intern. Med.*, 106: 740-742.
94. **Ruers, T. J. M.; Vroemen, J. P. A. M. & Koostra, G. (1986):** «Non-heart beating donors: a successful contribution to organ procurement», *Transplant Proc.*, 18: 408.
95. **(1995):** «Maastricht symposium on non-heart-beating donors», *Transplant Proc.*, 27: 2891-2939.
96. **Truog, R. D. (1997):** «Is it time to abandon brain death?», *Hastings Center Report*, 27: 29-37.
97. **Burdick, J. F. (1993):** «Potential conflicts of interest generated by the use of non-heart-beating cadavers», *Kennedy Institute of Ethics Journal*, 3: 199-202.
98. **Frader, J. (1993):** «Non heart-beating organ donation: personal and institutional conflicts of interest», *Kennedy Institute of Ethics Journal*, 3: 189-198.
99. **Weisbard, A. J. (1993):** «A polemic in principles: reflections on the Pittsburgh protocol», *Kennedy Institute of Ethics Journal*, 3: 217-230.
100. **Peters, T. G.; Williams, J. W.; Vera, S. R. et al. (1986):** «Liver procurement: lessons from the first sixty liver transplants at the University of Tennessee», *Transplant Proc.*, 18: 602-603.



101. **Vilardell, F. (1988):** «Organ transplants: are they ethical?» *World Health* (June): 20-21.
102. **Puig Junoy, J.:** «Los trasplantes de órganos: el coste de oportunidad de las decisiones clínicas», Mesa Redonda sobre Trasplantes de órganos, Real Academia de Medicina de Cataluña (pendiente de publicación).
103. **Michel, B. C.; van Hout B. A. & Bonsel, G. J. (1994):** «Assessing the benefits of transplant services», *Baillières Clin. Gastroenterol.*, 8: 411-424.
104. **Bonsel, G. K.; Klompmaker, I. J.; van T. Veer, F. et al. (1990):** «Use of prognostic models for assessment of value of liver transplantation in primary biliary cirrhosis», *Lancet*, 335: 493-497.
105. **Evans, R. W. (1999):** «How dangerous are financial incentives to obtain organs?», *Transplant Proc.*, 31: 1337-1341.
106. **Gillon, R. (1986):** *Philosophical Medical Ethics*, John Wiley, Chichester.
107. **Beauchamp, T. L. & Childress, J. F. (1979):** *Principles of Biomedical Ethics*, Oxford U.P. New York.
108. **Cranford, R. E. (1995):** «Death definition and determination», Reich, W. T. (ed.): *Encyclopedia of Bioethics*, revised edition, Simon & Schuster McMillan, New York, 529-533.
109. **Capron, A. M. (1995):** «Legal issues in pronouncing death», Reich, W. T. (ed.): *Encyclopedia of Bioethics*, revised edition, Simon & Schuster McMillan, New York, 1851-1856.
110. **Chadwick, R. & Schüklenk, U. (1998):** «Organ transplants and donors», *Encyclopedia of Applied Ethics*, vol. 3, 393-398.
111. **Chiche, L. (1993):** «Pénurie de greffons hépatiques. Quelles solutions pour parer à l'inéluctable?», *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 17: 823-826.
112. **Prottas, J. (1995):** «Organ and tissue procurement. Medical and organizational aspects», in Reich, W. T. (ed.): *Encyclopedia of Bioethics*, revised edition, Simon & Schuster McMillan, New York, 1852-1856.

113. **Martin, D. K. & Meslin, E. (1994):** «The give and take of organ procurement», *J. Med. Phil.*, 19: 61-78.
114. **(1999):** «Transplants: advances raise issues», *Herlad Tribune* (3 mayo).

# ETHICAL CONSIDERATIONS RELATED TO XENOTRANSPLANTATION

*Fritz H. Bach and Elizabeth A. McGregor*

Beth Israel Deaconess Medical Center,  
Harvard Medical School, Boston, USA



Given the great shortage of human organs that can be used for transplantation, the field has turned to the possible use of pig organs for transplantation to humans: xenotransplantation. Xenotransplantation would, if it could be developed to the point where pig organs survive and function in humans and the therapies needed to achieve survival are reasonable, save many tens, perhaps even hundreds of thousands of lives per year that are currently lost. Most investigators in the field believe that we are not yet at the point where organ xenotransplantation can be performed clinically; there are still formidable obstacles that must be overcome that currently lead to rejection of pig organs in non-human primates, and that would likely do the same in humans. However, there should be hope that these barriers can be overcome with the development of additional therapeutic approaches, be they genetic engineering of the donor organ (expressing new genes to block rejection in the organ that is transplanted) or the development of new immunosuppressive agents.

While xenotransplantation would offer this significant and important advance in medical therapy, it also raises a number of ethical issues. These issues include mixing of species, genetic engineering of the donor pigs, the problems of informed consent in xenotransplantation, and several others. We shall not detail these issues here. Rather, it is our purpose to focus on our own current activities in ethics, governance and society as it relates to xenotransplantation. We shall focus on only one issue in this paper: namely, that of the infectious risk attendant to xenotransplantation.

## **The Ethical Issues**

Pig organs carry the genetic information in their DNA for retroviruses, the type of virus that causes malignancy and that caused the AIDS epidemic. There are other infectious organisms carried by pigs. It is possible that one of the pig viruses (let us use the virus as the example of the general infectious problem), which causes no disease in pigs, could infect the cells of the human recipient and spread to the general population. Everyone agrees that such a risk exists, although there is disagreement about whether the likelihood of such an event occurring can be accurately stated. Some argue that we cannot know what the probability is that a recipient human would be infected with a pig virus and then transmit that virus to the general population; others argue that such a risk would be small, or even infinitesimal. No matter the magnitude of the risk, if a pig virus were to spread beyond the patient to the general population, the potential negative effect of the event would be enormous.

The highly unusual nature of this risk is that it affects individuals other than the patient. The introduction of "informed consent" in medicine has been used to allow the patient to understand the nature of the benefits a given treatment would have as well as to comprehend the risks that s/he would be undertaking if they undergo the treatment in question. In the case of xenotransplantation, it would not only be the patient who would be at risk, but individuals in the population who are potentially not even aware that they are being put at risk.

## **A Moratorium to Allow Public Involvement in Decision-Making**

Based on this unusual situation of risk, we suggested that there be a moratorium on clinical xenotransplantation that poses such a risk until certain steps have been taken. We suggested that if the public is to be put at risk, every effort should be made both to inform the public about the risk and to develop a methodology that would allow input from the public. It is important to define the use of the term "public" here. In terms of informing the public, every effort should be made to inform the largest number of individuals in society as possible, in a manner that allows the members of the public to understand the issues. The "public" could be quite different in terms of the individuals from whom one would obtain feedback. The "public" might be a significant proportion of the population (as in national referenda as they are held in Switzerland or relatively small groups that have input from larger segments of the

population as in the discussions of such issues as takes place in Denmark).

We suggested that for the United States one might organize a national committee to consider the issues. Such a national committee should be comprised of individuals who are open-minded, sensible and broadly-concerned citizens from many walks of life, thus representing a range of philosophical backgrounds and disciplines. Ethicists must be actively involved. Physicians and scientists familiar with technical aspects of the problem should also be included. As part of their own educational process, the committee would invite experts in relevant disciplines to answer questions and give advice. These should include, but not be limited to, those involved in the science of xenotransplantation, epidemiology, ethical aspects of the problem, animal welfare and rights, the medical profession, commercial efforts in transplantation, as well as the law and economics. Potential transplant recipients should be consulted. It will be important for the committee to have input from experts from the U.S. Food and Drug Administration and the Centers for Disease Control and Prevention.

Education of the members of the national committee would be only a preliminary to their participating in decision-making about the future of xenotransplantation. The fundamental aim is to develop a consensus about the risks posed by present clinical trials, whether these efforts in xenotransplantation should be abandoned or expanded, and if the latter, under what conditions. The members of the National Committee could use other methods of public consultation, such as Town Hall meetings held in various locations in the country, to broaden their input. These efforts in the United States would have to be coordinated internationally with similar ones internationally. Whatever safeguards are needed to avoid infectious spread to the population would have to be adhered to in all countries concerned.

There are some historical precedents to deal with concerns about risks to the public of infection from novel procedures, such as agents produced by genetic engineering. The Asilomar proposals set standards dealing with recombinant DNA research. The fact that worst-case scenarios that underlay that caution did not materialize is no reason to suspend caution in this case.

No matter what the nature of the "public" that will have input, it is critical that that public is well informed about the issues. Clearly all bodies having an interest in the issues, no matter how extreme their views, should be heard by the National Committee. However, individuals who have a conflict of interest with regard to

xenotransplantation should not make or try to influence the final decision of the National Committee. It would be the difficult task for the National Committee to balance the rights of the individual vs. the rights of the public. They would have to weigh the immediate needs of the patient against the speculative risk to the population.

Our suggestion for a moratorium was based on the rights of the population to render their views, not unlike the informed consent we offer to the patient, if we were going to do xenotransplantation, thereby putting them at risk. Further, we felt that the population should have a right to be heard before they were put at risk, again not unlike informed consent for the individual patient. Our suggestion for the moratorium was challenged.

Some of the major objections to the moratorium were the following. First, that we had previously put the population at risk without a moratorium and the type of discussion with the public that we were now proposing for xenotransplantation. The specific instance brought up was that of the use of antibiotics which would give rise to resistant organisms thus putting others at risk of infections that we might not be able to treat. We argued that if a discussion of the type we are now proposing for xenotransplantation were held several decades ago about antibiotics and their use, the results of that discussion might well have curtailed the excessive use of antibiotics as went on for many years and still does. This would likely have led to a slower arising of resistant organisms.

A second argument against the moratorium was that the only way to find out if there is an infectious risk is to do the experiment: namely, to transplant organs to humans. This would presumably be done in a measured manner with careful monitoring of the patients. We argued that the decision whether to undergo the risk of a carefully monitored trial was still something that required input from the public. It is correct that the only way to ascertain the magnitude of the risk is to transplant to humans. However, the issue here is whether the public is willing to accept the risk of xenotransplantation. No matter how carefully we monitor the patient, we cannot eliminate the risk. The question then is: who has the right to decide whether to undergo that risk. Our answer was that only those being put at risk, i.e. the patient and the public, have that right.

A third argument concerned the plight of the patient who will die if s/he does not receive a transplant. A moratorium would deny xenotransplantation to a certain number of such patients. This is a horrible conundrum in which to place anyone having to make a de-



cision. The need of the individual patient is always so commanding. However, it must be the task of the National Committee (or other body representing the public) to balance that immediate pressing need with the rights of the public. With xenotransplantation, there is another factor to consider. We are not yet ready to do organ xenotransplantation. We are thus in the fortunate position of being able to consider the ethical aspects related to organ xenotransplantation while trying to perfect the techniques needed to have successful xenotransplantation to humans. For the moment, thus, the ethical discussion is not delaying the application of organ xenotransplantation.

### **The Current Status of Regulation of Xenotransplantation**

Several countries have regulated xenotransplantation. In the United States, the Food and Drug Administration (FDA), in collaboration with other agencies including the Center of Disease Control and Prevention (CDC), has the power to make decisions whether to move forward with xenotransplantation. In fact, the FDA has permitted a limited number of trials of transplanting pig cells into the brains of patients with degenerative diseases of the brain. Some investigators have also used *ex vivo* perfusion of pig livers with blood of patients whose livers have failed. (This procedure involves having the patient's blood flow through a pig liver that is kept outside the patient's body, with the purpose of having the pig liver function to replace the function of the liver of that patient. The procedure can be used either to keep patients alive long enough that they can then get a human liver transplant, or in some cases to keep the patient alive until that patient's own liver starts to function again.) No permission has been given to date to transplant pig organs to humans, however that has not been ruled out. No moratorium exists in the United States.

In contrast, the Council of Europe has adopted a moratorium for xenotransplantation. Several countries in Europe have a *de facto* moratorium, with some having established committees that will decide whether organ xenotransplantation will be performed. In most cases, these committees include ethicists and a consideration of the ethical issues, something that has not been a significant focus in the United States. Other countries in Europe have regulations that do not necessarily bar xenotransplantation until the public has been consulted.

## **An International Effort Aimed at Discussion of the Ethical and Social Issues Attendant to Xenotransplantation**

The possibility of an infectious epidemic arising because of organ xenotransplantation is one that concerns all countries. International borders would clearly not limit viral spread. Other aspects of issues related to xenotransplantation are also of concern not only in the richer countries in which xenotransplantation would presumably first be used, but also to developing countries.

A group of individuals interested in this problem area have taken the initiative to develop an international effort to take up these issues of ethics and governance. This initiative plans to address the concerns about xenotransplantation. In addition, however, the initiative uses xenotransplantation as a model of the type of technology that will require ethical as well as technical review in the future as new technologies raise ethical issues.

An international meeting was held at Meech Lake, Canada with the purpose of discussing various aspects related to the ethical aspects of xenotransplantation. Approximately 40 individuals representing around 10 countries from both the industrialized and the developing world were present. The ethical, scientific, economic and public consultation areas were discussed. A consensus developed from that meeting that listed three priorities for a group that should carry on from there: to develop an international ethic for xenotransplantation, to involve both the developing and developed world, and to use public consultation.

As a result, a "study group" guided by the co-chairs, Dr. Farkonda Hassan of Egypt and Dr. Strachan Donnelley of the Hastings Center in the United States has formed. That group is promoting the writing of "white papers" in areas in which the current information is either incomplete and/or is the subject of controversy. These white papers will form the basis of a number of initiatives. To provide a greater degree of detail in the areas of the white papers and in other areas, a website is being established that will have information in a variety of areas of interest and that will link to other web sites dealing with xenotransplantation. In addition to the white papers, there will be "informational" papers about issues such as the state of regulation in different countries and methods of public consultation that have been used and evaluated in other spheres.

The activities that are underway and being planned include the following. National Committee-like<sup>1</sup> efforts are being established in several countries including some in the developing world. The study group will coordinate the efforts of and results from the activities of various National Committees. Group discussions in the United States (and perhaps in other parts of the world) are being initiated in various fora. These will hopefully include, but not be limited to colleges and high schools. As a part of this effort, a questionnaire is being prepared that will probe various issues. Connections to and involvement with bodies that have interest in such matters is being established.

### **Having the Public Influence Governance**

The goal of these efforts is to establish a methodology that will allow public consultation on technologies that require ethical discussion in addition to a technical review and to translate the "decisions" reached by public consultation to the sphere of governance. This last step represents a major challenge in some areas of world, but is an essential if this whole process is to have meaning.

At the present time, public consultation is championed by many. However, how to consult the public in a helpful and meaningful manner is still a much-discussed issue. Even if we could agree on methods of public consultation, there is still the critically important issue of how the opinion of the public can be translated into public policy. For the US, at least, this involves potential confrontation between those that lobby the government to achieve their goals and those who are effected by the actions in question.

It is critical that issues such as xenotransplantation are put into perspective. While there is general agreement that there is the infectious risk, it is important to keep in mind that this is yet another incremental risk that we would undertake in our lives. In that regard it is no different from the building of nuclear power plants, a topic that has been influenced extensively by the public.

It is also important that we do not hold back potentially life-saving procedures for longer than is absolutely necessary. We must develop a system that allows for the simultaneous evaluation of the technical aspects of any invention and the ethical ones. The ethical ones would hopefully be undertaken even as the new procedure is

---

<sup>1</sup> We anticipate the National Committees will vary in their membership and in their method of procedure in the different countries from the model we suggested for the United States.

being considered for use, again so as not to delay its application if it is regarded as a valuable one when considering all factors.

This is paper # 801 from our laboratories. FHB is a paid consultant to Novartis Pharma, Basel, Switzerland. This paper is being published in identical form elsewhere.

# **XENOTRANSPLANTATION: PLUNGING HEADLONG INTO MADNESS**

*Alan H. Berger*

Executive Director Animal Protection Institute, USA



Transplanting organs such as hearts, lungs, livers, kidneys, etc. from human donors to human patients seems commonplace today. In 1997, 20,006 organ transplants were performed in the United States<sup>1</sup> but the waiting list at the end of 1997 was 56,678 patients<sup>2</sup>. What we seem to have is an increasing demand for these prized organs and a seemingly limited supply.

With this *perceived chronic shortage of human donor organs* – the medical community has looked for a new source... and thinks it has found it in animals! Yes, *xenotransplantation*, animal-to-human transplants is being touted as the perfect answer.

## **So What's Wrong with Xenotransplantation?**

The proponents of xenotransplantation want you to envision a new world with an unlimited supply of fresh organs, available to anyone in need. What they don't tell you is the downside of xenotransplants. The cost –to the animals whose organs are used, to the humans who pay for it financially and ethically, and to all animals (human and non-human) who face the real possibility of the potential catastrophic transmission of a fatal virus.

*Animal Ethics:* The first and most basic of the ethical considerations behind xenotransplantation still needs to be examined - is it mo-

---

<sup>1</sup> Table 2. «U.S. Organ Transplants by Organ and donor Type - 1988 to 1977», 1998 UNOS Annual Report.

<sup>2</sup> Table 6. «Waiting List Patient Characteristics at Year's End - 1988 to 1977», 1998 UNOS Annual Report.

rally acceptable to use animals as containers of spare parts for humans? Reluctantly and sadly, I accept the fact that the medical community simply doesn't care. To them, it is *too bad*, but after all, humans do come before all other living things. We are the masters of our universe. It is obvious that speciesism is just part of our cultural fabric which unfortunately incorporates discrimination in all of its ugly forms.

But even when using animals for research, investigators purport to be ethically bound to treat them humanely and to use the smallest number of animals to benefit the greatest number of people. Under this basic research protocol, sacrificing animals for xenotransplants—where the number of people who “benefit” from one animal may only be one—is not ethically acceptable.

The animals suggested for xenotransplantation are not *regular* animals, they are transgenic, genetically engineered to be more *human*. The ethical, moral, philosophical, and religious concerns over the creation of a “new” species—never seems to be seriously addressed:

- Is this what we as a society really want?
- Where does it end?
- Who controls this process?
- How human would a transgenic animal be?
  
- If the early xenografts are rejected, will we continue to tamper with animal genetics and make the animals used for this experimental research even more human?
- When does an animal with human genes become human, deserving full human rights?
- What if our genetic tampering misfires—what have we created?

The public has increasingly questioned the use of animals by humans. In an Associated Press poll taken in November, 1995, 67 % of those polled agreed somewhat or strongly that an animal's right to live free of suffering should be as important as a person's right to live free of suffering. Only 8 % felt that it was always right to use animals to test medical treatment; 29 % felt it was never or seldom right; and 62 % said it was right under some circumstances. These opinions to protect animals have continued to get stronger.

It is unclear whether the public finds xenotransplantation acceptable. A 1998 study by the National Kidney Foundation (funded by Novartis) claimed that 62 % of Americans accept the concept of xenotransplantation and nearly 75 % would consider a xenotransplant for a loved one if the organ or tissue were unavailable from a



human<sup>3</sup>. Other studies show a different result. In a 1995 study in Australia, only 41.6 % would accept an organ from a pig<sup>4</sup>.

The larger ethical question is the lesson we are presenting to future generations. Our society does not have a reverence for all life:

- Does our careless disregard for all living things assist in the increased violence in our society?
- Are we more interested in expanding our knowledge at any cost, even our own humanity?

*What National Health Care Policy?* The Census Bureau reported recently that 44.3 million Americans, 16.3 % of the American population, were uninsured in 1998. The nation's uninsured were most likely to be found in low-income households, among minority groups, and in the ranks of full-time workers:

- One-fourth of those in households making less than \$25,000 a year were uninsured.
- Better than one-third of Hispanic households lacked coverage.
- Roughly four in five of the uninsured were full-time workers or their dependents<sup>5</sup>.

"Lack of health care coverage has reached epic proportions", charged Ron Pollock, Executive Director of Families USA<sup>6</sup>. New medical technology, the rising cost of prescription medication and the increasing longevity of older people who require more care have combined to increase insurance premiums and to price many employers out of the medical insurance market, according to Richard Coorsh of Health Insurance Association of America<sup>7</sup>.

According to a 1996 study coordinated by the Harvard School of Public Health, approximately 50 million adults in the U.S. have difficulties with access to needed medical care and the affordability of medical bills. Almost 70 % of those (equally divided between uninsured and insured adults) said that their problems in getting needed medical care are serious<sup>8</sup>.

<sup>3</sup> «Americans Recognize Organ Shortage, Support Animal-to-Human Transplants, New Survey Says», *The National Kidney Foundation*, January 21, 1998.

<sup>4</sup> Paula J. Nohacsi, et al., «Patients' Attitudes to Xenotransplantation», *Nature*, Vol. 378, November 30, 1995.

<sup>5</sup> David Westphal, «Study: One Million Join the Uninsured», *Sacramento Bee*, October 4, 1999.

<sup>6</sup> Westphal.

<sup>7</sup> Tony Pugh, «More of Us Lack Health Coverage», *Knight Ridder Newspapers. Contra Costa Times*, October 4, 1999.

<sup>8</sup> Karen Donelan, et al., «Whatever Happened to the Health Insurance Crisis in the United States?», *JAMA*, Volume 276 (1996), 1346-1350.

In a 1993 Kaiser/Commonwealth Fund health insurance survey, 34 % of the uninsured reported that they failed to receive needed care, and 71 % postponed needed care. And the uninsured who have chronic illnesses "are least likely to receive proper maintenance and continuous care, with the result that untreated conditions such as hypertension or diabetes can lead to serious consequences"<sup>9</sup>.

Access to medical care becomes much more acute in inner-city America. In the Bedford-Stuyvesant/Crown Heights area of Brooklyn, office-based doctor rate per capita is less than half the national average, even though medical needs are critical. For example, infant mortality rates are 40 % higher than the national average and the rate of AIDS is nine times the national average<sup>10</sup>.

"In these times of managed care and a nationwide glut of hospital beds", reported *The Wall Street Journal* on the reluctance of state officials to authorize \$300 million to overhaul an aging hospital in Brooklyn, "Reviving these ailing medical centers may make little economic sense. Experts say it is time for a better way: lean clinics that provide out-patient and primary care"<sup>11</sup>.

But when health care management takes services away from poorer neighborhoods, the "national glut of hospital beds" is not available to the people who need them most, as revealed in a recent study by the Harvard School of Public Health. There's virtually no access to health care for native Americans on reservations, for urban blacks, for the poor concentrated anywhere. For them, health is poorer, life is shorter. Health care access can vary life expectancies by as much as 15 years between areas as little apart as 12 miles<sup>12</sup>.

It is no wonder that people's confidence in our health care system is dwindling. In a National Coalition on Health Care poll, 80 % believe something is "seriously wrong" with the system and 87 % believe that the quality of care needs to be improved. Eight of ten blamed the profit motive for compromising quality<sup>13</sup>.

---

<sup>9</sup> Karen Davis, «1996 AHSR Presidential Address: Uninsured in an Era of Managed Care», *Health Services Research*, Volume 31 (1997), 641-649.

<sup>10</sup> Lagnado.

<sup>11</sup> Lagnado.

<sup>12</sup> Steve Sternberg, «Study Shows Yawning Gaps in U.S. Health Care», *USA Today*, December 4, 1997.

<sup>13</sup> Edwin Chen, «Distress Over Health System Seen Growing», *Los Angeles Times*, January 24, 1997.

Meanwhile, health care costs are skyrocketing. We spend \$425 billion a year—two-thirds of all medical expenditures—to treat the six leading chronic diseases that cause nearly three-quarters of all deaths:

- Heart disease.
- Cancer.
- Stroke.
- Diabetes.
- Obstructive pulmonary disease.
- Liver disease <sup>14</sup>.

Instead of allocating health costs to providing care to the millions who can't get it, our "baby boomer" bias concentrates on keeping that aging population bulge alive. If the mission of a national health care policy is to improve the quality of human health as well as saving lives, expensive experimental surgery such as xenotransplantation might never be considered.

*Poor Use of Resources:* In the year 2000 we will be spending nearly \$4 billion on organ transplants in the U.S. According to the U.S. Institute of Medicine (IOM) in their June 1996 report, this per year cost could rise to \$20.3 billion if all patients in need of organs receive xenotransplants, estimated at 100,000 per year <sup>15</sup>. These cost figures do not include expensive follow-up care for the thousands who have already received transplants. The average costs for transplantation in 1996 were the following:

	First Year Hospital/ Physician/Medication	Per Year Physician/ Medication Follow-up
Heart.....	\$253,200	\$21,200
Liver.....	\$314,500	\$29,100
Kidney.....	\$116,100	\$15,900
Kidney/pancreas.....	\$141,300	\$16,900
Páncreas.....	\$125,800	\$ 6,900
Heart/Lung.....	\$271,400	\$25,100
Lung.....	\$265,900	\$25,100
Cornea.....	\$8,000	0
Bone Marrow.....	\$217,000 <sup>16</sup>	\$29,300 <sup>17</sup>

<sup>14</sup> «Chronic Disease Costs Could Soar», *San Francisco Chronicle*, April 4, 1997.

<sup>15</sup> Institute of Medicine, *Xenotransplantation: Science, Ethics, and Public Policy*, Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.

<sup>16</sup> Richard H. Hauboldt, «Cost Implications of Human Organ and Tissue Transplantations, An Update 1996», *Research Report: Milliman & Roberts, Inc.*, 1996.

<sup>17</sup> Hauboldt.

The IOM cost estimates look quite conservative when compared to estimates from a 1996 report issued by one of the leading investment banking companies in the world, Salomon Brothers<sup>18</sup>.

They estimated in the year 2010, there would be worldwide 507,992 transplants using pig donors and only 27,819 using human donor organs. The use of human organs would decrease worldwide from 46,831 in 1994 to an estimated 27,819 in 2010, a decrease of about 40 %!

In 1994 the United States accounted for 37.8 % of the world's transplantations. If this percentage remain constant for 2010, 192,021 of the 507,992 xenotransplants projected worldwide would be in the U.S.; almost twice projected by the IOM:

Transplanted Organ	Worldwide # of Organs Transplanted	United States # of Organs Transplanted
Pig hearts.....	110,000	41,580
Pig livers.....	52,992	20,031
Pig kidneys.....	295,000	111,510
Pig Heart/Lungs.....	20,000	7,560
Pig lungs.....	30,000	11,340
	507,992 <sup>19</sup>	192,021

By using the extrapolated U.S. transplant numbers from the Salomon Brothers report with the 1996 dollar costs for transplants, we get a frightening picture of the investment for xenotransplants:

U.S. Transplants-First Year Costs			
Transplanted Organ	First year Cost	# of Organs Transplanted	Total Costs in Billions
Pig hearts.....	\$253,200	41,580	\$10.528
Pig livers.....	\$314,500	20,031	\$ 6.300
Pig kidneys.....	\$116,100	111,510	\$12.946
Pig Heart/Lungs.....	\$271,400	7,560	\$ 2.052
Pig lungs.....	\$265,900	11,340	\$ 3.015
		192,021	\$34.841

<sup>18</sup> Peter Laing, «Sandoz/The Unrecognized Potential of Xenotransplantation», *Salomon Brothers*, January, 1996.

<sup>19</sup> Laing.

U.S. Transplants-Annual Follow-up Costs			
Transplanted Organ	Follow-up Cost Year	# of Organs Transplanted	Total Costs in Billions
Pig hearts.....	\$21,200	41,580	\$ .881
Pig livers.....	\$29,100	20,031	\$ .583
Pig kidneys.....	\$15,900	111,510	\$1.773
Pig Heart/Lungs.....	\$25,100	7,560	\$ .190
Pig lungs.....	\$25,100	11,340	\$ .285
		192,021	\$3.712

The costs of these transplants would be \$34.8 billion rather than the \$20.3 billion estimated by the IOM. Also, follow-up costs each succeeding year for those 192,021 xenotransplants would be \$3.7 billion. Based on historical evidence of annual increases in medical costs, these numbers could be increasing significantly each year. Assuming the Salomon Brothers' projections are accurate, over 5 % of total annual medical expenditures in the United States will be for current transplantations!

Other cost increases and reductions may have an impact on these estimates, although it might not be significant in its net effect. These cost considerations are the following:

- None of these cost projections include human organ transplants or expensive follow-up care for the thousands who have had or will have transplants.
- Medical complications could occur that might significantly increase follow up costs.
- If xenotransplantation is successful, extended human life would increase social security benefits and possibly the need for transplants of other organs.
- Other cost increases:
  - Maintaining a national registry of xenotransplant patients.
  - Collecting, storing and testing sample specimens from xenotransplant recipients, close contacts of recipients, and animal donors.
  - Follow up with close contacts of recipients and possibly health care workers.
- Might be a reduction in acute care costs for transplant recipients. However, these costs might just be postponed until later, rather than just eliminated completely.

- Should be a reduction in dialysis (currently estimated at an annual cost of between \$20,000 and \$30,000) for kidney transplant recipients. However, if the kidney fails at a later date, there might be a need for a second transplant or a return to dialysis.

Although medicare, state medicaid, and private insurance are currently covering a significant portion of transplantation costs, it may take a long time before it will cover experimental surgery such as xenotransplantation. And even if xenotransplantation will be covered by medical insurance, at what cost?

Medicare and state medicaid may provide coverage for a variety of organ transplants; in 1988, about 90 % of kidney transplants were covered through Medicare or state Medicaid programs<sup>20</sup>. We already know that our federally funded health insurance programs are near bankruptcy. Will xenotransplantation cause it to explode? Or will we be forced to substantially increase premiums or even worse, limit other coverages?

Private health insurance in the U.S. will be even more problematic. Costly medical procedures to a limited, select group will continually raise the overall cost of health care, limit insurance coverages, and increase insurance premiums. The result is that more and more people will not find adequate health care services available to them.

The cost simply outweighs the benefit, even given the assumption that the xenografts will be successful without any additional costly side effects. Do we save some patients with expensive medical procedures, and possibly lose even more patients by denying them access to adequate health care?

*Transmission of Infectious Diseases:* The World Health Organization (WHO) in 1996 stated that we are on "the brink of a global crisis in infectious diseases". About 30 infectious diseases are stalking the world today that weren't known 20 years ago including: AIDS, Ebola, Legionnaires' disease, and hantavirus. Infectious diseases killed 17 million of the 52 million people who died in 1995<sup>21</sup>.

Certain diseases jump from animals to humans (zoonosis). Recent health officials in Hong Kong destroyed millions of chickens after a

---

<sup>20</sup> Congress of the United States. Office of Technology Assessment (OTA-H-452), «Outpatient Immunosuppressive Drugs Under Medicare», September, 1991.

<sup>21</sup> World Health Organization (WHO), «World Health Report 1996, Executive Summary», WHO.

virus, A(H5N1), jumped directly from birds to humans<sup>22</sup>. And lately, there has been much publicity over the occurrence of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), a fatal brain-wasting illness that has claimed a number of British humans' lives and which has been linked to mad cow disease (bovine spongiform encephalopathy)<sup>23</sup>.

Xenotransplantation poses perhaps the greatest risk of exposing human populations to non-human primate viruses, and this possibility of transmission of a lethal virus has convinced many researchers to abandon primate-to-human transplants. The most frightening current example of zoonosis is AIDS; over 30 million people worldwide are infected with HIV. Even the Centers for Disease Control (CDC) scientists now acknowledge that HIV "resulted from the adaptation of simian retro viruses introduced across species lines into humans"<sup>24</sup>.

In 1999 the Food & Drug Administration (FDA) published guidelines that effectively called for a "limited" ban on the use of non-human primates in xenografts. The FDA stated that nonhuman primates "raise substantial public health safety concerns" and the "public would be exposed to significant infectious disease risk"<sup>25</sup>.

The concerns over using nonhuman primates as donors has made the pig the "animal of choice" for xenografts. But these will not be normal pigs, they will be transgenic (genetically altered) pigs. There will be attempts to raise them in a sterile environment, but pigs bring a whole new set of problems to the issue of xenosis (viruses transmitted during xenotransplants). Recent findings by researchers in the UK suggest that breeding virus-free pigs will be extremely difficult, if not impossible.

Sensitive molecular probes searched pigs from a range of breeds for copies of two inherited retro viruses, PERV-A and PERV-B (porcine endogenous proviruses), which can infect human cells<sup>26</sup>.

---

<sup>22</sup> Dr. Murray J. Cohen and E. Alix Fano, «Bird Flu' a Warning to Stop Animal Organ Transplants», *The Houston Chronicle*, January 15, 1998.

<sup>23</sup> Alicia Ault, «Brain Grafts Could Pass on Disease - U.S. panel», *Reuters*, October 6, 1997.

<sup>24</sup> Louisa A. Chapman, M. D. et al., «Sounding Board: Xenotransplantation and Xenogeneic Infections», *The New England Journal of Medicine*, Volume 333 (1995), 1498-1501.

<sup>25</sup> Food & Drug Administration (FDA), «Public Health Issues Posed by the Use of Nonhuman Primate Xenografts in Humans», *Federal Register*, April 6, 1999.

<sup>26</sup> Clive Patience et al., «Infection of Human Cells by an Endogenous Retro virus of Pigs», *Nature Medicine*, Volume 3 (1997), 282-296.

All the pigs tested possessed multiple copies of the viruses, 10-23 copies of the PERV-A genes and 7-12 copies of PERV-B genes<sup>27</sup>.

"The existence of 20 to 30 copies per cell will make it very much harder to remove viruses from pig cells", said Dr. Jonathon Stoye of the National Institute of Medical Research in the UK, who led the research project. "It may actually be impossible"<sup>28</sup>. In the lab both viruses infect human cells, but nobody will commit with such little information to whether they will cause disease in people. Dr. Stoye, who wants further investigation before proceeding with pig-to-human transplants, says "We ought to know more about the pathogenic potential of these viruses"<sup>29</sup>.

The "major" study of the transmission of pig viruses was published in August, 1999. It was co-sponsored by Novartis and the CDC and tracked 160 patients in 9 countries exposed to living pig tissue over a 12 year period. It was highly touted as "encouraging" that transplants from pigs may be safe<sup>30</sup>.

Under further examination, the results were not encouraging at all; consider this:

- This was not a controlled study; it was after the fact.
- The study size was only 160 patients and of that, only 14 actually received injections of pig cells.
- It is hardly encouraging to see that PERV can be transmitted from pigs to humans. The tests employed may not even be measuring accurately the number of patients that actually had PERV cells in their system.
- None of these 160 patients actually received tissue from transgenic pigs.
- The number of cells transmitted were much less than in an organ transplant.
- Crucial pieces of information were omitted from the study to make an analysis very difficult.
- The results are at best, inconclusive.

We do know that humans can already acquire approximately 25 diseases from pigs, including anthrax, influenza, scabies, rabies, leptospirosis (which produces liver and kidney damage) and ery-

---

<sup>27</sup> Associated Press, «Pig Organs May Bring Viral Risks», *The New York Times*, October 21, 1997.

<sup>28</sup> Michael Day, «Tainted Transplants», *New Scientist*, October 18, 1997.

<sup>29</sup> Day.

<sup>30</sup> Khazal Paradis et al., «Search for Cross-Species Transmission of Porcine Endogenous Retro virus in Patients Treated with Living Pig Tissue», *Science*, Vol. 285, August 20, 1999.



sipelas (a skin infection)<sup>31</sup>. Historically, the best known example is that of the 1918 influenza epidemic, which killed more than 20 million people worldwide and is now believed to have been a mutated swine virus carried to Europe by U.S. troops<sup>32</sup>.

Professor Frederick Murphy, a virologist at the University of California, has issued a warning about the risk of spreading diseases to humans in proposed transplants of transgenic pig organs. There are 4,000 known virus species, and 30,000 strains and variants that infect living creatures. Trying to identify potentially lethal viruses that might be transmitted to humans during a xenotransplant would be nearly impossible<sup>33</sup>.

The U.S. government intends to protect the public through cumbersome procedures that include screening donor animals for known viruses, constant surveillance of xenotransplant recipients and their contacts, maintaining tissue and blood samples from donor animals and human recipients, and establishing national and local registries of xenograft patients<sup>34</sup>.

Given the scope of xenotransplants expected, the number of patients will, most likely, quickly outstrip the capabilities of the necessary database and the surveillance procedures. As for screening for known viruses, what about the unknown ones? In February, 1998, Australian scientists discovered an unknown virus in pigs. It apparently came from a colony of fruitbats that lived nearby. Once it hit the piggery the virus attacked pig fetuses, which were either stillborn or had defects in the spinal cord and brain. It also infected two human workers, who recovered. "You can't screen for disease agents that you don't know about", said virologist Peter Kirkland<sup>35</sup>.

Earlier this year a new virus emerged that was transmitted to humans, the Nipah viral encephalitis virus. The result was that over 250 humans were infected and many patients had relapses. It killed

---

<sup>31</sup> Alix Fano et al., «Of Pigs, Primates, and Plagues: A Layperson's Guide to the Problems with Animal-to-Human Organ Transplants», *Medical Modernization Committee*.

<sup>32</sup> Fano.

<sup>33</sup> Frederick A. Murphy, «The Public Health Risk of Animal Organ and Tissue Transplantation into Humans», *Science*, Vol. 273, August 9, 1996.

<sup>34</sup> Food & Drug Administration (FDA), «Draft Public Health Service (PHS) Guidelines on Infectious Disease Issues in Xenotransplantation», *Federal Register*, September 20, 1996.

<sup>35</sup> Reuters, «Pig Virus Sparks Fears about Animal Transplants», February 25, 1998.

111 people and led to the mass slaughter of about one million pigs and thousands of dogs, cats, and sheep in Malaysia<sup>36</sup>.

How effective are our current surveillance techniques with an unknown virus? After a new virus is discovered, what can we really do about it? HIV has been known for decades, yet worldwide the AIDS epidemic is getting worse<sup>37</sup>.

The FDA acknowledges the seriousness of an infectious disease risk inherent in xenotransplantation from the comments in their 1999 guidelines:

- "Xenotransplantation may facilitate inter-species spread of infectious agents from animals to the human host..."
- "... the recipient of a xenotransplant is potentially at risk for infection with infectious agents..."
- "Infected xenograft recipients could then potentially transmit these infectious agents to their contacts and subsequently to the public at large".
- "... Infectious agents which result in persistent latent infections may remain dormant for long periods before causing clinically identifiable disease are of particular concern"<sup>38</sup>.

*Other Ethical Considerations:* The ethical considerations seem almost infinite. Let's name just a few extra:

- How far do we go to extend life?
- What criteria will be used in offering someone a human organ or an animal organ for transplant?
- How do we enforce a patient and contact monitoring system?
- How can we have informed consent when the public may possibly be at risk?

---

<sup>36</sup> Alvin Ung, «Tropical Killer Virus in First of Its Kind; Experts Stumped», *Associated Press*, June 5, 1999.

<sup>37</sup> Associated Press, «AIDS Epidemic Worsening, UN Says», *The Globe and Mail*, November 27, 1997.

<sup>38</sup> Food & Drug Administration.

## Just Say No to Xenotransplantation: Consider the Alternatives

We should all be convinced by now that xenotransplantation is not the answer to the perceived shortage of human organs for transplantation. Our first priority should be to reduce the need and we can do that. Before xenotransplantation should be even considered, intensified efforts to reduce the need for transplants and to enlarge the pool of human graft donors need to be adopted. Since we already examined the cost/benefit problem when we significantly increased the number of organ transplants, the enlargement of the human organ donor pool would need to be limited and other alternatives explored. It is a balancing act; reducing the need for transplantation while increasing the supply of organs to a manageable level.

*Improve Human Organ Donor System:* A study by the General Accounting Office in 1998 found that all available methods for increasing the number of potential organ donors had not been considered. They suggested that the number of available organs for transplant may actually be considerably higher than previously indicated<sup>39</sup>.

Many suggestions have been made to increase the supply of organs:

- Aggressive national education and recruitment programs.
- Comprehensive hospital training programs for health care professionals.
- Re-evaluating the criteria used for selection of appropriate donor; consider non-heart beating donors, older donors, etc.
- Market incentives.

*Mandated Choice/Presumed Consent Laws:* Only about 20 % of those individuals who die "healthy" have arranged for their organs to be used to help others. This seems remarkable based on the following 1993 Gallop Poll results measuring public perception:

- 1) 85 % supported the donation of organs for transplant.
- 2) 69 % are very likely or somewhat likely to want to have their own organs donated after their death.

---

<sup>39</sup> General Accounting Office (GAO), «Organ donation: Assessing Performance of organ Procurement Organizations», GAO, April 8, 1998.

- 3) 93 % would be willing to donate a family member's organs if requested before death; only 47 % if *not* discussed before death <sup>40</sup>.

The 1995 results of the most definitive study of our policy regarding organ procurement indicated a significant problem with the reluctance of families to agree to donate a family member's organs. In examining a number of cases in which family members were approached by health professionals, it was found that in only 34 % of the cases the family members agreed to donate organs <sup>41</sup>.

A mandated choice law could be a very effective solution. Under this arrangement everyone would have to make a choice, yes or no—it can be part of a driver's license renewal program where your answer is printed on your license. It is also essential that family members would *not* be able to change your selection. After all, it would hardly be your choice if someone else can change it when you are not able to speak for yourself.

Pennsylvania enacted a mandated choice program which also required hospitals to notify the region organ procurement organization upon each patient's death to determine potential for organ or tissue donation. This immediately increased referrals tenfold. An aggressive education program has also increased public awareness of the need for donors. In the first year of this mandated choice program, more than 820,000 drivers chose to have "organ donor" printed on the front of their licenses beneath their photograph <sup>42</sup>.

A presumed consent law may be the most appealing to increase organ donations. Many countries, especially in Europe, have successfully seen organ donation rates climb dramatically after the passage of this legislation. This law would assume, unless expressed otherwise before death, everyone is a potential organ donor upon his or her demise (minors or the infirm require parental or guardian consent). An opposite wish may simply be communicated in writing.

Presumed consent respects the majority opinion regarding donating organs. Without it, the presumption protects the minority and

---

<sup>40</sup> Richard L. Worsnop, «Organ Transplants: Can the Number of Donors Be Increased?», *CQ Researcher* 5 (no. 30), August 11, 1995: 710.

<sup>41</sup> Laura A. Siminoff *et al.*, «Public Policy Governing Organ and Tissue Procurement in the United States», *Annals of Internal Medicine*, Volume 123/Number 1, July 1, 1995.

<sup>42</sup> «Organ Donations Experience Record Increase», PRNewswire, October 9, 1996.

requires the majority to register their views expressively; an unfair system. Presumed consent shifts the responsibility of a decision about organ donation from the relatives to the individual, respecting his or her right to self determination. Grieving families are spared the stress and trauma of having to make this difficult decision at a time of such loss, especially since their response is often to deny permission, in many cases against the unvoiced preference of the deceased.

*Other Medical Advances:* The development of new surgical techniques to repair malformed or poorly functioning organs could have substantial long-term benefits. Ventricular remodeling is an example of a technique that can reshape a heart and avoid transplantation. Split organ transplants or kidney transplants from live donors are also being used. Bionic hearts and artificial organs are currently being developed.

Very interesting developments are also occurring with genetically engineered cells and tissue engineering. The Seattle Human Islet Transplantation Project has joined seven research facilities to develop human pancreatic islet cells for transplant of patients with diabetes I. The researchers are also working on a method to find a way to grow these cells in culture<sup>43</sup>.

Even more interesting is the possibility of actually growing your own organs. Dr. Michael Sefton of LIFE (Living Implants from Engineering) states, "Our intention is to grow large numbers of replacement hearts, kidneys and livers for transplantation and eliminate the need for a waiting list". He hopes to have a functioning heart available for preclinical testing in ten years<sup>44</sup>.

*Prevention: Let's Take Better Care of Ourselves:* While transplants may offer longer lives to the chronically ill, one form of "medicine" reigns supreme. "I really don't think that transplantation is going to be the answer", says Charles Porter, a Missouri cardiologist. "It's going to be rehabilitation and prevention"<sup>45</sup>. U.S. Representative Jim Moran, D-Va., agrees, pointing out that the nation spends far too much on curing illness and not enough trying to prevent them. "Prevention", he says, "is much less expensive and far more effective"<sup>46</sup>.

---

<sup>43</sup> Carol Smith, «Seattle Research Group Will Try Revised Cell Transplant Technique», *Seattle Post*, August 16, 1999.

<sup>44</sup> Dorsey Griffith, «Future Factory For Body Parts?», *Sacramento Bee*, July 15, 1999.

<sup>45</sup> Alan Bavley, «Doctors Pump Life Into New Ideas for Healing Heart Failure Patients», *San Francisco Chronicle*, December 1, 1996.

<sup>46</sup> Sternberg.

Indeed; most illnesses are preventable. Changes in diet and increasing exercise can reduce blood pressure<sup>47</sup>, heart attacks<sup>48</sup>, and cancer<sup>49</sup>. Unfortunately, most people don't heed the information about prevention that is before them every day. Of the enormous number of dollars spent on health care, only a fraction goes to prevention and control efforts - about 3 % of most state public health department budgets. In 1994, over \$287 million was spent at the state level on prevention efforts aimed at the six leading chronic diseases. This was approximately 0.07 % of the estimated \$425 billion spent annually to treat these same diseases, according to a CDC study<sup>50</sup>.

According to a major study, a diet rich in fruits, vegetables, and low-fat dairy products can reduce blood pressure as much as the most commonly used hypertension drugs, eliminating the need for expensive drugs in many patients with mild hypertension. Widespread adoption of this combination diet could potentially reduce the risk of heart disease by 15 % and the likelihood of stroke by 27 %. "With nearly 50 million Americans having hypertension, and considering the billions of dollars spent each year on blood pressure medications, these findings have important public health considerations", said Dr. George Blackburn, President of the American Society for Clinical Nutrition<sup>51</sup>.

Recently the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) announced that death rates from cardiovascular diseases have plummeted by 60 % since 1950. The contributing factors for the decline are the decrease in smoking, better control of blood pressure, decreases in cholesterol levels, and improved treatments of heart attacks and strokes. Dr. Gilbert Omenn, Executive Vice President for Medical Affairs at the University of Michigan, predicted "that diseases like cancer, arthritis, Alzheimer's disease, gastro-intestinal diseases, and psychiatric diseases will be controlled, not by a wonder drug like a penicillin that cures patients, but by a mixture of preventive measures and treatments, some of which will involve changes in diet and behavior..."<sup>52</sup>.

---

<sup>47</sup> Thomas H. Maugh II, «Study: Eat Right, Cut Blood Pressure», *The Sacramento Bee*, April 17, 1997.

<sup>48</sup> Geoffrey Cowley, «The Heart Attackers», *Newsweek*, August 11, 1997.

<sup>49</sup> Brigid Schulte, «Cancer Study Says Bad Food is not Key; Diet and Exercise Are», *Contra Costa Times*, October 12, 1997.

<sup>50</sup> «Chronic Disease Costs Could Soar».

<sup>51</sup> Thomas H. Maugh II, «Study: Eat Right, Cut Blood Pressure», *Los Angeles Times*, *The Sacramento Bee*, April 17, 1997.

<sup>52</sup> *New York Times*, «Death Rate for Heart Disease Cut Dramatically in the Past 50 Years», *San Francisco Chronicle*, August 6, 1999.

The Harvard School of Public Health spent three years reviewing 4,500 scientific studies worldwide on nutrition and cancer. The fifteen member team led by Dr. Walter C. Willett concluded that between 30 % and 40 % of *all* cancers could be avoided by changing lifestyles and eating habits. The bottom line:

- Eat a plant-based diet.
- Maintain a moderate weight throughout life.
- Get some exercise<sup>53</sup>.

More education in health maintenance and disease prevention has proven to be the most effective use of research dollars, but our system still spends most of our precious research dollars on curing diseases.

## Summary

The wholesale adoption of xenografts, using organs from genetically altered pigs, if successful, will generate enormous profits for the pharmaceutical industry, for the bioengineering firms that supply the pigs, and for the medical professionals involved. Because of the tremendous private investment from venture capital groups and large drug companies, the pressure to get approval for xenotransplantation is enormous. After all, it's all about money. Good for industry, bad for the consumer. Are we placing profits ahead of public health?

Xenotransplantation is not the answer, despite all the rosy pictures over-optimistic researchers, genetic engineers, and pharmaceutical companies, paint of readily available organs. We cannot continue to cure human lives by the wholesale taking of animal lives. We cannot deny health care to others simply because where they live or their financial condition prevents them from having access to adequate health care. We must learn to take better care of each other, by becoming organ donors, and better care of ourselves, through diet and exercise.

---

<sup>53</sup> Brigid Schulte, «Cancer Study Says Bad Food is Not Key: Diet, Exercise Are», *Knight-Ridder Newspaper*, Contra Costa Times, October 2, 1997.





**NUFFIELD COUNCIL ON BIOETHICS  
ANIMAL-TO-HUMAN TRANSPLANTS:  
THE ETHICS OF XENOTRANSPLANTATION,  
UNITED KINGDOM (MARCH, 1996)**

In response to the 1995 announcement by Imutran Ltd. to sponsor the first xenografts of transgenic pig hearts into human patients in 1996, The Nuffield Council in the United Kingdom established a Working Party to study xenotransplantation. In March 1996 they issued their report *Animal-to-Human Transplants: The Ethics of Xenotransplantation*.

Although this report discussed most ethical areas concerning xenotransplantation, it appeared that they concluded early in the process that xenotransplantation was necessary for solving the organ donor shortage dilemma. They accepted the principle that "in some cases, the saving of human life or of significantly enhancing its quality may justify a certain amount of animal suffering, provided this is kept to a minimum". This led them to dismiss the alternatives to xenotransplantation without full consideration.

**Conclusions and Recommendations of the Nuffield Council of Bioethics**

- There is a prospect that xenotransplantation may be able to supplement significantly the present inadequate supply of human organs - both to save life and to improve the quality of life; but complex questions of ethics and serious problems of safety need to be resolved.
- In view of the potential benefit to patients, whose needs cannot at present be effectively met in other ways, the breeding of pigs to supply organs for xenotransplantation would be ethically justifi-

fied. There are strong reasons for using pigs rather than higher primates for this purpose.

- There is an immediate need to establish an Advisory Committee on Xenotransplantation for the purpose of assessing the potential public health risks from infectious organisms of animals; establishing the essential precautionary measures prior to any clinical human trials; and protecting the interests of the patients who receive xenografts.
- Once all the necessary safeguards have been set in place, xenotransplantation may be offered to suitable patients. Strict ethical procedures relating to consent should be followed, and patients unwilling to consent to xenotransplantation should not be disadvantaged in any way. Should xenotransplantation become introduced into clinical practice, its impact on individual patients should be the subject of research.

**XENOTRANSPLANTATION: SCIENCE, ETHICS AND  
PUBLIC POLICY INSTITUTE OF MEDICINE (IOM)  
NATIONAL ACADEMY PRESS: WASHINGTON  
(JUNE, 1996)**

The IOM organized a group of doctors and professors to study public policy relating to xenotransplantation, especially as it pertains to public health. In June 1996 they issued their report *Xenotransplantation: Science, Ethics, and Public Policy*.

This report laid the groundwork for moving ahead with xenotransplantation despite the enormous infectious disease problem. The Committee found "*that, although the degree of risk cannot be quantified, it is unequivocally greater than zero*". This frightening measurement did not stop them from concluding that "the potential of xenotransplantation is great enough to justify funding, by federal agencies, private industry, and other sources, of research and other programs necessary to minimize the risk of disease transmission".

**Conclusions and Recommendations of the Institute of Medicine (IOM)**

Recommendation 1: The committee recommends that guidelines for human trials of xenotransplantation address four major areas: (1) procedures to screen source animals for the presence of infectious organisms and consideration of the development of specific pathogen-free animals for use in xenotransplants; (2) continued surveillance throughout their lifetimes of patients and periodic surveillance of their contacts (families, health care workers, and others) for evidence of infectious diseases; (3) establishment of tissue banks containing tissue and blood samples from source animals and patients; and (4) establishment of national and local registries of

patients receiving xenotransplants. Special efforts should be made to coordinate with international registries and databases.

**Recommendation 2:** The committee recommends that adherence to specific national guidelines be required of all experimenters and institutions that undertake xenotransplantation trials in humans. Local institutional review boards and animal care committees, in consultation with outside experts, are appropriate vehicles for review of proposed protocols, provided that they are required to conform to the national guidelines for minimizing and for continued surveillance of infectious risks.

**Recommendation 3:** The committee recommends further investigation into the special ethical issues that are raised by xenotransplantation, particularly those related to informed consent in light of the requirement for lifetime surveillance of patients and those related to fairness and justice in allocating organs, as well as research into the psychological and social impact of receiving animal organs on recipients, their families, and members of the society as a whole.

**Recommendation 4:** The committee recommends that a mechanism be established within the Department of Health and Human Services to ensure needed coordination of the federal agencies and other entities involved in development, oversight, and evaluation of established guidelines.

**Recommendation 5:** The committee recommends that, when the science base for specific types of xenotransplants is judged sufficient and the appropriate safeguards are in place, well-chosen human xenotransplantation trials using animal cells, tissues, and organs would be justified and should proceed.

## **DRAFT PUBLIC HEALTH SERVICE (PHS) GUIDELINE ON INFECTIOUS DISEASE ISSUES IN XENOTRANSPLANTATION (AUGUST, 1996)**

On September 20, 1996 the Department of Health and Human Services (HHS) released proposed guidelines for xenotransplantation - the transplantation of animal organs and tissues into humans. HHS aimed the guidelines at reducing public health risks while not impeding medical innovation. The guidelines were developed collaboratively by the Food and Drug Administration (FDA), the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), and the National Institutes of Health (NIH).

Their recommendations include:

- Taking appropriate safety measures to screen animals for diseases-zoonosis.
- Archiving biological samples from the source animal and transplant recipient.
- Expanding transplant teams for specific expertise and conducting appropriate research.
- Having local review boards evaluate infectious disease risks.
- Monitoring patients after xenotransplants for infectious disease agents.

These guidelines pave the way for a potential public health disaster. They warn that infectious agents "may not produce clinically recognizable disease until many years after they enter the host and some infectious agents are not readily detected or identified in tissue samples by current diagnostic techniques". They add that "the

full spectrum of infectious agents potentially transmitted via xenograft transplantation is not well known. Infectious agents that produce minimal symptoms in animals may cause severe morbidity and mortality in humans". To make us feel even more nervous they use the example of AIDS/HIV to demonstrate that "persistent viral infections may result in person to person transmission for many years before clinical disease develops..., thereby allowing an emerging infectious agent to become established in the susceptible population before it is recognized".

With the estimate by the IOM of over 100,000 xenotransplants annually, the surveillance system being established to protect the public is not financially or physically possible. In addition it occurs *after* the xenotransplant occurs - when it may be too late. The suggestion that local medical center review boards can monitor xenotransplantation surgical protocols (including surveillance guidelines) to keep them consistent is unworkable.

The Nuffield report suggested that nonhuman primates *not* be used as source animals because of their high degree of infectious disease risk, but these guidelines felt this was not important - despite the warnings of prominent virologists and veterinarians. The Nuffield report also was slowing down the process and insisting on a national board to provide oversight. The HHS seems interested in accelerating the process and pushing as much of the oversight as possible down to the local levels - a very poor decision.

## **FOOD & DRUG ADMINISTRATION (FDA) GUIDANCE DOCUMENT "PUBLIC HEALTH ISSUES POSED BY THE USE OF NONHUMAN PRIMATE XENOGRAFTS IN HUMANS" (APRIL, 1999)**

This document was released to "limit" the use of nonhuman primates as organ donors because of their public health risk. Unfortunately, they did not ban further scientific research and evaluation of nonhuman primates. The failing of this document is that it did not do the following:

- Completely ban the use of both nonhuman primates and pigs from clinical xenograft trials.
- Recognize that no further scientific research and evaluation is necessary - the risk is too great.
- Call for a significant increase in public discussion on allocation of health care resources, effects on private and federally funded health insurance programs, research priorities, and alternatives to xenotransplantation.

In preparing these guidelines, the FDA reviewed the scientific literature, reviewed public comments on the 1996 draft guidelines, and consulted with other appropriate federal agencies.

### **FDA Conclusions**

- 1) The use of nonhuman primate xenografts raises substantial public health safety concerns.
- 2) Current scientific data indicates that human transplant recipients, their close family, and the public at large would be ex-

posed to significant infectious disease risk by the use of nonhuman primate xenografts.

- 3) Further scientific research and evaluation is needed to adequately assess the risk and potentially reduce the risk posed by nonhuman primate xenografts.

### **FDA Determinations**

- 1) A federal xenotransplantation advisory committee should be established to make recommendations to the Secretary of HHS.
- 2) Clinical protocols proposing the use of nonhuman primate xenografts should not be submitted to the FDA until sufficient scientific information exists addressing the risks posed by nonhuman primate xenografts.
- 3) There is not sufficient information to assess the risks posed by nonhuman primate xenotransplantation. It will be necessary for there to be public discussion before these issues can be addressed.

### **Xenotransplantation Resources**

#### *Animal Protection Institute (API)*

2831 Fruitridge Road  
Sacramento, CA 95820  
U.S.A.  
916-731-5521  
916-731-4467  
ahberger@earthlink.net  
www.api4animals.org

#### *Campaign for Responsible Transplantation (CRT)*

P.O. 2751  
New York, NY 10163  
U.S.A.  
212-579-3477  
alixfano@mindspring.com  
www.crt-online.org

Publication: "Of Pigs, Primates and Plagues: A Laymen's Guide to the Problems With Animal-to-Human Organ Transplants", 1997.



*Compassion in World Farming (CIWF)*

Charles House, 5A Charles Street

Petersfield, Hampshire GU32 3EH

U.K.

44 (0)1730 264208

44 (0)1730 260791 FAX

compassion@ciwf.co.uk

WWW.ciwf.co.uk

Publication: "Animal Organs in Humans: Uncalculated Risks & Unanswered Questions" (Jointly produced with the British Union for the Abolition of Vivisection), 1998.



# **CLONING: CELLULAR REQUIREMENTS AND BIOLOGICAL CONSTRAINTS**

*Robert M. Moor*

The Babraham Institute, Babraham, Cambridge, UK

*Giovanna Lazzari and Cesare Galli*

Laboratorio di Tecnologie della Riproduzione, Cremona, Italy

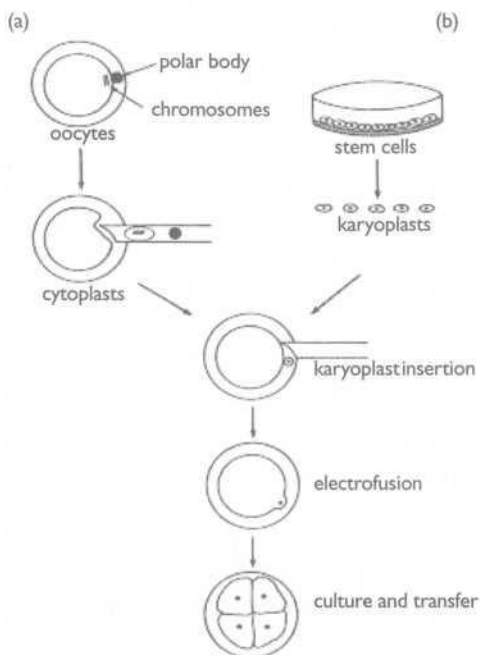


## Introduction

The completion in oocytes of a single reduction division followed by the introduction of a haploid sperm nucleus at fertilisation forms the basis of sexual reproduction in animals. All current cloning procedures follow as closely as possible this form of natural nuclear transplantation excepting that a diploid nucleus is transferred to the oocyte cytoplasm rather than a conventional haploid sperm nucleus (*Figure 1*). To compensate for the diploid chromosome load, experimental cloning procedures incorporate techniques for the removal or destruction of the eggs' haploid set of chromosomes to avoid triploidy in the reconstructed embryo. The mechanisms that modify and thereafter finally enable the newly inserted nucleus to direct embryonic development reside exclusively within the cytoplasm of the oocyte. It is therefore on the oocyte and on its cytoplasmic machinery that the biological focus of cloning should invariable be directed. Furthermore, it is by understanding the oocyte and its limitations that an appreciation of the biological constraints on human cloning can most readily be obtained.

An appreciation of the history of nuclear transplantation in vertebrates is necessary to understand the context in which the present debate on the ethics of cloning is being conducted. The motivation for the pioneering work on nuclear transplantation was to answer one of the central questions about cell differentiation and early embryonic development. It was believed by one set of biologists that as cells differentiated into their various specialised forms (eg skin or brain cells) all genes that are not required for the final differentiated function of the cell would be lost or irreversibly repressed (Briggs and King, 1957). The alternative idea was that all

**FIGURE I**



Diagrammatic representation of the cloning procedure. Oocyte cytoplasts are prepared by enucleating metaphase II oocytes (Fig. 1a) while karyoplasts can be prepared from a range of embryonic, stem or somatic cells (Fig. 1b). Embryo reconstruction is carried out by fusing (or injecting) the karyoplast and cytoplast.

genes are present in all nucleated cells; during differentiation different gene sets would be activated or reversibly suppressed depending on the cell lineage involved. The experiments of Gurdon and colleagues almost 40 years ago established definitively that cell differentiation involves the selective activation and repression of genes rather than their loss or permanent inactivation (see Gurdon, 1977 for references). Moreover, Gurdon's work showed that clones of genetically-identical frogs could be made and that fertile adult animals could be produced from differentiated somatic cell nuclei taken from the intestine of tadpoles. Both Gurdon's group and others showed later that nuclei from fully differentiated cells from adult frogs could be transplanted and would produce feeding tadpoles but none of these developed into adult animals (Gurdon *et al.*, 1975; DiBerardino *et al.*, 1984). The recent work of Wilmut and colleagues has completed this cycle of experiments by showing the nuclei of cells from adult sheep are capable, after transplantation, of giving rise to cloned animals that mature into fertile adult animals (Wilmut *et al.*, 1997). For the purpose of the

present review we shall focus primarily on mammals and use the term *successful cloning* to indicate the development of a reconstructed egg into a living adult. We shall refer to three categories of cells: firstly, *germ cells* and *somatic cells* whose respective contribution to the germline and somatic tissues is unambiguous. Secondly, the term *embryonic cells* will refer to all those uncommitted cells such as blastomeres, inner cell mass (ICM) and embryonic stem (ES) cells that may contribute to either the soma or germline.

### Growth of the Mammalian Oocyte

The population of oocytes in mammals including humans is both small and highly regulated (Gosden and Telfer, 1987). For example, the human female produces a single fully developed oocyte each month; indeed less than 400 such oocytes will be produced in the women's entire life. Not only are oocyte numbers limited, but excepting for all but a few hours before ovulation, these germline cells are either devoid of the molecules required to sustain development or contain the molecules but in a form that is incompatible with normal development. The production of a fully developed oocyte with the capacity to support normal development after fertilisation (or nuclear transplantation) is dependent on an integrated series of events which begin in early fetal life when mitotic activity in the germcell population ceases. At this point each germcell becomes associated with a small number of pre-granulosa cells, forms a primordial follicle, enters meiosis and proceeds to the diplotene stage of prophase where cell cycle progression is arrested. Primordial follicles constitute the store from which preantral follicles begin to grow under the influence of autocrine and paracrine factors. By the time puberty is reached the primordial oocyte pool has been reduced to less than a million oocytes. A small fraction of the primordial follicle store is continuously recruited into the growing pool; once initiated, growth is continuous until terminated by ovulation for the single selected follicle and atresia for all the remaining cohort of antral follicles (Webb *et al.*, 1999).

Preantral development is a protracted process taking several months to complete. However, it is during this phase that the oocyte increases over 200 fold in volume and acquires its specialised structures such as the zona pellucida. Intense transcriptional activity in the growing oocyte results in the synthesis of two forms of mRNA. The first of which is utilised directly to support cell growth while the second form is complexed with ribonucleoproteins (RNPs) and stored in the cytoplasm as masked mRNA. In addition to its binding to RNPs, this mRNA is further complexed

to specific RNA binding proteins which interact with cis-acting sequences in the 3'N untranslated region of masked messages. It is through the ordered utilisation of this stockpile of masked mRNA that the fully grown oocyte develops the competence during maturation to direct and support the ensuing processes of fertilisation and early embryonic development (Davidson, 1986).

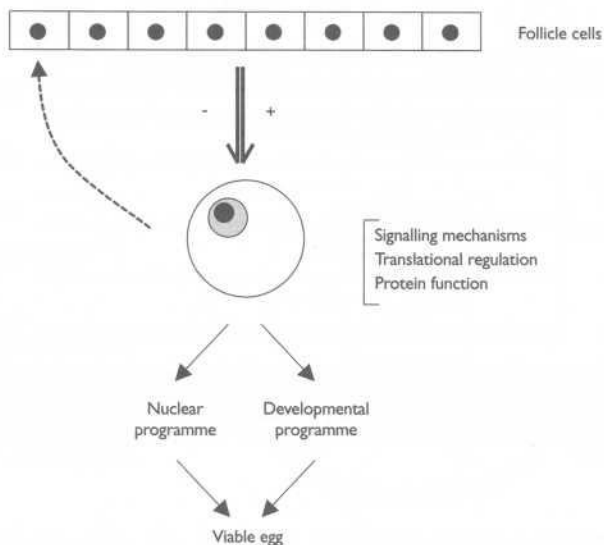
### The Fully Grown Oocyte

Once oocytes have grown to full size they possess the full complement of stored molecules required for development. The oocyte within the follicle selected for ovulation will resume meiosis and complete the molecular programme associated with maturation. The small but variable number of other follicles containing fully grown oocytes will undergo atresia. If exogenous gonadotrophic hormones are administered these supernumerary follicles are rescued and develop to ovulation: this provides the basis for the induction of multiple ovulation (Webb *et al.* 1999).

The acquisition of meiotic competence during maturation is initiated by the surge of gonadotrophins released by the pituitary at the beginning of the preovulatory period. However, the oocyte is poorly endowed with receptors and responds primarily to signals generated from the follicle cells (Figure 2). These follicular signals initiate and drive to completion the two separate but parallel processes of meiotic cycle progression and cytoplasmic differentiation. It is only when both maturational programmes are completed in an error-free and integrated manner that the oocyte becomes developmentally competent. This process of maturation can be induced *in vitro* in some species, but in other species including the human maturation *in vitro* almost always results in the completion of only the meiotic and not the cytoplasmic component of the maturation process (Moor *et al.* 1998). We will show that the current limitation on the production of developmentally competent oocytes in humans provides one of the most severe biological limitations to human cloning. It is therefore relevant to consider the requirements and intracellular mechanisms underlying full oocyte maturation.



FIGURE 2

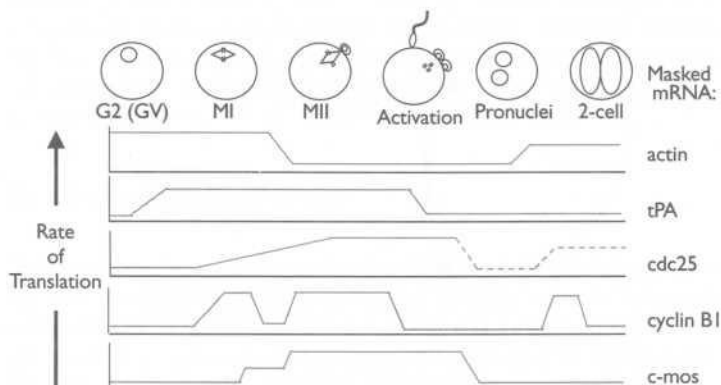


Follicle cells in antral follicles inhibit (-) oocyte maturation until the preovulatory period when gonadotrophic hormones induce the secretion of stimulatory (+) signals. The response of the oocyte to the stimulatory signals affects both the cell cycle (nuclear program) and the developmental program in a parallel but independent manner. The completion of both programs is necessary to produce a viable egg.

## Molecular Events Underpinning Oocyte Maturation

Almost every component of the oocyte is modified during the maturation process. Changes to the nuclear membrane alter its transport characteristics: intercellular transport via gap-junctions is reduced while carrier-mediated transport across the plasma membrane is increased. Maturation changes within the oocyte include the relocation of organelles, the disassembly of the nucleolus and nuclear membrane and the resumption and progression of the meiotic cycle to metaphase II. Molecular changes are centred around the selective mobilisation of stored mRNA together with the resultant changes in protein synthesis. An example of the complexity of these molecular changes is presented in *Figure 3*. It is evident from this figure that each class of stored mRNA has its own unique pattern of expression that varies both with respect to when translation occurs and to what level translated proteins are produced. In addition to the regulation of the timing and level of expression, it is now clear that the precise localisation of proteins

FIGURE 3



The complex series of translational patterns generated by mobilising different classes of masked mRNA at different stages during oocyte maturation and early embryogenesis. It will be observed that masked (stored) mRNA is not universally mobilised at one time but is instead subjected to a form of translational control in which each mRNA class is mobilised at a unique time and in a unique pattern.

to different positions within the oocyte is also of crucial importance to the maturation of the oocyte.

None of the complex series of molecular events associated with oocyte maturation are under conventional nuclear control. Instead, control is exerted by a cascade of events, initiated by signals from the follicle cells and frequently mediated via RNA binding proteins associated with the stored transcripts. An example of one of these regulatory cascades is illustrated in *Figure 4*. The diagram shows how the synthesis of a protein occurs as a result of the action of a variety of signals from the follicle cells and extracellular matrix. These signals activate receptors on the oocyte membrane which in time initiate a cascade of intracellular signals which ultimately act on specialised mRNA binding proteins and on sequences in the 3'N untranslated region of the masked messages (Hake and Richter, 1997).

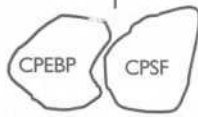
It is only after the completion of every component of the maturation process that the oocyte becomes competent to support fertilisation and embryonic development. Any failures in the maturation process are associated with developmental lesions and embryonic death. Further, in humans only one oocyte each cycle is programmed to complete this intricate series of differentiation events. Once these events are completed the mature oocyte remains viable for a few hours only. Finally, it is this single mature germline cell alone that has the capacity to reprogramme a

## FIGURE 4 Translational Regulators

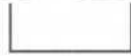
A Cis regulators

5' [ ] CODING [X] CPE's [X] AAUAAA [X] AAA 3'

B Trans-regulators



C Signal transduction



D Receptor function



E Signal identification

- Source
- Nature
- Action

The regulatory cascade progressing upstream from the cis-acting regulatory elements in the 3'N untranslated region of stored mRNAs (A) to the trans-acting regulatory proteins (B) and then via uncharacterised signal transduction systems (C) to oocyte membrane receptors (D) and finally to intrafollicular signals (E). Many details of this regulatory cascade including the source, nature and action of the intrafollicular signals are poorly characterised.

differentiated nucleus back to a fully totipotent form: moreover, this reversal of differentiation represents the central and only wholly exceptional event of the entire cloning procedure.

## Modifying the Mature Oocyte for Nuclear Transplantation

The mature oocyte is subjected to three different manipulative procedures during its transformation into a cloned embryo. Firstly, its haploid set of chromosomes is removed or destroyed by microdissection or ultraviolet irradiation to produce a chromosome-free cytoplasm. Secondly, a foreign nucleus is inserted into the cytoplasm by direct microinjection or by cell fusion. The fusion process is most commonly effected by the use of an electric pulse but chemical and viral induced fusion processes have also been used. While the above two processes are merely technical and

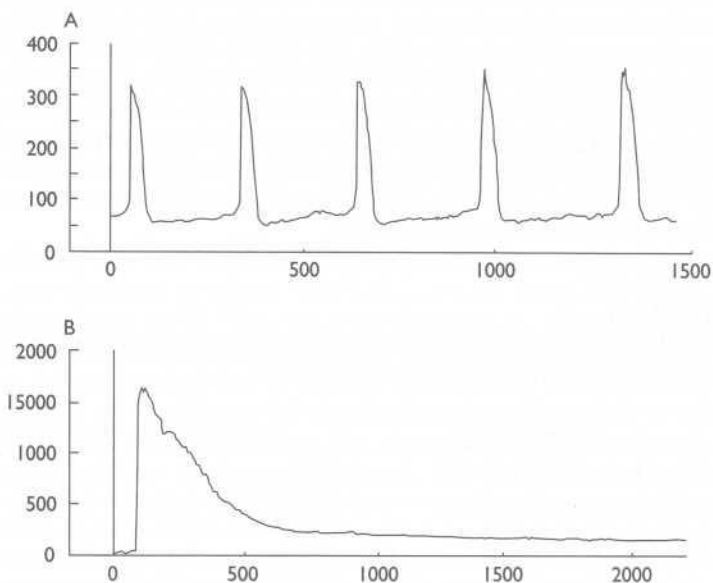
merit no further discussion, the third process of oocyte activation is a biological imperative irrespective of whether nuclear insertion occurs naturally at fertilisation or by artificial nuclear transfer.

In all mammals the entry of the sperm activates a new programme of development by increasing both the cytoplasmic free calcium  $[Ca^{2+}]_i$  and intracellular pH levels in the egg. The mechanism by which these changes are initiated is still unresolved and involves either the release of soluble sperm factors after gamete membrane fusion or the induction of the inositide signalling pathway within the oocyte (Swann, 1996). That the consequence of the activation signal is the induction of a prolonged series of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in the egg is, however, universally accepted (Figure 5). Moreover, results from a number of laboratories demonstrate that the intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations induced at activation are an essential stimulus for normal embryogenesis. In addition to driving the newly fertilised egg through the final stages of meiosis and into mitosis, the activation process also redirects protein synthesis by altering the pattern of mobilization of stored mRNA. Current methods of artificial activation after nuclear transplantation involve chemical or electrical procedures whose effect is to induce an intracellular calcium release in the newly reconstructed egg. However, none of the methods yet devised provide an activation stimulus which mimics exactly that induced at fertilization. All current artificial activation systems differ from sperm-mediated activation both with respect to the number of calcium spikes induced and the duration and amplitude of each individual calcium transient (Figure 5). The extent to which imperfections in the activation system contribute to the high level of embryonic death after nuclear transplantation is still unclear.

## **Cell Cycle Synchronisation and Developmental Potential**

Immediately before sperm entry the oocyte is in meiotic arrest at the metaphase II stage of the cell cycle and contains exceptionally high concentrations of fully activated MPF kinase (cdk1) in its cytoplasm. The formation of a normal embryo after fertilisation depends on the development of both a female and male pronucleus; each pronucleus has specialised requirements for its formation. Development of the female pronucleus is initiated at activation when  $Ca^{2+}$  released from intracellular stores initiates MPF degradation, the resumption of meiosis, the expulsion of the second polar body and the reassembly of the nuclear membrane. The penetrating sperm, by contrast is in a highly condensed  $G_0$ -like state at fertilization and responds to the oocytes' changing molecular envi-

FIGURE 5



A comparison of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients induced in porcine eggs induced by sperm penetration (A) and electroactivation (B). Attention is drawn to the differences in spiking frequency, amplitude and shape of the calcium transients in fertilised as compared with artificially activated eggs.

ronment by undergoing decondensation before forming the male pronucleus and entering S-phase in synchrony with its female counterpart.

During cloning the response of the foreign nucleus to the oocyte cytoplasm is determined by two separate forces. The first force originates in the oocyte and affects the foreign nucleus in two entirely different ways depending on whether nuclear insertion occurs before or after activation. Foreign nuclei inserted in oocyte cytoplasm before activation when MPF levels are high undergo nuclear membrane disassembly and premature chromatin condensation. By contrast nuclei inserted after activation remain intact and their chromosomes do not condense. The second important determinant is that of the cell cycle stage of the donor nucleus itself. This is particularly significant when donor nuclei are inserted into oocyte cytoplasm before activation because of the high probability of resultant chromosomal disorder. For example it is known that the chromosomes of an S-phase donor nucleus are pulverised during premature chromatin condensation in an M-phase cytoplasm. By contrast, G2-phase chromosomes in a donor nucleus withstand

premature condensation but immediately thereafter re-enter S-phase and become polyploid. The only three possible successful combinations that exist when using cytoplasts before activation are shown in *Table 1*. This table also shows that a much wider range of potentially successful cell cycle combinations exists when cytoplasts are activated before nuclear insertion. It has been because of the greater adaptability of post-activated (G1-) cytoplasts that these have been extensively used in the past as recipient cells for transplanted pronuclei, blastomeres and nuclei from undifferentiated cells of frogs and mammals.

**TABLE 1**  
**Nucleus-Cytoplasm Combinations Compatible with**  
**Subsequent Embryonic Development**

Cytoplasm State	Compatible Donor Nuclei
Pre-activation (MII cytoplasm)	M-phase G1-phase G0-phase
Post-activation (G1-cytoplasm)	G1-phase S-phase G2-phase G0-phase

### **De-differentiation, Remodelling and** **Reprogramming of Somatic Cell Nuclei**

The recent use of differentiated somatic cell nuclei for transplantation has imposed additional demands on the cytoplasm of newly reconstructed eggs. The first requirement when a fully differentiated nucleus is transplanted into an oocyte-cytoplasm is that it should be rendered transcriptionally inactive. This inactivation occurs rapidly in an MII cytoplasm (pre-activation) but transcription is not effectively inhibited in cytoplasts after activation (post-activation). Furthermore, preliminary evidence indicates that the ensuing process of re-establishing the temporal, spatial and quantitative patterns of transcription required for embryonic development is also most effectively induced by M-phase cytoplasts (Campbell, 1998). The insertion of G<sub>0</sub>-phase nuclei into non-activated MII-phase cytoplasts appears to satisfy both the cell cycle and nuclear remodelling requirements in reconstructed oocytes. A strong, but as yet unproven, possibility exists that the G<sub>0</sub> nucleus has the further advantage that it is more readily reprogrammed because of its specialised chromatin structure and other characteristics. Chromatin modifications that occur during the G<sub>0</sub> phase were

first described by Whitfield and colleagues (1985) and have recently been re-examined by Wilmen and Hegemann (1996). These workers showed that  $G_0$  chromatin in *Saccharomyces Cerevisiae* exhibits cell-cycle specific centromeric features which are induced by structural arrangements within the centromeric complex. However, it must be emphasised that  $G_0$  cells are characterised not only by chromatin modifications but also by many other important changes, any one of which might make these cells especially suitable for nuclear transplantation.

Starting with the membrane, both potassium channel activity and cell membrane potentials differ between cells in  $G_0$  and S-phase (Strobl *et al.*, 1995). The shift in the electrical activity of the membrane from a depolarised state in  $G_0$  cells to a hyperpolarised state in S-phase is paralleled by marked differences in the responsiveness of the membrane to electrostimulation (Djuzenova *et al.*, 1994). These workers report that electropulsed  $G_0$  cells not only tolerate higher field strengths than S-, G<sub>2</sub>- to M-phase cells but show a greater capacity for membrane resealing. At an intracellular level  $G_0$  cells differ from others, not only with respect to their ionic balances, but also in regard to gene expression and nuclear sensitivity to UV irradiation. An important ionic difference is reflected in the fact that intracellular calcium ion concentrations ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in  $G_0$  cells are lower than at other stages (Xue *et al.*, 1993). Secondly,  $G_0$  epithelial cells do not express calcium binding protein (E CaBP) whereas expression is detected at other cell cycle stages (Rizbrabin and Pavlovitch, 1993). In addition  $G_0$  cells either fail to express or exhibit differential regulation of a variety of proteins including retinoblastoma (RB) protein keratin-associated protein (KAP85), topoisomerase II  $\alpha$  and  $\beta$ , proliferation-associated nuclear antigen (Ki-S1) and the 57 Kda nuclear protein referred to as statin (Martinez *et al.*, 1993; Chou *et al.*, 1994; Gieseler *et al.*, 1993; Kreipe *et al.*, 1993; Gelsleichter *et al.*, 1995).

### **Embryonic Development, Fetal Death and Postnatal Problems in Cloned Animals**

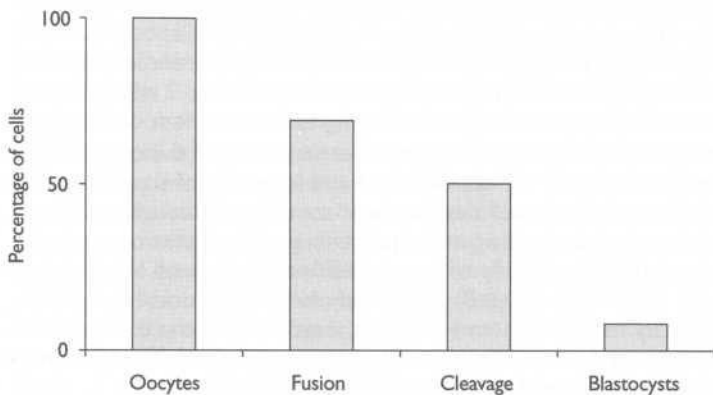
A wide range of nuclei from embryonic, fetal and adult sources have now been used for nuclear transplantation in mice, rabbits, sheep and cattle. Since results from the bovine are probably the best characterised and most extensive of any species we shall use these to highlight a number of important features about cloning. Three central questions must be asked about any potentially new technology in the biomedical field: is it effective, is it safe and is it ethically acceptable? I shall address the first two of these questions and leave the third to more qualified participants. That young can

be produced by nuclear transplantation from a wide range of donor nuclei obtained from embryos, stem cells, fetuses and adults is clear (see Wells *et al.*, 1999). However, the extremely low rate of development to birth, the high incidence of fetal death and the postnatal physiological abnormalities associated with cloning are all of very serious concern.

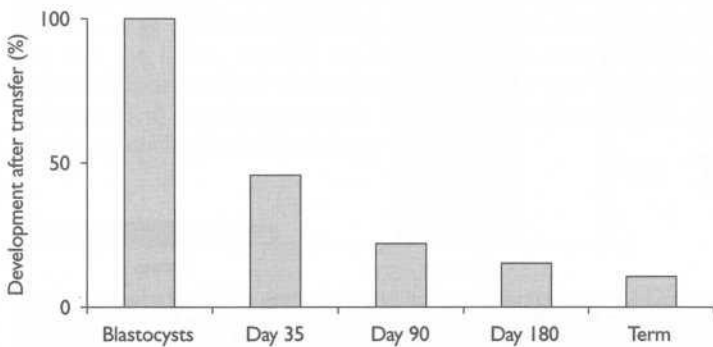
The efficiency of bovine cloning is summarised in *Figures 6 and 7*. Over 4,000 bovine oocytes have been used to reconstruct embryos using donor nuclei from stem cells, fetuses, calves and cows (*Figure 6*). A relatively high percentage of those donor nuclei (69 %) have been successfully introduced into their host cytoplasts. When calculated as a percentage of those that fused successfully over 73 % cleaved and 12 % developed to blastocysts. More than 300 blastocysts have been transferred to the uteri of host females (*Figure 7*). Approximately 46 % of the blastocysts survived to viable fetuses on day 35 of pregnancy and 11 % survived to term. By combining all the data from *Figures 6 and 7* it is apparent that less than 1 % of the original  $4.5 \times 10^4$  oocytes used for bovine somatic cell cloning developed into full term viable offspring. These low rates of survival do not differ significantly from those obtained in the other species so far studied and underline a number of key points about cloning. The first point to emphasise is that cleavage of reconstructed embryos cannot be used as a guide to their long-term viability; only 1 % of cleaved embryos developed into viable young in the bovine. The second key point is that only 10 % of apparently perfect blastocysts develop to term; although many of the transferred blastocysts implant and undergo early development, losses in the first and second trimester are particularly high.

In addition to the high rates of late fetal loss, considerable concern has also recently been expressed about the physiological status of the surviving cloned offspring. Justification for these concerns has been provided by the fact that 18 % of cloned bovine young die within a few days of birth (Garry *et al.*, 1996). These workers have carried out a detailed analysis of 40 calves produced by transferring blastomere nuclei into oocyte cytoplasts. All the nuclear-transplant calves in that study were produced by caesarean section carried out at the start of parturition to avoid complications during natural birth. Physiological abnormalities of sufficient severity to warrant medical intervention were observed in 85 % of the neonates within an hour of birth. These abnormalities included hypoxemia, hypoglycaemia, metabolic acidosis and hypothermia. Fifteen percent of calves died within the first 14 weeks of bacterial infection. It is furthermore of importance to note that in a separate study gross placental disorders were observed in 40 % of cloned calves delivered by caesarean section (Wells *et al.*, 1999).



**FIGURE 6**

Proportion of bovine oocytes ( $n = 4498$ ) undergoing development to the blastocyst stage after fusion to a variety of somatic nuclei from fetal and adult bovine cells.

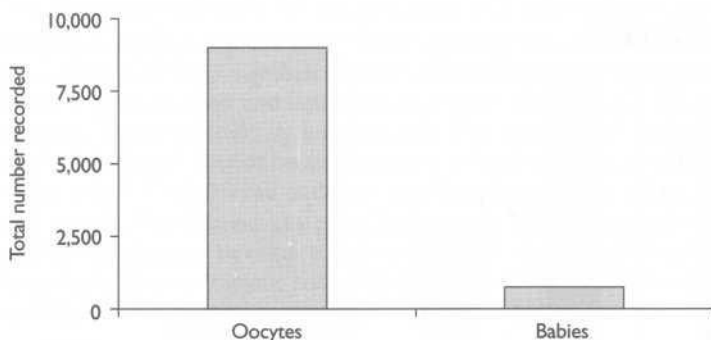
**FIGURE 7**

Proportion of 308 reconstituted bovine blastocysts (8% of reconstituted embryos develop to blastocysts) that survive to full term (day 285) after transfer to the uteri of surrogate cows.

## Cloning: The Human Dimension

It will be apparent from the work outlined above that cloning in humans would be neither effective nor safe for mother and infant respectively. Moreover, the demand for large numbers of fully matured oocytes (at least 100 per baby produced) and for a large number of surrogate mothers willing to suffer mid-term abortions and potential fetal abnormalities in surviving infants (1 in 10 transferred blastocysts result in a live birth) makes human cloning biologically impractical as well as ethically unacceptable. The provision

of sufficient numbers of fully matured oocytes for any projected human cloning enterprise serves as an example of the impracticality of the venture. Firstly, human oocytes cannot yet be matured *in vitro* except in rare instances. Secondly, using current *in vivo* maturation protocols most IVF clinics aspirate between 2 and 5 oocytes from the ovaries of a patient during each treatment cycle (Moor *et al.*, 1998). It is, moreover, evident that many of the oocytes that are produced by IVF are defective and incapable of supporting fertilization and normal development to term. Although no agreement exists about the precise percentage of aspirated oocytes that are viable it is unlikely to exceed 25 % and may well be considerably lower (see Figure 8). Since only fully viable oocytes have the capacity to reprogramme a transplanted nucleus the total number of aspirated oocytes required for each baby produced by cloning might be expected to be around five hundred.

**FIGURE 8**

Data from four leading IVF clinics showing the total number of oocytes aspirated and the total number of resultant babies over a four year period. The difference between the two histograms represent cumulative losses at many stages of development together with a 20-30 % loss due to the production of more embryos than were required for transfer.

In summary, there seems no inherent reason why a human baby could not be cloned from a somatic cell of an adult or juvenile. However, the number of oocytes and surrogate mothers required, the relatively high number of late abortions and the probability of neonatal problems combine to make the procedure biologically unacceptable. In addition to the biological problems, strong moral and ethical objections to be discussed in subsequent presentations on human cloning at this meeting, exist in many areas of the world.

Although the cloning of human babies from the nuclei of somatic cells of juvenile or adult donors will be unacceptable to the majority of people, nevertheless other biomedical roles for nuclear

transplantation are likely to be developed. For example, the production of tissues, organs and antibodies in animals for use in human therapy is likely to involve a combination of approaches including the deletion or insertion of genes in cells which will subsequently be used to create new animal lines by nuclear transplantation. In addition, it is probable that a range of pluripotent human cell lines will be produced for use in surgical repair procedures. Nuclear transplantation is important in this context because it provides the means of reducing problems of tissue rejection by producing cell lines with the same genetic composition as those of the patient. Once the phenomenon of genomic reprogramming after nuclear transplantation is fully understood it may be possible to reprogramme a patients', own somatic cells in culture without the need for egg cytoplasm or even nuclear transplantation. A simple *in vitro* method of re-differentiating and reprogramming the patients' somatic cells into an uncommitted stem cell lineage may well form the first step in a powerful new cell-based repair approach to medicine. The second step in this repair approach will involve the use of specific morphogens to induce differentiation of only those lineages required for the desired tissue repair process. Transplantation of the required lineages to the site of damage would complete the repair process. Indeed, we predict that the future capacity to de-differentiate and then reprogramme somatic cells *in vitro* is likely to become one of the most important and beneficial rewards for the past half-century of research on nuclear transplantation.

## Acknowledgements

We acknowledge with gratitude the editorial assistance of Dianne Styles and Karen Waterton and the artwork of Linda Notton.

## References

1. **Boynton, A. L. & Leffert, H. L. (1985):** «Control of Animal Cell Proliferation», *Academic*, London, 1: 331-365.
2. **Briggs, R. & King, T. J. (1957):** «Changes in the nuclei of differentiating endoderm cells as revealed by nuclear transplantation», *J. Morph.*, 100: 269-312.
3. **Campbell, K. H. S. (1998):** «Maternal effects upon the development of embryos created by nuclear transfer», in *Gametes: Development and function*, Lauria, F.; Gandolfi, G.; Enne & L. Gianaroli (eds.) Serono Symposia, Rome, 439-456.

4. **Chou, C. F., Riopel, C. L. & Omary, M. B. (1994):** «Identification of a keratin-associated protein that localizes to a membrane compartment», *Biochem. J.*, 298: 457-463.
5. **Davidson, E. H. (1986):** *Gene activity in early development*, Orlando: Academic Press.
6. **DiBerardino, M. A.; Hoffner, N. J. & Etkin, L. D. (1984):** «Activation of dormant genes in specialized cells», *Science*, 224: 946-952.
7. **Djuzenova, C. S.; Sukhorukov, V. L.; Klock, G.; Arnold, W. M. & Zimmermann, U. (1994):** «Effect of electric-field pulses on the viability and on the membrane-bound immunoglobulins of LPS-activated murine B-lymphocytes - correlation with the cell-cycle», *Cytometry*, 15: 35-45.
8. **Garry, F. B.; Adams, R.; McCann, J. P. & Odde, K. G. (1996):** «Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning», *Theriogenology*, 45: 141-152.
9. **Gelsleichter, L.; Gown, A. M.; Zarbo, R. J.; Wang, E. & Coltrera, M. D. (1995):** «P53 and MDM-2 Expression in malignant-melanoma - an immunocytochemical study of expression of P53, MDM-2, and markers of cell-proliferation in primary versus metastatic tumors», *Mod. Pathol.*, 8: 530-535.
10. **Geiseler, F.; Boege, F.; Clark, M. & Meyer, P. (1993):** «Correlation between the DNA-binding affinity of topoisomerase inhibiting drugs and their capacity to induce hematopoietic cell-differentiation», *Toxicol. Letts.* 67: 331-340.
11. **Gosden, R. G. & Telfer, E. (1986b):** «Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships», *J. Zool.*, 211: 169-175.
12. **Gurdon, J. B.; Laskey, R. A. & Reeves, O. R. (1975):** «The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs», *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 34: 93-112.
13. **Gurdon, J. (1977):** «Egg cytoplasm and gene control in development», *Proc. Royal. Soc. B.*, 198: 211-247.

14. **Hake, L. E. & Richter, J. D. (1997):** «Translational regulation of maternal mRNA. (Mini-Review)», *Bioch. Biophys. Acta*, 1332: M31-M38.
15. **Kreipe, H.; Heidebrecht, H. J.; Hansen, S.; Rohlk, W.; Kubbies, M.; Wacker, H. H.; Tiemann, M.; Radzun, H. J. & Parwaresch, R.:** «A new proliferation-associated nuclear antigen detectable in paraffin-embedded tissues by the monoclonal-antibody KI-S1», *Am. J. Pathol.*, 142: 3-9.
16. **Martínez, J. C.; Piris, M. A.; Sanchezbeato, M.; Villuendas, R.; Orradre, J. L.; Algara, P.; Sanchezverde, L. & Martínez, P. (1993):** «Retinoblastoma (RB) Gene-product expression in lymphomas-correlation with KI67 growth fraction», *J. Pathol.*, 169: 405-412.
17. **Moor, R. M.; Dai, Y.; Lee, C. & Fulka, J. Jr (1998):** «Oocyte maturation and embryonic failure», *Hum. Reprod. Update*, 4: 223-236.
18. **Rizkrabin, M. & Pavlovitch, J. H. (1993):** «Epidermal calcium-binding protein- a marker of early differentiation of basal layer keratinocytes of rats», *Cell Tissue Res.*, 272: 161-168.
19. **Strobl, J. S.; Wonderlin, W. F. & Flynn, D. C. (1995):** «Mitogenic signal-transduction in human breast-cancer cells», *Gen. Pharm.*, 26: 1643-1649.
20. **Swann, K. (1996):** «Soluble sperm factors and  $Ca^{2+}$  release in eggs at fertilization», *Rev. Reprod.*, 1: 33-39.
21. **Webb, R.; Gosden, R. G.; Telfer, E. E. & Moor, R. M. (1999):** «Factors affecting folliculogenesis in ruminants», *Anim. Sci.*, 68: 257-284.
22. **Wells, D. N.; Misica, P. M. & Tervit, H. R. (1999):** «Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells», *Biol. Reprod.*, 60: 996-1005.
23. **Whitfield, J. F.; Boynton, A. L.; Rixon, R. H. & Youdale, T. (1985):** «Control of animal cell proliferation», *Academic*, 1: 331-365.
24. **Wilmen, A. & Hegemann, J. H. (1996):** «The chromatin of the *saccharomyces-cerevisiae* centromere shows cell-type-specific changes», *Chromosoma*, 104: 489-503.

25. **Wilmut, I.; Schnieke, A. E.; McWhir, J.; Kind, A. J. & Campbell, K. H. S. (1997):** «Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells», *Nature*, 385: 810-813.
26. **Xue, S. B.; Zhang, H. Q.; Cheng, R. X. & Li, S. W. (1993):** «Increase of calcium levels at interphase in NIH 3T3 cells», *Science*, 36: 314-318.

# **CLONING BY NUCLEAR TRANSFER**

*Harry Griffin*

Roslin Institute, Roslin, Scotland, UK





The first mammal cloned from a cell from an adult animal was born on 5 July, 1996. The lamb was derived from cells that had been taken from the udder of a 6-year old Finn Dorset ewe and cultured in the laboratory. Individual cells were then fused with unfertilised eggs from which the genetic material had been removed. Two hundred and seventy seven of these "reconstructed eggs"—each now with a diploid nucleus from the adult animal—were cultured for 6 days in temporary recipients. Twenty nine of the eggs that appeared to have developed normally to the blastocyst stage were implanted into surrogate Scottish Blackface ewes. One gave rise to a live lamb, Dolly, some 148 days later.

At first Dolly was a clone alone, but in the last 12 months other research groups around the world have also reported successful cloning from adult animals. Cloned calves have been produced in Japan, New Zealand, France, Germany and the US, cloned mice in Hawaii and cloned goats in USA and Canada.

This paper reviews the history of nuclear transfer, describes the likely practical applications of the technique in agriculture and medicine and comments briefly on the intense media speculation—much of it ill informed—about the possibility of cloning of humans.

## **A Brief History of Nuclear Transfer**

Nuclear transfer is not itself novel. The technique was first reported in frogs in 1952 and has been used widely since in amphibians to study early development (see McKinnell, 1985 for a very readable review). This early work showed that the first few cell di-

visions after fertilisation produce cells that are totipotent (i.e. they can develop into all of the cell types that make up the whole animal). As the embryo develops further, the cells lose this property and the success of nuclear transfer rapidly declines. Some nuclear transfer experiments using cells from adult frogs produced viable embryos, but these never developed beyond the tadpole stage.

Nuclear transfer in mammals proved to be more difficult. The cloning of mice using nuclei from very early embryos was reported in 1977 but this work was not repeatable and interest among developmental biologists waned. Research on nuclear transfer in cattle continued, stimulated by the potentially large commercial benefits of multiplying elite embryos. Artificial insemination allows each bull to have thousands of offspring but each cow normally only produces 5 or 6 calves in a lifetime. Multiple ovulation embryo transfer (MOET) and cloning by embryo splitting have been used to partially redress this imbalance, but these techniques have limited potential for further development. By contrast, nuclear transfer has, at least in principle, the ability to produce an unlimited number of identical animals.

By the middle of the 1980's several research groups from around the world had created cloned sheep and cattle by transferring nuclei directly from early embryos. Steen Willesden in the US had produce live calves by nuclear transfer from embryos that had progressed to the 64- and 128-cell stage and this was the first suggestion that nuclear transfer in mammals was possible from at least partially differentiated cells.

### **Roslin's Interest in Nuclear Transfer**

In the early 1980's the then Animal Breeding Research Organisation initiated a programme designed to produce transgenic sheep and cattle that would secrete human proteins in their milk. Using the beta lactoglobulin promoter, Dr. John Clark and colleagues were able to direct expression of human genes to the mammary gland. This success led to the setting up in 1987 of PPL Therapeutics and the subsequent production of Tracy, a transgenic sheep that secreted 35 g of a human protein- alpha-1-antitrypsin- in each litre of her milk. Over the same period other groups had made transgenic goats and cows and genetically modified pigs were beginning to be developed as sources of organs for transplantation to human patients.

At this time the only way of producing transgenic livestock was by pronuclear injection. This technique involves the introduction of

200-300 copies of the transgene into a recently fertilised egg which is then implanted in a surrogate mother. Only 1-3 % of eggs injected give rise to transgenic offspring and in only some of these is the added gene expressed at a sufficiently high level to be of commercial interest.

Pro-nuclear injection can only add genes. By contrast, if animals can be derived from cells in culture, then it is possible to carry out much more specific genetic modifications, including the removal or substitution of specific genes. This has been achieved in mice using embryo stem (ES) cells but to date no one has yet succeeded in obtaining ES cells from cattle, sheep or pigs. After learning of Willesden's success, Ian Wilmut thought that nuclear transfer might provide an alternative.

The major technical breakthrough came in 1995 when Keith Campbell, Ian Wilmut and colleagues produced live lambs –*Megan* and *Morag*– by nuclear transfer from cells from early embryos that had been cultured for several months in the laboratory (Campbell *et al.*, 1996). The key element in this success was the induction of quiescence in the donor cells. However, at this stage we did not know if they had also stumbled on a particular amenable cell type simply by chance. Additional experiments were performed to test if successful nuclear transfer was restricted to embryo-derived cells or could be carried out with a wider range of cell types. Nuclear transfer was carried out from embryo-derived cells, foetal fibroblasts and –in collaboration with PPL Therapeutics– cells from an adult ewe. Four lambs were born from embryo cells, three from the foetal cells and one, subsequently named Dolly, from an adult cell. Their identity was confirmed by DNA testing and the results published in *Nature* on 27 February 1997 (Wilmut *et al.*, 1997).

## A Scientific Breakthrough?

For developmental biologists, Dolly's existence challenges one of the fundamental tenets of developmental biology. Most scientists had thought that differentiation –the gradual process of specialisation that allows the fertilised egg to develop into the hundreds of cell types that make up the whole animal– was irreversible. After all, even over a 90 year lifespan a liver remains a liver, a nerve cell a nerve cell. The production of a live lamb from a cell taken from the udder of a 6-year old ewe demonstrated that differentiated cells are not immutable. We do not know, the identity of the cell type that donated its nucleus to produce Dolly and it is possible that she derived from a mammary stem cell rather than a terminally differentiated epithelial cell.

However, suggestions that she might have been may have been mistakenly derived from an embryo cell or from a stray foetal cell where conclusively disproved by publication of additional DNA evidence (Signer *et al.*, 1998; Ashworth *et al.*, 1998).

## **Genetic Modification by Nuclear Transfer**

The main motivation for our work on nuclear transfer at Roslin was the development of better ways for genetically modifying livestock and in July 1997 the Roslin Institute and PPL Therapeutics announced the production of Polly, the first transgenic lamb produced by nuclear transfer. In this case, the donor cell was a foetal fibroblast that had been transfected with the gene coding for human blood clotting factor IX (Schnieke *et al.*, 1997). Other groups have since produced transgenic calves and goats with different constructs.

Producing transgenic animals by nuclear transfer has immediate practical advantages. It uses less than half of the experimental animals to generate founder animals than does pronuclear injection. By specifying the sex of the offspring and generating a small number of identical clones, it is possible to generate a flock that is sufficiently large for clinical trials within one and half years.

So far nuclear transfer has only been used to add genes but in the future it is expected to allow more sophisticated modifications. Existing transgenic sheep or cows produce the human protein in addition to the normal complement of milk proteins. However, with some proteins there would be a major advantage in removing one or more of the endogenous milk proteins. This is the case, for example, with human serum albumin where the world demand for treatment of burns and other trauma is estimated at over 600 tonnes each year. Such quantities could only be produced in transgenic cows but cow's milk contains an albumin which would be difficult to separate from its human counterpart. A simple solution would be to substitute the human albumin gene from its bovine equivalent by gene targeting.

The transgenic pigs that have been created as sources of organs for transplant contain added genes that code for human proteins such as complement inhibitory factor. Expression of the gene produces the protein which coats the pig tissues and is intended to prevent immediate rejection of the transplanted heart or kidney. However, the ability to also remove genes could have a major additional benefit. Surprisingly, most of the antibodies in our blood that would the react against a pig organ recognise a single carbohydrate lin-

kage, galactose alpha (1,3) galactose. This sugar residue is not present in humans and monkeys and may not, therefore, have an important function in pigs. Elimination of the glycosyltransferase responsible for attaching this sugar residue by targeting the relevant gene is therefore expected to greatly reduce hyperacute rejection of transplanted organs (Lanza *et al.*, 1997).

## Cloning in Farm Animal Production

In addition to providing a route to gene targeting in livestock, nuclear transfer could be used to deliver what is the popular image of cloning: that is the production of large numbers of genetically identical animals.

The main advantage would be in the more rapid dissemination of genetic progress from elite herds to the commercial farmer. At present this is achieved through artificial insemination—which supplies only half the genes—and by limited use of embryo transfer. This is not that efficient and in dairy cattle, the performance of the average cow is probably some 10 years behind the best. With cloning, it would be possible to remove this difference. Farmers who could afford it would receive embryos that would be clones of the most productive cows of elite herds and thereby lift the performance of their herds to that of the very best within one generation. This would be a one-off gain, since from then on the rate of genetic progress would return to that of the elite herds.

In this scenario, breeding companies would sell cloned embryos in much the same way as they now sell semen. Farmers would choose cloned embryos for high merit beef bulls or dairy cows from catalogues that described the genetic merit for a series of economically important traits, including fertility, health and long term performance. The cloned embryo would be delivered to the farm much in the same way as semen straws are today, perhaps from breeders overseas. Possible applications would be a little different in pigs because sales are usually by line rather than by individual animals. Embryos would allow easy transport of genotypes between countries, avoiding the need for costly quarantine arrangements.

There are major practical hurdles to overcome before nuclear transfer could become a routine procedure in livestock production. We first need to show the technique can be used easily in cattle and pigs because it is probably only in these species that the costs can be justified. Non-surgical means would be needed for embryo transfer and success rates would have to be dramatically

improved. Previous experience with new technologies such as artificial insemination and multiple ovulation embryo transfer suggest that it may be 10-20 years before this could be possible.

A major risk would be loss of genetic diversity but this could be avoided by systems that ensured that breeding companies produced a limited number of clones of each genotype and restricted the number of each of the clones that could be sold to any one producer. Although the herds of some producers might consist entirely of cloned animals, the fact that they were clones of different elite animals may actually increase genetic diversity on some farms.

## Human Cell Therapy

The most exciting application of nuclear transfer is likely to be in human cell therapy (Wilmot, 1999; Pedersen, 1999). Intact cells are already being developed as treatments for patients suffering from a wide range of diseases, including diabetes, leukaemia, Parkinson's disease, stroke and heart attacks. Overcoming immune rejection of human or animal cells is a major problem in developing successful cell therapies for such diseases. Perhaps 10-15 years into the future it may be possible to use the patient's own cells, thereby avoiding the time, expensive and uncertainty of tissue matching and/or the long term use of immunosuppressive drugs. Skin cells would be removed from the patient, converted into the desired cell type in the laboratory and then reintroduced into same patient for treatment. The patient would not reject these cells because they would be genetically and immunologically identical to all the other cells in his or her body.

At present that the only way that we could perform the dedifferentiation of specialised cells would be to transfer one of the patient's cells to an enucleated human oocyte and culture the resulting human embryo for 5-6 days in the laboratory. Embryonic stem cells would then be recovered from the embryo—which at this stage would be a small ball of cells just visible to the naked eye—and these then converted to the desired cell type by incubating with appropriate growth factors.

Such use of human embryos raises substantial ethical issues. However, when we know more about the mechanisms involved, it may be possible to reprogramme human cells without using human eggs or embryo. In the UK all research on human embryos is controlled by the Human Fertilisation & Embryology Authority and in December, 1998 the HFEA and the Human Genetics Advisory Commission recommended that research on human embryos should be al-

lowed to progress the development of human cell therapy (see [www.dti.gov.uk/hgac](http://www.dti.gov.uk/hgac)). Such research would be allowed only under licence and only after extensive studies had been carried out on animals.

The successful development of human cell therapy will require a major research effort and the bringing together of a wide range of different skills and expertise. Recently the Roslin Institute announced a major new collaboration with the Geron Corporation of California in which a main aim is to understand the mechanisms involved in the reprogramming of somatic cells in nuclear transfer and develop ways in which human cells can be transformed from one cell type to another without using human eggs or embryos. The initial work at Roslin will be use mice and sheep.

### Cloning of Human Beings?

In contrast to our enthusiasm for "therapeutic cloning" (i.e. the cloning of human cells), the Roslin Institute remains opposed to the cloning of human beings, which we consider to be unsafe, impractical, unnecessary and unethical.

Much of the speculation in the media about human cloning has been based on science fiction rather than good sense. A common misunderstanding was that clones would be somehow less than human. However, most of us have already met a human clone – an identical twin – and no one questions their right to be full members of the human race. Others seemed to believe that cloning would produce an identical photocopy, rather than a young child that would grow up with a personality and mind all of its own.

Cloning is also currently very inefficient. The 277 "reconstructed eggs" – used to produce Dolly required the surgical recovery of over 400 unfertilised eggs from donor ewes. Human *in vitro* fertilisation clinics recover an average of 5-10 human eggs at a time from each woman donor, so any clinic wanting to expand into human cloning might reasonably conclude that they would need to recruit at least 40 volunteers for each prospective pregnancy. The actual number of eggs needed would be much greater than this. Sheep are remarkably efficient at reproduction, with almost all of them becoming pregnant after being mated just once. In contrast, young fertile women wanting to conceive only have a 1 in 3 chance of establishing a pregnancy after intercourse, even if their timing is just right. Pregnancy rates in humans drop to 10-20 % with *in vitro* fertilisation and anyone suggesting that there is a realistic chance of a pregnancy using a handful of donors is deceiving both themselves and their potential clients.

The risk is not simply a lack of a pregnancy. In the three cloning experiments that have been carried out at the Roslin Institute so far, several lambs died late in pregnancy or soon after birth, and some of these had developmental abnormalities. Similarly high rates of peri-natal mortality have been reported by the research groups that have cloned calves and mice. No-one knows the reason for these failures, but the simplest explanation is that "reprogramming" of the transferred cells is not 100 % complete. We are working to improve the success rate. In the meantime, it would be wholly unethical for anyone to carry out experiments in humans in which the end product might well be a malformed child.

Even if a cloned baby appeared to be normal, we would not know what hidden legacy the boy or girl might carry. The DNA that carries our genetic code is continually being damaged by ultraviolet radiation, free radicals generated within cells and chemicals from the environment. Those cells in the body that divide and multiply rapidly—including critically those producing sperm—have efficient repair mechanisms. By contrast, the repair of damaged DNA is much less effective in terminally differentiated cells and the gradual accumulation of so-called "somatic mutations" in the DNA of most of our cells is thought to contribute to aging and the incidence of cancer. Dolly has already been shown to have inherited shortened telomeres—the protective caps on the ends of chromosomes—from the 6 year old donor of her nucleus. When adult cells are used to create a clone, we can also expect that the accumulated somatic mutations will be transferred with them. As a consequence, the resulting clone could have a shortened lifespan or increased chance of cancer later in life.

One of the primary considerations in assessing the ethics of cloning should be the interest of the prospective child. Children conceived normally have a unique genetic identity based on random distribution of genes between their biological mother and father. Unlike identical twins, a clone would be a genetically identical copy of an existing human being and it is difficult to see how this could not have a damaging influence on the child and his or her relationship with its parents. A son cloned for an infertile couple, for example, would be viewed by the mother as a physical copy of her partner and by the husband as a copy of himself. If and when the child was told of his origins, he would be able to see at least part of his future in front of him in the form of his father, a future that he may well resent.

Further information about Roslin Institute's research on cloning can be obtained from its web site on ([www.ri.bbsrc.ac.uk](http://www.ri.bbsrc.ac.uk)).



## References

- Ashworth, D.; Bishop, M.; Campbell, K.; Colman, A.; Kind, A.; Scnieke, A.; Blott, S.; Griffin, H.; Haley, C.; McWhir, J. & Wilmut, I. (1988): *Nature*, 394: 329.
- Campbell, K. H. S.; McWhir, J.; Ritchie, W. A. & Wilmut, I. (1996): *Nature*, 380: 64-66.
- Lanza, R. P.; Cooper, D. K. C. & Chick, W. L. (1997): «Xenotransplantation», *Scientific American*, July.
- McKinnell, R. G. (1985): *Cloning: Of frogs, mice and other animals*, University of Minnesota Press, Minneapolis, USA.
- Pedersen, R. (1999): *Scientific American*, 280: 68-75.
- Schnieke, A. E.; Kind, A. J.; Ritchie, W. A.; Mycock, K.; Scott, A. R.; Ritchie, M.; Wilmut, I.; Colman, A. & Campbell, K. H. S. (1997): *Science*, 278: 2130-2133.
- Signer, E. N.; Dubrova, Y. E.; Jeffreys, A. J.; Wilde, C.; Finch, L. M. B.; Wells, M. & Peaker, M. (1988): *Nature*, 394: 329-330.
- Wilmut, I.; Schnieke, A. E.; McWhir, J.; Kind, A. J. & K. H. S. Campbell (1997): *Nature*, 385: 810-813.
- Wilmut, I. (1999): *Scientific American*, 279: 58-63.



# **GENOMICS AND MEDICINE**

*William A. Haseltine*

Chairman of Human Genome Sciences, USA



Advances in technologies for identifying human genes and gene products—proteins—have over the past several years provided a rational basis for finding starting points, or targets, for the discovery of small molecule drugs, as well as for identifying drugs that are themselves proteins.

Currently, the great majority of drugs are small molecules. Targets are distinctive chemical features carried by molecules in the body that play some crucial role in a disease. Drugs bind to targets and in doing so change the behavior of the molecule so as to ameliorate the pathology. For example, an illness may involve the overactivity of a specific enzyme. If a researcher discovers that a particular part of the enzyme can bind to compounds in a way that inhibits the enzyme's activity, that feature would be considered a promising target.

Human Genome Sciences (HGS) utilizes a range of technologies to identify targets, and cooperates with various pharmaceutical companies to speed small molecule drug development. HGS is simultaneously developing protein and antibody-based medicines. This second goal is not entirely novel: a variety of human proteins, including insulin, growth hormone, granulocyte colony stimulating factor and others, are already used as pharmaceuticals. But we are endeavoring to expand the field. HGS's mission has since broadened to include the use of antibodies and genes as drugs; the genes serve as a means for delivering proteins.

The HGS strategy for drug discovery is quite different from that of the Human Genome Project, the U.S. component of which is coordinated by the Department of Energy and the National Institutes of

Health. That project's principal objective is to determine the complete sequence of the bases that constitute human DNA, including all the genes and a lot more DNA that is not included in any gene. HGS's research program, in contrast, has been aimed at identifying medically important genes.

In humans and indeed in most multicellular organisms, the genome is much more than the complete set of genes encoded in the species' DNA. More than 90 % of human DNA consists of repeated sequences that have been termed junk DNA. It may be better to think of them as packaging.

A precious piece of crystal will typically come in a big box containing mostly packaging material. Genes are surely very valuable to a species: they are transmitted across the generations for hundreds of thousands of years, even hundreds of millions of years. That, perhaps, is why most of the DNA in the human genome lies between genes. It serves as something like packaging for genes.

The multiply repeated sequences we see interspersed within and among the genes can be compared to the thousands of plastic "peanuts" protecting a piece of crystal. Some of the repeated sequences in the genome recur up to two million times in almost identical form. (The slight variations can provide important clues to past biological events, such as infections with retroviruses, which insert their own genetic information into the DNA of their host.)

This state of affairs contrasts with the situation in bacteria. Scientists now know the complete sequences of the genomes of medically important species such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*, among others, and a general picture has emerged. Bacterial genomes, in contrast to those of more complex organisms, comprise genes packed very closely together, and little else.

The genetic differences between bacteria and more complex organisms go beyond the amount of packaging. A typical human gene does not exist as a single contiguous sequence of DNA. Rather, it is fragmented into multiple sections, called exons. These are separated by relatively long stretches of non-coding sequences known as introns. In extreme cases, a gene may be broken up into more than a hundred different exons scattered over two hundred thousand nucleotides. (Nucleotides are the chemical units that constitute DNA and its chemical relative, RNA.)

Many scientists have speculated about why genes are organized that way. One explanation again refers to the need to protect them during transmission. When sexually reproducing organisms produce eggs and sperm, their DNA undergoes a process called recombination: corresponding segments of DNA inherited from the father and from the mother are interchanged. Because genes in such creatures exist as multiple exons, recombination within an intron can relatively easily replace a damaged exon with the corresponding exon from the other parent, thus giving rise to a functioning gamete that may contribute genes to the next generation. This repair process is far less likely to occur in organisms that lack separate introns and exons.

The Human Genome Project will determine the complete nucleotide sequence of the 97 % of human DNA not included in the genes as well as the 3 % that does constitute genes. Although the resulting sequences will be of scientific interest, they will have far less immediate importance than the exons. We at HGS, in contrast, are concentrating our efforts on the expressed parts of the genes—the exons—because we believe that they are the keys to radically improved medicines.

## Two Approaches to Gene

Humans have sought to understand the living world in two distinct ways. One concentrates on how DNA explains differences between individual organisms. The other focuses on how genes, and the proteins they give rise to, function in the body.

The first is the approach of the geneticist and the Human Genome Project. It starts with the observation that like begets like. Eye color and flower color are both transmitted to subsequent generations via the genes, for example. This principle has allowed us to breed plants and animals suited to our varied uses. For medicine, we would like to know how changes in the inherited text give rise to traits associated with disease. Some inherited differences give rise to disease almost inevitably; others produce ill-effects only in connection with some environmental influence, such as an infection.

This agenda seeks to create a complete catalog of all the DNA humans inherit. Ultimately this approach probably will reveal the functions of all of our genes, including how their activity is affected by the environment. But that task will take a long time.

The second approach—the one pursued at HGS—is that of the anatomist. The questions asked are: What is this structure for?

What organs are there? What tissues? What type of cells? What organelles? The answers comprise an anatomical perspective that is independent from that of the geneticist. Biochemistry, for example, is a high-resolution extension of anatomy. In that field we learn about numerous different structural proteins and enzymes, all linked in complex pathways. It does not focus on how these components are inherited. Similarly, the anatomical approach to studying genes inquires about their function in the body.

In recent years, since scientists have been able to turn off specific genes in experimental animals and observe the physiological consequences, biochemistry and genetics have started to fuse. Workers in both disciplines are now likely to be familiar with the concept of a gene as both an irreducible element of heredity and also as a component that gives rise to a protein with a specific function. A gene together with its protein product can now reasonably be considered the basic unit of life. Yet although the genetic and anatomical perspectives overlap somewhat, they give rise to clearly distinct research programs.

HGS's approach to finding medical utility applies the powerful tools of genomic science—laboratory robots, high speed computers and high speed sequencing—to anatomical genomics. We ask which genes are functioning in different tissues in disease and in health, and what the active genes do. The strategy is making great strides toward our goal of developing new medicines. The genome project, in contrast, has given rise to very few candidate medicines.

That enterprise is said now to be about 10 % complete. Yet the genome sequence of the microscopic worm *Caenorhabditis elegans* was supposedly completed last year, and 15 % of the sequence is missing. And scientists cannot simply order a piece of *C. elegans* DNA they might wish to study. The *C. elegans* sequencing project was not designed with an infrastructure adequate for supplying DNA to investigators.

Likewise, the sequence of human chromosome 22 was announced recently as a part of the Human Genome Project, this portion having been supported principally by the Wellcome Trust in the United Kingdom. Yet 3 % of the chromosome, for various technical reasons, remains unsequenced. The achievement is an important one: it tells us a good deal about how a human chromosome is organized, and the Wellcome Trust has undertaken to ensure that the data and the corresponding DNA are available. But the limitations of sequencing projects are worth bearing in mind.



Turning to the Human Genome Project as a whole, a working draft of the sequence is promised sometime this year. But a rough draft probably is not going to be very useful. An error of even a single nucleotide can make a huge difference when it comes to searching for exons. The genetic code, nature's scheme for encoding proteins in DNA sequences, is organized into "words" consisting of three nucleotides each. If a base is deleted, or added, it throws the boundaries of all the triplets after the alteration out of register. This phenomenon, called a frame shift, makes recognizing exons almost impossible if errors are at all common.

When the human sequence is really complete, we can expect to learn many things about chromosome structure, including the sequences of chromosomal features known as telomeres and centromeres and the incidence of duplications and rearrangements. This will be important information. For genes whose corresponding messenger RNAs have already been isolated and sequenced, the genome sequence will reveal the intron-exon structure and where the gene sits on a chromosome, and it will probably reveal some new genes. Lastly, if a sequence is found that is very similar to that of a known gene, it will reveal the new gene's major exons.

The complete human sequence should answer many questions about our relationship to the natural world. What do our genes look like relative to those of a chimpanzee? Are there sets of genes that are found only in humans? How many of the differences between us and related species are due simply to an accumulation of single-point mutations, and how many to rearrangements of the chromosomes? The answers could shed light on the functioning of key anatomical structures, including the brain.

Before we can have confidence in the answers, however, we must have an accurate and complete genome sequence not only of the human but also of the chimpanzee, the rat and the mouse, all of which are important experimental animals. This information will be quite a while in coming. And even this treasure trove is unlikely to lead us to discover vast numbers of new genes. A perfect genomic sequence will not in general reveal an unknown gene unless a researcher already knows a related sequence, so that computers can be programmed to search for exons using the criterion of sequence similarity.

One reason why finding genes is so difficult is the absence of unambiguous punctuation. Genome sequencing gives us a very long string of the letters A, C, T, and G. If a sequence is of very high quality, computers can recognize the correct reading frame for the

triplet code. But no computer program today can reliably find where genes begin and end just from a genomic sequence. The programs recognize "genes" that do not in fact exist as often as they recognize real ones, and almost never recognize small insertions of non-coding sequence properly. Even knowing a gene's sequence as it is expressed in protein, it is hard to match it precisely onto the corresponding chromosomal DNA sequence. Molecular biologists have some tricks that they can use to identify exons. But these entail a lot of experimental work, and are unlikely to be very useful when investigators do not know exactly where they should be looking.

Another limitation of the genome project is that even when a scientist does find a gene in a genome sequence, he or she will probably not know where in the body it is used, or even if it is used. Sometimes what appears to be a gene may be only a pseudogene, the descendent of a real gene that was damaged in some way and no longer serves any purpose. And a genome sequence cannot tell us how a gene's function changes in normal and abnormal circumstances. All in all, very little knowledge of medical value will emerge in the near term from completion of the sequencing of the human genome.

The Human Genome Project is, to be sure, about more than just obtaining a genomic sequence. It has a subsidiary goal of constructing a high resolution genetic map based on variations in human DNA sequence among individuals. Such a map would consist of recognizable sequence variants, or markers, that occur within or very close to genes of known function. Ideally, researchers would like to have at least one marker per gene.

This goal is almost accomplished. On average humans vary by two and a half nucleotides per gene. We have about 120,000 genes, so there are about 300,000 differences between almost any two people, close relatives excepted. That is a lot of differences to work with. In the whole US population, there are at least six million sequence differences, possibly more. So there is no shortage of markers.

Another subsidiary goal is to construct a physical map of human DNA. Such a map consists of overlapping cloned pieces of DNA. Researchers will within a year have one that encompasses about 50 % of all human genes. The locations of the genetic markers on the physical map will be known, thanks to the rough sequencing that will by then have been completed.

These efforts will be supplemented by the new technology of gene chips, which will enable researchers to test a person's DNA for up

to 30,000 sequence variants at a time. This method is already proving its value for identifying important genes. We will be able to track very quickly some genes that underlie normal variation, whether it be eye color, hair color, skin color or some other trait. This exercise will be straightforward if only single genes underlie the difference being probed, much harder if multiple genes are involved.

This progress will in turn lead to a dramatic increase in the availability of tests that can predict when illnesses are likely to develop. It will also generate a corresponding increase in the number of targets for drug discovery. Some companies are pursuing the notion that through understanding genetically-based variations in patients' responsiveness to drugs, they will be able to develop screening tests that quickly tell them which drugs are likely to be effective in any individual. Indeed, companies have been founded on the promise of using mapping techniques to study genetic variations in susceptibility to drugs in outbred populations. Unfortunately, because people in such populations are not especially closely related to each other, markers and maps are inefficient. A recent attempt to use high-resolution markers in an outbred population failed to map even a disease with a very clear genetic basis, sickle cell anemia. Because human DNA recombines much faster than it mutates, in outbred populations it is scrambled in succeeding generations. So the idea of developing drugs for people with particular genes, an approach that has been dubbed pharmacogenomics, faces scientific as well as economic obstacles. In some populations, such as in Iceland and in some villages in Finland, higher levels of relatedness prevail, and in these atypical cases it may indeed be possible to identify specific genetic variants through mapping. But not in the U.S.

The gap between our ability to detect and predict genetic disease and our ability to treat or prevent it seems likely to grow rapidly. This trend poses a dilemma for patients who have rare but serious diseases that can be predicted with genetic testing. Indeed, some such patients choose not to be tested out of fear that they will suffer discrimination as a result.

It seems clear that the tests will improve. Some improvements could result from advances in the high throughput sequencing devices used today, from developments in mass spectrometry that make it possible to separate pieces of DNA of slightly different masses, or from new devices that read a DNA sequence by observing it being extruded through tiny pores. As the ability to predict genetic fates advances, it will likely cause significant social dislocation. Employers and insurers will want to use predictive tests, and medical laboratories will want their tests to be validated.

Yet truly radical advances in testing are unlikely until there are cures and effective preventives, and they could be a long time coming. Fundamental advances are needed before we can correct genetic defects. Gene therapy has proved harder to develop than optimists had hoped: recent unhappy events make clear that attempts to transfer genes into patients can lead to serious, even fatal, reactions. Adenoviruses no longer look promising as vectors for that purpose.

Other techniques exist for transferring genes, however. Naked DNA appears to have real potential; only clinical trials will settle the questions. I think we can be confident that solutions to the problem of delivering therapeutic genes will be found, but it may take anywhere from 10 to 50 years.

One encouraging development that could provide a shortcut to potent therapies is the creation of chimerical RNA/DNA molecules that can correct specific errors in DNA sequences. A company called Kimeragen is exploring the possibilities, and the approach has already proven its value in plant breeding. Essentially, the technique involves the use of a specially-designed molecule that tricks cells' mismatch repair mechanisms into correcting a genetic defect. Since the approach does not involve transferring genes from different species, it may be more acceptable to the public than genetic modification of plants has proven to be. Moreover, it should avoid risks associated with the use of viral vectors in most current approaches to gene therapy. At least one clinical study is under way. The strategy requires a specific molecule to be supplied for every point mutation to be corrected. So treating a genetic predisposition to breast cancer, for example, which may be caused by any of a hundred different mutations, could involve developing numerous different compounds. It remains to be seen whether that will be economically realistic.

## **Gene Anatomy**

HGS's focus on anatomic genomics means that we have to learn which genes are expressed in different parts of the body, and under what circumstances. Is this one active solely in the brain, or does it also function in the kidney? Is it active in non-dividing cells, in wounded cells, in tumor cells? Can we track changes in its activity during the life cycle?

Our method for answering these questions is straightforward. We isolate messenger RNA from human tissue of a known type and known developmental and pathophysiological state. Messenger

RNA is produced only from genes that are in use, so we can be sure sequences detected in it come from active genes. We convert the messenger RNAs to complementary DNA (cDNA) sequences, because these are chemically more stable. We then individually clone the cDNAs, which enables us to sequence them.

The sequencing strategy we employ is one that gives us information primarily about the genes' coding sequences; that is, about the type of structure the associated gene is likely to give rise to. Public databases, in contrast, have for the most part been sequencing from the opposite end of genes to the end we study. Their strategy is best for learning where genes lie on the chromosomes, but ours is superior for learning what they do. Again unlike the public databases, the HGS approach samples cDNAs derived from a random collection of messenger RNAs, because the sequences then reflect the relative abundances of gene products in the starting tissue. This information is vital for understanding genes' functions. The more common approach involves special efforts to capture rare sequences, but this tactic loses information.

Our approach means that when we sequence a cDNA, we can be sure the corresponding gene is in use in the sampled tissue. Furthermore, we know the sequence represents the gene as it used: that is, after the cell has stitched together the exons and excluded the introns from the messenger RNA. Partial and full length cDNA sequences corresponding to a gene allow us to map its chromosomal location in a matter of days. These data also allows us to study sequence variations in populations. And they allow us to find out exactly where a gene is used: having the sequence makes it possible to create antibodies that will react with the gene's protein product. Several imaging techniques are available that can reveal where the antibodies are binding in any sample.

A cDNA sequence is arguably the central enabling tool of modern biology. It can be included in gene chip arrays, which allows workers to test quickly large numbers of tissue samples. Researchers can create mice in which the gene's function is disrupted, using the so-called knockout technique. And they can make the protein in cells or express it in transgenic animals. A cDNA virtually guarantees the ability to elucidate the corresponding gene's biological function, and discover any medical utility in a systematic way.

HGS now has good cDNA libraries, or collections, for 900 different types of tissue. We have sequenced about 500 nucleotides from each of the separate cDNAs. We estimate that the collection represents some 120,000 to 140,000 individual genes, which is to say almost all human genes. We know this because we make care-

ful comparisons between our database and GenBank, whose collection is published every two months. In 1994 we had sequences corresponding to 85 % of known genes in our collection. The proportion rose to about 95 % in January 1997 and it has scarcely dropped below that figure since.

It turns out that our discovery strategy was very good at getting genes in their most useful form –as a complete cDNA capable of making a protein. To do this a cDNA has to have various important features, including a set of repeated bases at one end called the poly(A), as well as a start codon and a stop codon. We now have in our freezers about 75 % of all human genes in their full-length, protein-coding form. This resource has enormous consequences for the discovery of pharmaceuticals, whether small molecules, genes, proteins or antibodies, as well as for diagnostic and prognostic tests.

### **Discovering Medical Utility**

The most important thing that can be done with gene anatomy is to find starting points for treating and curing disease. Take osteoporosis, an enormous medical problem. In this condition, cells called osteoclasts overproduce an enzyme that eats away bone. We have studied whether genes expressed in osteoclasts might provide unique targets for small molecule drugs intended to inhibit the process.

We decided to search among proteases (protein-devouring enzymes) called cathepsins, because they are known to devour cartilage and bone. Our databases can display in about ten seconds the tissue distribution of any gene. A little searching revealed that cathepsin  $\alpha$  is restricted almost entirely to bone, where it is expressed abundantly.

We already had a full length cDNA of this gene, so we could quickly make the protein. We confirmed its protease activity, then shipped it to a pharmaceutical industry partner. The company quickly made antibodies to the protein and showed that it was secreted and accumulated in the pit that is eaten in the face of a dissolving bone. It then used the knockout technique to disrupt the gene's function in mice and showed that the animals developed thick bones. In recent work the enzyme has been crystallized and a very active program aims to develop inhibitors. In the test tube, one candidate inhibitor does indeed prevent osteoclasts from eating away at bone.

This example highlights the potential of the gene anatomy strategy. Another demonstration comes from the field of obesity, which is a major medical problem. We looked for genes resembling the type known as seven-transmembrane receptors. We found about 75 new ones. We made them all and expressed them in animal cells. We also examined their structure for evidence of similarity to known receptors. We found one that resembled the receptor for neuropeptide Y, a substance previously known to be involved in appetite. It was only found in the human hypothalamus, which is where appetite regulation occurs.

Although HGS does not pursue small-molecule drug discovery, we made a full length gene corresponding to the receptor, then expressed it in cell lines. Eventually a scientist in Texas found in fractionated brain two polypeptides that triggered a response in cells expressing this receptor. A little more work revealed that these polypeptides were cleaved from the same pro-protein. They have been named orexin 1 and orexin 2, from orexia, the opposite of anorexia. When put into rat brains they made the rats eat insatiably.

It turns out that the orexin 1 story is more complicated than it first appears. Everyone knows that hunger can cause irritability. Recently we have discovered that the orexin 1 receptor conveys pain as well as appetite. The pharmaceutical industry is very busy trying to find pharmacological agents that might influence it. Since there are two orexin peptides, somebody wondered if there is a second receptor. They used the second peptide to find it. It is also present in the hypothalamus and in other locations. When investigators studied the gene they found it was defective in humans with narcolepsy, a disorder that causes them to fall asleep unpredictably. People are now trying to develop drugs that target this second receptor to treat narcolepsy, and possibly other disorders.

The pharmaceutical industry has in fact now changed its principal paradigm for drug discovery. When HGS's partners met with success in identifying targets for small molecule drugs, others quickly emulated them. Today 80 % of targets in the pharmaceutical industry are found by gene anatomy; very few come from traditional gene mapping.

Anatomic genomics, successful as it is, provides only the starting points. No drug identified by this technique has yet made it into standard medical practice. Investigators still need to do a lot of experimentation before they can run high-throughput screens to identify drug candidates. Other well-known approaches to drug discovery, including combinatorial chemistry, computational che-

mistry and structure-based drug design, have also yielded many lead compounds that work in the test tube, but few approved products.

The bottleneck is medicinal chemistry. A lot of old-fashioned work on absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity is necessary before drug candidates can be safely given to patients. A further complication is that people are increasingly taking more than one medication, so the industry has to be wary of potentially hazardous drug-drug interactions. For these reasons the rate of new small molecule Investigational New Drug (IND) applications made to the Food and Drug Administration will accelerate only slowly over the next five years.

Random screening of compounds has not been a successful strategy for finding pharmaceuticals. Semi-rational drug design based on an understanding of the relevant biological mechanism has produced much better results. Yet the avalanche of new drugs that was widely predicted as a result of various technical innovations has not materialized. Much more work on drug metabolism and drug-drug interactions is still needed.

The reason HGS has pursued the strategy of developing drugs consisting of human proteins, antibodies, or modified genes is that these substances do not suffer from most of these limitations. We search for promising candidates using the criterion of homology: if one of the cDNAs we find betrays a chemical relatedness to a substance with an important function, such as a growth factor or hormone, we clone it, express it and investigate its properties.

Human proteins, used as medicines in humans, are not highly immunogenic, so there is reason to believe they will be well tolerated. There are no transplantation barriers at the level of individual genes and proteins. Furthermore, about 60 companies are now working on techniques to deliver proteins into the body. Thanks to these efforts, the body has become effectively permeable to proteins.

Substances we work on must have the potential to meet a serious medical need that affects a large population and lack a good current or pending pharmaceutical treatment. A cell or tissue screen must be available. We can make very rapid progress in those cases where a predictive animal model is available that includes cells which, if changed, modify the disease in question.

In our first two years of work we found 250 genes that were novel homologues of known genes for important substances. We con-



verted each one into a full length cDNA, completed the sequences and manufactured and purified 100mg of each of their proteins. We then screened them all for activity.

One medical need we were aiming to meet is to promote systemic and topical wound healing, and to treat mucositis and ulcers. We have good animal models for these uses. An activity screen of keratinocytes, an important type of tissue cell, identified ten proteins able to stimulate the growth of these cells, but 9 of them had other effects as well. The one without unwanted activity was keratinocyte growth factor 2, which we have since named Repifermin. This story shows a key difference between genomic protein discovery and prior methods: because anatomic genomics produces so many candidates, we can eliminate molecules that have troublesome side effects very early in the process.

Repifermin binds specifically to certain epithelial keratinocytes and mucosal cells that are wounded. Such cells, it appears, turn on a new receptor, and Repifermin recognizes it and stimulates them to grow. This prompts the cells to release factors that increase vascularization, including VEGF-2, another protein we are developing as a drug. Remarkably, Repifermin, although a single protein, causes the growth of full-thickness epidermis and dermis. The substance clearly triggers a natural regenerative process.

We soon learned that Repifermin stimulates mucosal cells as well as keratinocytes. It turned out to be active and specific, and it is now in phase II clinical trials for mucositis in the lungs caused by chemotherapy. All told, we have taken three drugs into clinical testing so far. All three have passed initial safety trials. No ill-effects emerged when we put Repifermin systemically into human volunteers. Our most stringent test was to put it, every day and at high dose, intravenously into monkeys. We were surprised to observe minimal effects, and these only at high dosages. There is good reason to hope that similar favorable properties will be found in other drugs whose activity has been extensively tested in this way before they reach humans.

A different substance with great potential came out our desire to satisfy an unmet need for pharmaceuticals that can modulate humoral immunity. Animal models exist that allow us to examine such effects, and they showed that one of our proteins is active and specific in stimulating key immune cells called B cells. Administration of this protein, called B Lymphocyte Stimulator (BLyS), produces very rapid rises in levels of immunoglobulins. Moreover, it appears to be a potent adjuvant, enhancing antibody responses.

BlyS emerged out of investigations of a protein made on the surface of a type of immune-system white blood cell called a monocyte. This protein is found in the cell membrane. When a monocyte is activated, the protein is cleaved, and one of its parts, BlyS, acts on a receptor found only on B cells, which we have also identified. BlyS has a powerful stimulatory effect on B cell growth. It may well have promise for treating a number of diseases characterized by an inadequate humoral immune response, including AIDS.

With VEGF-2 we have taken a different tack. We are using DNA encoding the substance as a delivery vehicle. We put the DNA (as a saline solution) directly into the heart muscle, or into the muscle in a limb. In animals it is stimulating the growth of new blood and lymph vessels. We will know soon whether it works in humans. This method could be described as either gene therapy or protein therapy. At present this system is limited to use in muscle, but it might be invaluable for treating angina and peripheral vascular disease.

The proteins that decorate the cell surface seem to have the most potential for future drug discoveries. This group includes secretory proteins, the protein hormones, growth hormones, interleukins, chemokines and others. It also includes the channels that transport proteins and various other signal transduction molecules. More than half of existing small-molecule drugs are targeted to cell-surface features. Cell surface proteins also constitute the majority of targets for antibodies and for diagnostic and imaging reagents, and they include most of the antigens used in cancer vaccines.

Nature has been kind, because most of the relevant genes can be identified by their ability to encode a single peptide that is either secreted or is visible on the cell surface. Cells have a special docking mechanism that brings peptides there. So we could train our computers to search for this feature among our cDNAs.

Each time HGS finds a cDNA bearing this marker, we clone the molecule and sequence it. We then make the protein, determine where and in what disease state it is expressed, and try to determine its biological activity. We then run activity screens and side-effect screens, initially using cell cultures. We now have 14,000 of these proteins, so robots do the work. This effort is well under way.

We have completely sequenced more than 10,000 of these proteins, expressed them, and obtained their expression profiles. Six to seven thousand are now in high-throughput activity screening.

We are searching for over 50 biological effects. We have, we think, most of the keys controlling when our cells grow, differentiate, and die, and we have both halves, the proteins and the receptors. High-throughput gene discovery is largely finished: we are now concerned first and foremost with high-throughput biological discovery. We have fully sequenced many genes of interest and made the corresponding proteins both in bacterial and in mammalian cells. We know where the genes map on the chromosomes and where they are expressed. A lot more work has to be done, but the approach has opened up an exciting horizon.

Biological screening involves more than simply testing basic physiological parameters such as calcium flux in and out of cells. We have a robot that allows us to measure the levels of expression of 100 to 200 genes at the same time, and have used it to analyze the various common physiological pathways leading to growth, differentiation, cell death and other processes. This has led us to a list of 200 sentinel genes whose levels of expression in a cell we need to know about. We take the proteins we want to screen, thousands at a time, and analyze the changes in the amounts of RNA produced from each of the sentinel genes when cells are exposed to the test protein. We can then ask our database: of the seven thousand or so proteins tested on T cells, which ones increase the concentration of cyclin D-5 by more than a factor of 5? Which ones induce 50 % of the apoptotic pathways more than 3 fold? And so on. Our computers display where an interesting gene is expressed in the body and anything else known about it.

This tool has allowed us to embark on a program in which we are integrating the full range of modern techniques for studying genes and cell physiology. We are able to learn what each secretory protein does to each cell type. Eventually I believe our technologies will be combined with recent advances in the biology of stem cells to produce proteins that can cause cells in culture to differentiate, or undifferentiate, in a controlled way. These developments will open the way to growing new human tissues of a variety of types, in the laboratory and perhaps within patients. That power could revolutionize medicine.

We have been surprised to learn that the genes for 90 % of the secretory molecules we are working on have no discernible homology to known human or animal genes. Whether they are all recent creations of evolution, or whether their sequences have changed too much for our computers to recognize their homologues, we do not know. But we can predict whether a protein is likely to be lodged in the membrane or secreted. This strategy has led us to identify some 15 new tumor necrosis factor-like genes, and a cor-

responding number of receptors. In some cases we now know which factors bind to which receptors.

For many of the genes we are studying we have filed patent applications. I suspect most will be awarded, because we have good biological data on what the corresponding protein does in about a hundred different tests. Our patent budget is about \$6 to 8 million per year and is likely to rise over time. We seek protection for the molecules that look most promising for our medical applications, but our projected cost for the entire patent estate we are building should be less than the cost of developing one drug, which is about \$100 million. (The commonly cited figure of \$500 million to develop a new drug is inflated to allow for a high failure rate; we expect that our failure rates will be lower than in the industry at large.)

Gene patents can offer good protection for a drug that is a gene, a protein, or an antibody. Patents for diagnostic reagents are likewise effective. Targets, however, are hard to protect with patents. Patenting does not stop academics from working on a gene, and HGS is now by far the largest publisher of full length human gene sequences: these are disclosed in our awarded patents. We know academics are busy mining information from these published sequences.

Our research provides us with more leads than we can develop, so we are working with a number of companies. These collaborations are aimed at finding, among other things, new targets for antimicrobials and new antigens for vaccines. Immunotherapeutics are another area of interest. BLYS, for example, may be able to elicit protective primary immunity and so attack chronic infections resistant to antibiotics.

Over the next five years there will be a dramatic increase in applications to regulatory authorities to test new human gene- and protein-based drugs. These will come from HGS and other companies operating in this area. Later, there will be other impacts of anatomic genomics. Scientists have recently made a technological breakthrough in antibody technology, as a result of which "humanized" murine antibodies exist now as approved drugs. Some fully human antibodies are also being employed as drugs. HGS's work with secretory proteins can be combined very neatly with these new antibody technologies.

In summary, genomics will soon provide us with a great deal more information about where we stand in relation to other organisms on the planet. It will also provide us with a lot more information

about human variation, and an ability to predict and detect disease that will outpace our ability to treat it. That will cause angst and some social disruption.

The big wave of new drugs awaits further breakthroughs in human drug metabolism and in drug-drug interaction. The near-term payoff—over the next 5 years—will be biological therapies. Proteins, antibodies and to some extent genes will become the backbone of a new, and I hope a somewhat better, medicine. Farther out, ten years from now and beyond, there will be a new wave of small molecule drugs, as well as other innovations we cannot at present predict.



# **CLONACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS: ASPECTOS ÉTICOS, SOCIALES Y LEGALES**

*Marcelo Palacios*

Presidente del Comité Científico de la Sociedad Internacional de  
Bioética (SIBI)





Al referirnos a la clonación humana debe evitarse hacerlo en términos peyorativos, reduccionistas y propensos a la alarma social (con referencia únicamente, por ejemplo, a la clonación de seres humanos), pues hay diversos tipos de clonación y ámbitos distintos de aplicación que merecen valoraciones científicas y éticas positivas.

En cuanto al bloque de cuestiones que abordamos, la reacción social y los planteamientos éticos no son coincidentes, pues si con unos procedimientos se abrigan esperanzadores resultados, por ejemplo, la producción de líneas celulares, tejidos u órganos con fines de autotrasplante (sin riesgos de rechazo) a partir de células madre o *stemcells*, otros abren posibilidades —como crear seres humanos clonados— que provocan polémicas rotundas, confrontaciones éticas y determinada inquietud social.

## Sinopsis-guía

### Clonación: clasificación

- A) *Intraespecífica* (humanos, animales, vegetales)
- B) *Interespecífica (mixta)*  
Humanos, animales, vegetales, microorganismos
- C) *Natural (gemelos monocigóticos, GEMELACIÓN)*
- D) *Tecnológica o artificial*
  - *Molecular, de genes o sus partes* (que no trataremos aquí)
    - a células somáticas u organismos
    - a células reproductoras (*transgenia*)

– de células

- somáticas
- reproductoras (blastómeros)  
de cigoto (*gemelación*)  
de preembrión (**PARACLONACIÓN**)

– de tejidos

– por transferencia de núcleos a ovocitos o cigotos (*nuclóvulos*)

- núcleos de células somáticas
- núcleos de células reproductoras
- simple (sin manipulación del núcleo)
- combinada (con manipulación del núcleo)

### **Algunas finalidades**

– No reproductivas

- Industriales
- Médico-sanitarias  
Diagnóstico, terapéutica, farmacia, etc.  
Trasplantes
- Científicas no médicas

– Reproductivas

- En no humanos  
Mejora animal o vegetal  
Conservación especies a extinguir (no se tratarán aquí)
- En humanos

### **Posibles consecuencias**

– Científicas

- Avances
- Problemática

– Sociales

- Biológico-antropológicas
- Económicas (mercado, alimentación, etc.)
- Salud
- Medio ambiente

– Legales y jurídicas

– Éticas (*Bioética*)

## Recordatorio histórico

Desde que en 1952 Robert Briss y Tomas Knigh (Instituto del Cáncer de Filadelfia) obtuvieron renacuajos, con un 30 % de éxitos, al transferir núcleos (¿o tal vez óvulos enteros?) de células embrionarias de ranas a óvulos desnucleados previamente, y hasta setiembre de 1999, cuando se comunica que ha sido clonado un toro en Italia, de nombre Galileo, por el Dr. Galli (y se confisca al animal por las autoridades, ya que el experimento no tenía los permisos), ha ocurrido mucho y muy llamativo en los campos de la biología y la medicina. Y ha surgido, entre tanto, una nueva disciplina, la *Bioética*, que se ocupa de las implicaciones éticas y sociales de su utilización, y desde cuya perspectiva haré algunas consideraciones sobre la clonación humana. Para ello, elegiré algunos hechos variados que justifican sobradamente el debate social, la exigencia de información pública puntual, comprensible y suficiente, el compromiso bioético e incluso, en circunstancias determinadas, la necesidad de elaborar normas legales y llevarlas a la práctica. Es el caso, en cuanto a lo último, de la Convención sobre los Derechos Humanos y la Biomedicina (elaborada en el seno del Consejo de Europa, y conocida como Convención o Convenio de Asturias de Bioética), y que el próximo mes de enero entrará en vigor en España.

### Año 1962

John Burdon (Universidad de Oxford) dice haber obtenido renacuajos (30 % de éxitos) al transferir núcleos de células intestinales de rana a células cutáneas de rana desnucleadas.

### Año 1986

En Cambridge se crea un cordero clonado al transferir el núcleo de una célula embrionaria.

### Año 1991

Sandra Yee comunica que con *blastómeros* recubiertos por una membrana sintética (artificial) y trasladados al útero se pueden producir clones.

(13 de octubre) Jerry Hall y Robert Stillmann comunican que han clonado 17 *preembriones humanos no viables* (poliploideos), con *membrana artificial de los blastómeros*, obteniendo 48 clones.

### Año 1995

En Oregón, EE.UU., al finalizar el año nacen dos monos clónicos (un macho y una hembra) por transferencia de núcleos a partir de células embrionarias. Lo comunican en marzo-abril de 1997, después de nacer Dolly, cuando los monos tienen unos seis meses de edad.

*Año 1996*

Ian Willmut y Harry Griffin, del Instituto Roslin de Edimburgo (Escocia), comunican que han conseguido:

- a) de los blastómeros de un preembrión de oveja con 120 = dos corderos clónicos (*Morag y Megan*),
- b) de los blastómeros de un preembrión de oveja de nueve días = cuatro corderos clónicos (¿muertos?),
- c) de un feto abortado de oveja de 26 días = tres corderos clónicos (¿muertos?).

*Año 1997*

En una publicación del 27 de febrero en *Nature*, Ian Willmut y colaboradores del Instituto Roslin anuncian que nació la oveja clónica *Dolly*, de la raza Finn Dorset, por clonación a partir de células diferenciadas, en colaboración con PPK Therapeutic. Hicieron transferencias de 277 núcleos de cada célula mamaria a ovocitos desnucleados de una oveja de tal raza, coincidiendo con la fase de división celular, estimularon con electricidad, trasladaron el blastocisto a úteros de ovejas y a los cinco meses nació *Dolly*. Se malograron 276 intentos por: malformaciones, aborto, tumores (¿cánceres?), de origen genético en su mayoría, etc., lo que supone una elevadísima mortalidad.

(Mes de marzo) La Universidad de Monash (Australia) informa de que ha realizado la primera *clonación en cadena* de embriones de vaca, logrando, por división, 500 embriones de vaca idénticos (copias, clones).

(Mes de abril) En el Instituto de Cría de Ganado de Jarkov, en Ucrania (Rusia), según publicó el diario *Izvestia*, al final de la década de los 80 se había conseguido (en estricto secreto) crear 27 parejas de becerros clónicos. Se comunica ahora. Al parecer, el Instituto de Medicina Criogénica solicitó colaborar con el otro Instituto para clonar humanos, pero no se aceptó. Es un anticipo de lo que una década después se propone Richard Seed.

(Mes de julio) En el Instituto Roslin nace *Polly*, la primera oveja clónica transgénica. Llevaron un gen humano a una célula embrionaria (fetal) de oveja, y la transfirieron a un ovocito desnucleado con el procedimiento seguido para *Dolly*.

(Mes de agosto)

— La empresa ABS Global, de Wincosin, EE.UU., comunica que han creado a *Gen*, un ternero clónico, usando blastómeros de un feto de ternero.

- La Federación Nacional de Cooperativas Agrícolas (Japón) también ha creado un ternero clónico por clonación en cadena de un óvulo fertilizado y cultivado hasta obtener 200 copias del mismo.
- La Secta Raeliana (instalada en las Bahamas y fundada por Claude Verilhon) crea la Sociedad Clonaid, para hacer hijos por clonación, a un precio aproximado de 30 millones de pesetas/niño.

#### Año 1998

(6 de enero) El físico y experto en reproducción Richard Seed (EE.UU.) afirma en una entrevista en la radio que va a clonar seres humanos por el método del Instituto Roslin, ya que en EE.UU. no hay leyes que lo prohíban. Algunos de los «curiosos» planteamientos esgrimidos:

- La Biblia estimula a imitar a Dios.
- Será un bien para la ciencia.
- Los hijos de familias no fértiles serán «propios».
- Le gustaría ser Premio Nobel.
- Tratamiento de la esterilidad.
- Disponer de células sanas para tratar enfermedades (leucemia, etcétera).
- Necesita 300 millones de dólares.

La noticia tiene gran repercusión mundial. El presidente Clinton se opone y quiere que se apruebe con urgencia la ley que lo prohíba y que propuso hace algún tiempo; pide una moratoria al menos de cinco años. Seed dice que lo hará en cualquier país permisivo, como México, Calbados, etc., y que piensa instalar Clínicas de Clonación Humana en Chicago (EE.UU.) y en otras naciones, como México, Calbados, etc. El Gobierno mexicano responde que allí no se autorizará. Gran debate abierto y, en general, repulsa.

(11 de febrero) Tan Janzieh, en Sanghai (China) dice que ha hecho ovejas (¿cabras?) transgénicas que producen en la leche factor IX del plasma.

(25 de febrero) PPL Therapeutic comunica que una filial suya en EE.UU. ha creado un ternero (al que llaman Mr. Jefferson) por transferencia del núcleo de una célula fetal a un ovocito.

(6 de noviembre) El equipo de James Thompson, de la Universidad de Wisconsin (Madison, EE.UU.) publica en *Science* que cultivaron células (blastómeros) de preembriones humanos de pocos días obtenidos por FIV, con consentimiento de los progenitores, obteniendo células madre que se pueden reproducir indefinidamente en el laboratorio sin que se altere su material genético y que mantie-

nen sin modificar su capacidad para diferenciarse en cualquier clase de tejido adulto (neuronal, óseo, muscular, etc.) para trasplante, etcétera.

En el mismo día, en la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences* se comunica que el grupo de John Gearhart (Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad John Hopkins, Baltimore, EE.UU.) había obtenido con autorización legal células madre por clonación celular de embriones humanos abortados de 5-9 semanas de gestación.

(8 de noviembre) Se publica que la Administración del Reino Unido estudia la posibilidad de autorizar la clonación y cultivo de células del cordón umbilical del recién nacido, para disponer de tejidos para trasplantes en ellos, si se precisara a lo largo de su vida, sin riesgos de rechazo. Del proyecto, presentado a la agencia Human Fertilisation and Embryology Authority, que controla los experimentos humanos en el Reino Unido, eran responsables James Thompson, de Wisconsin, y el Instituto Roslin de Edimburgo (el de la oveja *Dolly*).

(11 noviembre) John Critser y su equipo (EE.UU.) comunican que han realizado transferencia de núcleos celulares somáticos de elefante a ovocitos de ratona, y lo consideran de utilidad para preservación de las especies en vías de extinción.

(12 de noviembre) La compañía Advanced Cell Technology, de Worcester (Massachusetts, EE.UU.) da a conocer en el diario *The New York Times* que en experimentos de 1995 y 1996 realizó clonaciones de núcleos de células somáticas de uno de sus empleados en ovocitos de vaca desnucleados, financiadas con fondos privados, aunque en laboratorios de la Universidad y con el acuerdo del Comité ético de la misma, que asegura fue mal informado. Se les tilda de oportunistas y de que no han publicado nada al efecto. Gran debate público en EE.UU. Mucho revuelo: se pide legislación, que se notifique qué empresa quiere hacer clonaciones, que se convoque urgentemente la Comisión Nacional de Bioética, etc.

En lo referido hay elementos más que suficientes para una profunda reflexión. Yendo a lo más destacado, a su valoración ético-social, y a las implicaciones legal y jurídica que conllevan, bosquejaremos los asuntos siguientes:

## Clonación de preembriones

Durante la presentación del libro del Dr. Patrick Dickson *La revolución genética*, que tuvo lugar el 1.5.93, se afirmaba que se estaban haciendo clonaciones de preembriones; se recordó igualmente que la ley inglesa penaba estas actuaciones con diez años de cárcel.

Jerry Hall y Robert Stillmann comunicaron en la reunión de la Sociedad Americana de Fertilidad (AFS), celebrada el 13.10.93, que habían realizado clonación de preembriones humanos no viables, con autorización del Comité Científico de la Universidad George Washington, y sin apoyo económico del Estado. El hecho no provoca particular interés, ni al ser publicado en *Science*, pero adquiere resonancia después de su publicación en el *New York Times*, desatando la polémica.

Los autores citados llevaron a cabo la clonación en 17 preembriones no viables (eran poliploideos) de 2 a 8 células, rodeando los blastómeros con una membrana artificial. Aquéllos se desarrollaron hasta 48 clones, a una media de 3. Los de 8 células se desarrollaron a 8 células, los de cuatro células a dieciséis y los de 2 células a 32. La técnica consiste en extraer los blastómeros o células de un preembrión en período de *totipotencia*, y trasladarlos por separado (cada uno de ellos recubierto —comunicación de Sandra Yee, 1991— por una membrana sintética). La *totipotencia* es más efectiva cuando el preembrión tiene menos de 8 células.

Tiene sentido que la clonación realizada por Hall y Stillman mereciera en un principio la indiferencia científica, al no tratarse, como técnica, de nada novedoso, pues se había practicado ya en vegetales y en animales inferiores (batracios, ranas —Briss y Knigh—, renacuajos —Burdon—, etc., con un 30 % aproximadamente de éxitos), y superiores (terneras —Wilandsen—, con un 30 % de éxitos).

Posteriormente el rechazo científico fue mayoritario. ¿Está justificado? Veremos algunos argumentos, y para comenzar:

- Sólo el 20 % de los clones tendría éxito, mientras que el 80 % serían inviables.
- ¿Para qué donar preembriones anormales?
- ¿Cuáles son las ventajas?

Los autores plantearon que: a) «la clonación aún no se había hecho (en el laboratorio) en preembriones humanos», afirmación implícita de la voluntad de una acción sorpresa con procedimientos que se consideraba en el ámbito científico que no debían realizarse; b) «si no lo hacían ellos lo harían otros», comentario al que huelgan

los comentarios; c) «sería punto de referencia para provocar el debate social» sobre algunos aspectos de la biotecnología, lo que se ha conseguido, probando lo ya de sobra conocido: que la creación de preembriones humanos por clonación es posible. Otra cuestión muy distinta es si debe hacerse científica y técnicamente todo lo que se puede hacer.

En realidad, el debate social y ético ya se venía haciendo desde bastante tiempo atrás.

Aseguraban también que «el procedimiento sirve para mejorar la FIV (fecundación *in vitro*), pues al disponerse de más oocitos aumentan las posibilidades de gestación que se ofrecen a muchas mujeres». Pero la meta ideal de la FIV es otra, a saber, poder disponer de un solo oocito con garantías de fertilización, con lo que por otra parte se acabaría con el porcentaje añadido de embarazos múltiples (un 8 % aproximadamente en la actualidad) y sus riesgos (ver Ley 35/1988, artículos 1.3, 4, 14, 15, 16 y 17). En suma, la clonación no es lo deseable, sino el avance de la investigación sobre la fertilidad.

Además, decían, «se puede utilizar para detectar anomalías genéticas», pero realmente no hace falta clonar un preembrión para ello, pues basta con extraer uno de sus blastómeros para analizar con la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) las anomalías cromosómicas. Por otra parte, provocaría la destrucción de un preembrión posiblemente sano (ver Ley 35/1988, artículo 15 y ley 42/1988, artículo 9.2.B.b), y que desde algunas interpretaciones se considera como un aborto. Y, finalmente, no hay garantía de diagnóstico de todas las enfermedades genéticas.

Es evidente que la clonación con producción de cierta cantidad de preembriones abocará obligadamente a mantenerlos vivos por crioconservación (conservación en nitrógeno líquido predominantemente a -196 grados), y según sean o no viables, para diversos fines como:

- a) Su estudio científico.
- b) Usarlos en la FIV, incluida su donación.
- c) Crear gemelos univitelinos.

Esta última posibilidad alcanza a poner en marcha la FIV con uno de los preembriones clonados para tener un hijo exactamente igual a otro del ya fallecido, o para utilizarlo como donante por enfermedad del que ya existe. Ya hay precedentes de lo último: en el Hospital City Hope de Duarte, EE.UU., en abril de 1990 se posibilita a la Sra. Anissa Ayala a tener una hija (Ma-



risa), y cuando es un bebé se utiliza su médula ósea para transferirla a otra hija (también llamada Anissa) enferma de leucemia.

- d) Seleccionar el sexo del preembrión.
- e) En caso de aclaración de paternidad, podrían utilizarse para dilucidarla con las «huellas dactilares» genéticas.

## Gemelación artificial

Al efecto, remito a las consideraciones hechas por el Prof. Egozcue en la reunión del Comité Científico de la Sociedad Internacional de Bioética (SIBI) de 2 de julio y 27 de noviembre de 1998, y adoptadas como comunicado para los media, por estimarlas suficientemente elocuentes:

«La gemelación artificial consiste en la división de un embrión en dos. Se ha sugerido que este método podría ayudar a parejas en que la mujer produce pocos óvulos y se obtienen pocos embriones de ella; sin embargo, su aplicación no sería recomendable porque la técnica es agresiva y podría destruir los embriones, la efectividad sería baja, ya que probablemente se aplicaría a mujeres mayores con fracasos previos de FIV, y, finalmente, el resultado no es recomendable y la producción de individuos idénticos está prohibida en el Código Penal y por el Protocolo europeo de la Convención que se firmó aquí en Asturias.»

Puesto que la gemelación artificial es un procedimiento de clonación, es rechazada o está prohibida en los términos que se señalan en este trabajo.

## Transferencia de núcleos

Las consideraciones éticas al respecto se han vuelto a suscitar con intensidad tras el nacimiento de *Dolly*, por las implicaciones subyacentes, y más aún hace unos días tras conocerse que en los EE.UU. habían sido clonados embriones humanos con una técnica semejante (simplificando, llevar el núcleo de una célula diferenciada a un óvulo u ovocito previamente desnucleado) a la que dio lugar a la archifamosa oveja y estimular su desarrollo. Al hilo de ello surgen algunas consideraciones de especial interés.

El debate social provocado recientemente por la transferencia de núcleos de células somáticas diferenciadas (no ya de ovejas, como en el caso de *Dolly*, sino de humanos, con el resultado de un em-

brión hasta la fase de desarrollo de 400 células, que fue incinerado) a ovocitos humanos previamente desnucleados, pone sobre el tapete la posibilidad de crear individuos idénticos genéticamente por clonación, y merece aquí unos apuntes.

La célula humana creada a expensas del núcleo celular somático de un nacido (y por tanto, que acarrea y transmite la «experiencia genética» de su edad) y la membrana y el citoplasma «vírgenes» de un ovocito no es un cigoto (óvulo fecundado por un espermatozoide); por lo tanto ha de tener un *estatuto biológico* distinto y propio, y, obviamente, un nombre, así que la denominaré *nuclóvulo o nuclovo*. Pero si originariamente el nuclóvulo no es un cigoto hay que preguntarse de inmediato *cómo deberá ser tratado*, y en consecuencia, determinar previamente su *estatuto jurídico*, hacer las *valoraciones y propuestas bioéticas* pertinentes y señalar sus *posibilidades científicas*; tareas nada sencillas que se facilitarán con la información adecuada y el debate público sobre todo.

En cuanto al estatuto biológico: a) no es un cigoto: célula inicial del preembrión causada por la fertilización de un óvulo por un espermatozoide, con singamia –aproximación de los dos pronúcleos–, pero aún sin recombinación genética de ambos, pues la fusión se realizará en el núcleo de las dos células del cigoto de dos células que resulte de su división; no es por tanto embrión; b) no es idéntica a aquélla de la que procedió el núcleo transferido, pues tiene un citoplasma y una membrana extraños, y, por lo tanto, «todavía» no es su clon; c) puede desarrollarse como un preembrión, etc., y dar lugar a un individuo humano, y la célula somática, no; d) tampoco es idéntica al óvulo fecundado, porque a éste se le permutó el núcleo; e) la descendencia a partir de un cigoto es genéticamente distinta a la de sus progenitores y la de un nuclóvulo es igual a la de la célula somática citada (y la persona correspondiente no será su padre, sino su hermano clónico).

Con lo dicho, el estatuto ético del *nuclóvulo* circulará alrededor de los fines a que éste sirva. 1) A su clonación con *fines no reproductivos*: creación de líneas celulares o de tejidos para autotrasplantes sin riesgo inmunológico o para investigación, no debe haber mayores reservas éticas que presentar; por otra parte, la ley española Sobre Técnicas de Reproducción Asistida y el Código Penal no la sanciona. 2) La cuestión es otra si los nuclóvulos se utilizaren con *fines reproductivos*, para producir seres humanos genéticamente idénticos, clónicos; asunto que ha provocado un rechazo ético casi general (por lo demás, nuestro Código Penal castiga a quien realizar estas técnicas, y la Declaración de la UNESCO y el Protocolo a la Convención de Asturias de Bioética, elaborada en el seno del Consejo de Europa, las prohíben, por entender, desde una pers-

pectiva cargadamente ética, que constituyen una instrumentalización inadmisibles del ser humano).

## **Células madre o *stemcells***

Remito al profesor Grisolia, en su intervención en el Comité Científico de la SIBI (reunión de 28. I. 98), y al comunicado adoptado:

«Las llamadas células madre o *stemcells* son células *totipotentes*, es decir, capaces de originar las células diferenciadas que forman nuestros tejidos y órganos. Desde hace pocos años, las células madre hematopoyéticas, es decir, en la sangre, han atraído la atención de los científicos. Más recientemente se ha conseguido la reproducción de células totipotentes en el laboratorio utilizando blastocistos (embriones humanos), lo que permitiría conseguir la creación de células diferenciadas a la carta, hecho que sin duda tiene gran interés teórico y práctico, tal como el construir los propios tejidos para trasplantes sin problemas inmunológicos que hacen difícil frecuentemente encontrar un órgano apropiado, un tejido u órgano apropiado. No obstante, esta nueva técnica presentaría nuevos dilemas, ya que requiere blastocistos, es decir, embriones humanos poco desarrollados, pero no obstante humanos. Por lo tanto, este Comité recomienda la reflexión y el estudio cuidadoso de esta nueva tecnología.»

Las células madre se hallan en cantidad en el cordón umbilical, y en mucha menos cantidad, aunque también, en los tejidos corporales.

Sobre la interpretación bioética en relación con los diversos usos de las *stemcells*, lo expresado en este trabajo y las palabras antedichas son suficientemente aclaratorias. Si proceden de tejidos diferenciados, su utilización con fines no reproductivos no ofrece reservas éticas.

### **1) Clonación interespecífica (humana)**

*EFFECTOS BIOLÓGICOS* (Analogía con las experiencias en animales)

No es todo tan fácil ni tan simple.

Desconocemos muchas cosas de la localización y, sobre todo, de las funciones e interacciones de los genes, así como de las reacciones intra e interespecíficas núcleo-citoplasma, y la experiencia genética.

1) ¿Hay conflicto generacional celular en la clonación por transferencia de núcleos?

– ¿Tienen un cigoto, un nuclóvulo y los individuos a que den lugar, las mismas expectativas de desarrollo?

- Papel del citoplasma receptor *virgen* del ovocito desnucado.
- Papel del *genoma con experiencia* que contiene el núcleo de la célula somática que se transfiere. Papel de su citoplasma, también con experiencia.

– ¿Tienen la edad (vejez) vivida?

– ¿Tienen la *experiencia genética* del adulto del que procede?

- Experiencia medioambiental (radiaciones, agentes físicos o químicos; conservantes o colorantes de alimentos; enfermedades sufridas por virus, bacterias, etc.).
- Experiencia del medio cultural.
- Experiencia mental. Memoria celular.

2) Consecuencias patológicas de la fusión. Clon, ¿a costa de qué?

– ¿Tiene al nacer la edad del núcleo transferido o envejecerá con rapidez?

– Sexo único (el del individuo donante del núcleo).

– Transferencia de núcleo con su *carga vital*.

Patologías observadas en ovejas (Willmut, Griffin):

- Mortalidad precoz (50 %, por daños genéticos).
- Malformaciones o taras (por mutaciones).
- Aborto.
- Enfermedades (cáncer, etc.).
- Sólo un éxito de 277 preñeces en ovejas.

– Clonación sistemática, seriada.

- ¿No recombinación de gametos = a la larga, ¿fragilidad del genoma?, ¿retroceso evolutivo?
- Grandes series = Genoma uniforme = ¿Genoma frágil? ¿Genoma aislado? En sí mismo, tiene analogías con un aislamiento simpátrico.  
Consanguinidad.  
Mutaciones serias.

- ¿Involución?
- ¿Hacia una nueva y forzada especiación?

## Aspectos individuales

Hipótesis:

A) *El ser clónico* (hombre o mujer):

### 1) FILIACIÓN

- ¿Es un HIJO o un HERMANO?
  - Procede de una célula somática de una sola persona. No sería nunca hijo de una pareja.
  - En realidad es HIJO de los ABUELOS, y HERMANO monocigótico del proveedor del núcleo de la célula somática.

### 2) IDENTIDAD

- ¿Es un INDIVIDUO o es una COPIA de OTRO/A?
  - Genéticamente es idéntico al OTRO/A.
  - ¿Soy tu hijo, tu hermano, o soy TÚ mismo?
- Unidad y Unicidad.
  - ¿Es uno solo? Tal vez.
  - ¿Es único e irreplicable? No.
- ¿Tiene personalidad propia o doble? (también la del OTRO/A)?
  - El 2.1.97 se hizo público el descubrimiento de un gen que participa en el aprendizaje de la memoria.  
¿Hay una memoria celular, hereditaria? Sí.  
Experimentos ratas/laberinto.
  - El factor medioambiental.
  - El efecto cultural.  
(Los genes no lo son todo). Estudios con gemelos (ver Pí-nillos).

### 3) ¿ACEPTARÁ?

- El cómo, por qué y para qué lo crearon apostó y así?
- Una personalidad e identidad condicionadas genéticamente por la arbitrariedad del OTRO/A.
- La pérdida del derecho a la diversidad y la autonomía.

- El sexo que le han asignado.
- Las enfermedades o taras hereditarias de otro.
- La vejez prematura.

(Tesis: *Experiencia genética heredada.*)

B) La mujer receptora (analogías con el suceso *Dolly*).

- ¿Se someterá a 277 ensayos de FIVTE para lograr un solo descendiente?
- Si ello fuera posible, ¿soportará física y psicológicamente 276 embarazos fallidos y la mortandad o patología de los frutos frustrados?
- ¿Encargará 276-277 gestaciones a otras tantas madres de alquiler? ¿Se prestarán a ello? ¿Soportará las patologías del apartado anterior? Otras consecuencias.
- Si aporta la célula somática será HERMANA, no MADRE biológica del ser nacido.
- Si no la aporta, no existirá filiación con él (salvo que pudiera adoptarlo, pero es otra cuestión).

2) **CLONACIÓN INTERESPECÍFICA** (núcleo humano, ovocito de otra especie).

Además de lo antedicho:

- 1) ¿Hay reacciones de especificidad de especie? ¿Con qué consecuencias?
- 2) ¿Cómo influye el citoplasma del ovocito animal sobre los genes y núcleo humano transferido?
- 3) ¿Este *nuclóvulo* es en realidad una célula humana?

¿El preembrión logrado sería realmente humano? ¿Y el individuo?

En el caso de transferencia nuclear y clonación entre especies distintas (vaca/hombre), además del conflicto generacional antedicho, ¿lo hay también de especificidad de especie? (que por lo que sabemos del experimento de Worcester, las células murieron a las dos semanas, sin aclarar si se habían o no dividido). Y si prosperan los intentos, ¿las nuevas células a que se pretende trasplantar núcleos humanos llevarán consigo la «experiencia vacuna» de su citoplasma, con su ARN, mitocondrias, etc., peculiares? En definitiva, las

células, tejidos o incluso individuos resultantes, serán a medias humanos y la especie animal elegida.

Sobre la transferencia de núcleos para formar *nuclóvulos*, con fines reproductivos o no, en el terreno práctico queda mucho por conocer y también por hacer, y sin duda con el tiempo se realizará. Los aspectos bioéticos cobran aquí una dimensión universal para el debate, que si ya de por sí exacerba los sentimientos y opiniones con la clonación intraespecífica de seres humanos, con la interespecífica humana/animal la controversia ética y social puede alcanzar límites extremos.

Las tesis argumentales en contra de la clonación humana ponen énfasis en la:

- *Instrumentalización del hombre.*
  - Agresión a la dignidad (personalidad, identidad, libertad, autonomía). Degradación de los valores y atributos humanos.
  - Daño a la diversidad y a la especie.
- *Responsabilidad.*
  - Del científico.
- *Patologías (mortalidad, enfermedades y taras hereditarias, cáncer, etc.).*
  - De la Sociedad humana.
- *La dignidad colectiva en entredicho.*
- *Hechos consumados (intencionalidad, fines).*

## Aspectos legales

Primero: *Clonación intraespecífica.*

- 1) *Clonación de células con fines no reproductivos.*
  - Somáticas. No hay regulación legal.
  - Células madre. No hay regulación legal.
- 2) *Gemelación artificial (ver arriba).* Tratándose de una clonación, está sometida al rechazo de instituciones y la prohibición legal.

*Clonación de preembriones (blastómeros).*

La prohibición se recoge en leyes y recomendaciones (ver, por ejemplo: Ley española 35/1988, artículos 3 y 20, y Código Penal; Consejo de Europa, Recomendaciones 1.046 y 1.100 y el Protocolo la Convención de Asturias Bioética; Recomendación A 372/88 de la Unión Europea; Ley alemana del año 1991 sobre protección del embrión, artículo 3), etc.

3) *Creación de seres humanos por clonación u otros procedimientos.*

La creación de *nuclóvulos* no está prohibida en España, dado que no se trata de «óvulos fecundados con un fin distinto a la procreación» (art. 3 de la Ley 35/1988, sobre Técnicas de Reproducción Asistida, y Código Penal de 1995). Otra cosa es lo que ocurra posteriormente con ellos, por ejemplo: a) ser clonados con fines no reproductores, a lo que tampoco hay referencia u objeción legal; y b) permitir su desarrollo con intención reproductiva (en el Código Penal, artículo 161.2, se castiga a «quien realice la creación de un individuo idéntico a otro por clonación en cualquiera de sus variantes», en cuyo caso a partir de entonces, y no antes, su comportamiento será el de un cigoto, y como éste, en condiciones normales de gestación se transformará sucesivamente en preembrión-embrión-feto y dará lugar a un individuo humano clónico. Finalmente, el artículo 161.1 del Código Penal de 1995 establece que «quienes fecunden óvulos humanos con cualquier fin distinto a la procreación humana serán castigados con la pena de prisión de uno a cinco años e inhabilitación especial para oficio, profesión o cargo de uno a seis años».

En la Ley 35/1988 (art. 20.2.B) se sancionan como infracciones muy graves: j) transferir al útero gametos o preembriones sin las debidas garantías de viabilidad; n) la manipulación genética con fines no terapéuticos o terapéuticos no autorizados; o) la creación de seres humanos idénticos por clonación en cualquiera de sus variantes u otros procedimientos (pasó a Código Penal); p) el intercambio genético humano o recombinado con otras especies; s) la *ectogénesis* o creación de un ser humano individualizado en el laboratorio.

Se encuentran analogías en: la Ley alemana de Protección del embrión, de 1991 (art. 4, hasta cinco años de prisión); la Ley de embriología, de 1990, del Reino Unido, art. 3.3, con hasta diez años de prisión; la legislación francesa, art. 6.4 y 511, que impone hasta veinte años de prisión por la selección de los seres humanos. Y a su vez:



– El Consejo de Europa

- Recomendación 1.046 (1986); a enmienda mía, «la clonación de seres humanos es una desviación no deseable de las técnicas». Apartado 14 A) IV.
- Recomendación 1.100 (1989), de la que fui ponente, va también en contra de la clonación de seres humanos.
- *Convención de Asturias de Bioética (4.4.97)*.

– *Protocolo de prohibición de la clonación de seres humanos con idéntico núcleo genético*, arts. 1 y 2 (París, 12.1.98).

– La Unión Europea

- Resolución del Parlamento Europeo de 15.1.98 pidiendo la prohibición expresa y su reafirmación en una Conferencia Mundial.

– La UNESCO

- Declaración sobre genoma humano y derechos humanos (noviembre de 1997), art. 11. No debe autorizarse la clonación de humanos.

– En los EE.UU.

- El presidente Clinton y su portavoz reiteraron la necesidad de legislar para prohibir la clonación de individuos humanos (enero 1997). Anteriormente había pedido una moratoria de cinco años.
- Un Estado legisló recientemente en contra.

Segundo: *Clonación interespecífica*.

En los aspectos legales, el caso de Worcester no halla referencias actualmente en la Ley 35/1988, sobre técnicas de reproducción asistida, habida cuenta que en sentido estricto no es tal fertilización la transferencia de núcleos. Por otra parte, en la Ley 42/1988 (art. 9.2.B.b) se consideran infracciones graves «la creación y mantenimiento de embriones y fetos vivos en el útero o fuera de él, con cualquier fin distinto a la procreación», lo que ha de entenderse vinculado a lo establecido en el artículo 3 de la ley 35/1988.

Si la intención era la clonación de individuos humanos (¿lo serían realmente?), el Código Penal (art. 161.2) castiga con uno a cinco

años de prisión y seis a diez años de inhabilitación por crear seres humanos por clonación u otros procedimientos de selección de la raza. Y lo mismo ocurre en leyes o normas de otros países o en los documentos de las instituciones internacionales antes mencionadas.

Hay, en consecuencia, pronunciamientos legales de tales instancias o en los referidos documentos contra la creación de seres humanos idénticos por las técnicas de clonación u otras; pero no los hay contra la transferencia de núcleos (intra o interespecífica) para producir y cultivar células o tejidos más o menos organizados a fines de trasplante.

Tercero: *Otras actuaciones legales en España* (relacionada con lo antedicho).

a) *Selección del sexo.*

- Ley 35/88, art. 20 2B n). Se considera infracción muy grave si se hace con fines no terapéuticos o terapéuticos no autorizados.
- Ley 42/88, art. 8 (tecnología genética). Se autoriza sólo con fines diagnósticos (prenatal) o terapéuticos de enfermedades hereditarias (ligadas al sexo, etc.).
- Código Penal, art. 161.1. Se castiga la fecundación de óvulos humanos con cualquier fin distinto a la procreación humana.

b) *Lesiones y daños:*

—*Daños al genotipo.*

- Ley 42/1988, art. 9.º 2.B.a), lo considera infracción muy grave.
- Ley 35/1988, arts. 1, 2 ó 13 (las intervenciones terapéuticas sobre el preembrión vivo, *in vitro*, sólo: 1) para tratar una enfermedad o impedir su transmisión, y 2) si no influye sobre los caracteres hereditarios no patológicos, ni busca la selección de los individuos o de la raza), y el 20.2.B.j).
- Código Penal (art. 159); 1. La manipulación genética humana con fines distintos a la eliminación o disminución de taras o enfermedades graves, de manera que se altere el

genotipo, se castigará con prisión de dos a seis años e inhabilitación de siete a diez años si se altera el genotipo; 2. Si esta alteración se produce por imprudencia grave, multa (seis a quince meses) e inhabilitación (uno a tres años).

– *Lesiones al feto.*

- Código Penal (arts. 157 y 158). Si por cualquier medio o procedimiento se causan graves enfermedades físicas o psíquicas o lesiones que impidan el desarrollo del feto, se castigará con prisión (1-4 años) e inhabilitación para la profesión sanitaria (2 a 8 años). Si es por imprudencia grave, arresto de 7 a 24 fines de semana. Si es por imprudencia profesional, asimismo inhabilitación especial de seis meses a dos años. La embarazada no será penada a tenor de este precepto.

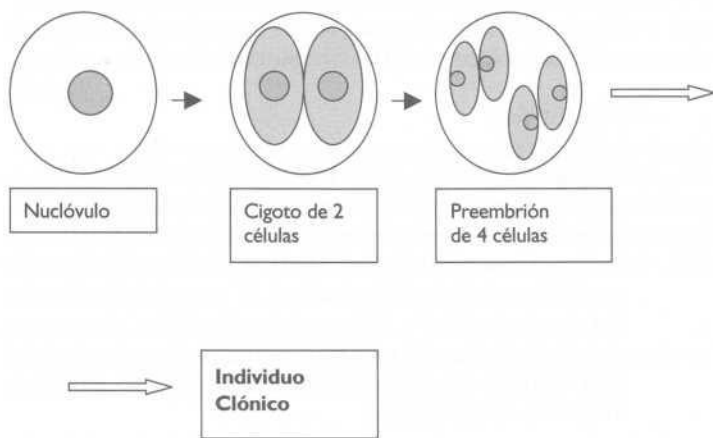
– *Producción de aborto.*

- Código Penal (arts. 144 a 146). Sin consentimiento y con engaño, o con consentimiento de la mujer fuera de los casos permitidos por la ley, prisión (1 a 3 años) e inhabilitación especial para las profesiones sanitarias (1 a 6 años). El que provoque el aborto por imprudencia grave será castigado con pena de arresto de 12 a 24 fines de semana. Si se ocasiona por imprudencia profesional, se impondrá asimismo pena de inhabilitación especial de uno a tres años. La embarazada no será penada a tenor de este precepto.

- c) *Consentimiento informado.* A él hacen referencia, como requisito inexcusable para cualquier intervención médica: la Ley 14/1986 General de Sanidad, y las Leyes 35/1988, 42/1988 y Código Penal.

Gijón, octubre de 1999

**FIGURA I**

















**Santiago Grisolia.** Coordinador y responsable tanto de esta publicación como del Encuentro Internacional del que es resultado, es premio Príncipe de Asturias de Ciencias, Doctor "Honoris Causa" por numerosas universidades, Presidente del Comité de Coordinación de la UNESCO para el Genoma Humano, de la Fundación Valenciana de Estudios Avanzados y del Consejo Valenciano de la Cultura. El profesor Grisolia ha sido el impulsor de diversas iniciativas desarrolladas por la Fundación BBVA acerca de las varias dimensiones del Proyecto Genoma Humano, desde las de carácter científico-tecnológico a las de naturaleza ética y jurídica.

## FUNDACION BBVA

El trasplante de tejidos u órganos procedentes de seres humanos es una alternativa terapéutica que ha ido ganando adeptos en la medida en que los procedimientos técnicos y quirúrgicos se han optimizado. Esto ha conducido a un incremento en la demanda del trasplante, mientras que la oferta permanece relativamente estacionaria. Esta dificultad para satisfacer las solicitudes de órganos hace que el trasplante a humanos de órganos o tejidos procedentes de animales (xenotrasplante) sea contemplado como una alternativa con gran potencial terapéutico.

Por otra parte, el espectacular avance de las técnicas de clonación de células humanas hace concebir renovadas esperanzas en la búsqueda de fuentes alternativas de tejidos u órganos para el trasplante con garantías de seguridad para el paciente. Aunque técnicamente posible, la clonación completa de un ser humano carece de justificación y resulta en la actualidad inaceptable. Sin embargo, otras aplicaciones del trasplante nuclear tienen una considerable importancia, ya que ofrecen el modo de alcanzar una fuente técnicamente segura y virtualmente inagotable de tejidos u órganos.

Es evidente que, además de los problemas técnicos, el xenotrasplante y la clonación de órganos y tejidos suscitan también cuestiones éticas, relacionadas tanto con los animales (modificación genética, sacrificio, especie utilizada) y el propio paciente (problemas de índole psicosocial) como con la clonación de células humanas con fines terapéuticos.

La Fundación BBVA, al reunir aquí las contribuciones del "VI Encuentro Internacional sobre el Proyecto Genoma Humano: trasplantes y clonación humana en el siglo XXI", celebrado en la sede de Valencia de la UIMP, continúa una labor de investigación y debate de las implicaciones del estudio del Genoma Humano iniciada hace ya diez años. Fruto de este programa, en el que se ha prestado una atención especial a la cooperación internacional mediante la organización de encuentros en los que especialistas de todo el mundo han tenido la oportunidad de intercambiar sus puntos de vista, son las publicaciones de la Fundación *El Proyecto Genoma Humano: Ética; El Derecho ante el Proyecto Genoma Humano; Terapia Génica; y Compromisos con el futuro del Proyecto Genoma Humano.*

ISBN 84-95163-42-x



9 788495 163424

TRANSPANTES Y CLONAS HUMANAS EN EL SIGLO XXI

SANTIAGO GRISOLOA (ED.)

FUNDACION BBVA

TRANSPLANTS AND HUMANS IN THE 21<sup>ST</sup> CENTURY