

CONTROVÉRSIAS IMUNOLÓGICAS INERENTES AO XENO- TRANSPLANTE

Gabriel Dobre Bitanti

Biomédico – FITL/AEMS

Natalia Prearo Moço

Biomédica, Doutora em Patologia – UNESP
Docente nas Faculdades Integradas de Três Lagoas – FITL/AEMS

Catarina Akiko Miyamoto

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) – USP;
Pós-doutorado – Weill Medical College of Cornell University;
Docente das Faculdades Integradas de Três Lagoas – FITL/AEMS

Resumo

A história recente tem demonstrado que transplantes de órgãos, tecidos e células humanas prolonga e melhora a qualidade da vida dos receptores. De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2009, globalmente, cerca de 66.000 rins, 21.000 fígados e 6.000 corações são transplantados todos os anos. O xenotransplante bem-sucedido tem potencial para tratar uma ampla gama de doenças graves como diabetes, doenças cardíacas, renais, entre outras. Além disso, esta metodologia demonstra grande potencial de fornecimento quase ilimitado de órgãos doadores saudáveis. Há mais de 300 anos, o xenotransplante recebe a atenção dos seres humanos e ao longo dos anos inúmeras tentativas têm sido realizadas. No entanto, uma das grandes barreiras para a sua utilização é a incompatibilidade imunológica entre o receptor e o doador que pode causar quadro de rejeição. Uma possível solução para contornar esta situação é a modificação genética dos animais para que seus órgãos e tecidos tenham antigenicidade reduzida e aumente a compatibilidade fisiológica com os seres humanos.

PALAVRAS-CHAVE: rejeição xenotransplante; transplante porco humano; infecções PERV.

1 INTRODUÇÃO

O transplante de órgãos, tecidos e células humanas é uma forma de substituir os que não funcionam apropriadamente no organismo. A história recente demonstra que este procedimento tem prolongado e melhorado a qualidade da vida dos receptores. De acordo com os dados da OMS de 2009, globalmente, cerca de 66.000 rins, 21.000 fígados e 6.000 corações são transplantados todos os anos (WHO, 2009). Porém, o número de doadores e/ou de potenciais doadores a nível mundial é insuficiente. Esta situação faz com que os receptores permaneçam em uma longa lista de espera, situação que gera angústia aos pacientes e familiares (MORAES, GALLANI; MENEGHIN, 2006). Uma das possíveis saídas para diminuir a fila de espera e angústia é o xenotransplante (transplante entre espécies distintas).

O xenotransplante bem-sucedido tem potencial para tratar uma ampla gama de doenças graves como diabetes, doenças cardíacas, renais, entre outras (WHO, 2009). Além disso, esta metodologia demonstra grande potencial de fornecimento quase ilimitado de órgãos doadores saudáveis (BIGAM et al., 1999).

Uma das grandes barreiras para a utilização do xenotransplante é a incompatibilidade imunológica entre doador e receptor, e este pode reconhecer o enxerto como estranho e danificá-lo por rejeição. Este problema é previsível, uma vez que tem sido demonstrada rejeição de órgãos mesmo nos alotransplantes (ZHONG; PLATT, 2005; CASCALHO; PLATT, 2003).

Existem outras barreiras a serem transpostas, como a xenoosmose e as discrepâncias fisiológicas entre as espécies envolvidas. A primeira é devido aos retrovírus endógenos porcinos (PERVs) e sua capacidade em infectar células humanas *in vitro*, o que representa um risco à saúde do receptor (BLUSCH; PATIENCE; MARTIN, 2002). As discrepâncias fisiológicas entre as espécies envolvidas ocorrem uma vez que existe grande diferença nas proteínas e nos hormônios expressos em cada espécie (BUCHER; MOREL; BÜHLER, 2005).

Há também controvérsias em relação à ética. Alguns são contra este procedimento devido à possível exposição dos receptores aos PERVs e consequente espalhamento a seus familiares e comunidade com possível origem de uma xenoosmose (BIGAM et al, 1999). Por outro lado, outros aprovam uma vez que esta metodologia tem potencial de ser fonte abundante de órgãos (WHO, 2009).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é descrever as aplicações e implicações do xenotransplante, os principais antígenos xenorreativos e demonstrar a possibilidade da utilização da técnica de edição genômica CRISPR/Cas9 para inativação dos antígenos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho baseou-se em pesquisa bibliográfica descritiva. A literatura científica explorada foi a nível nacional e internacional de livros e artigos específicos ao tema encontrados em plataformas especializadas como *PubMed*, *SciELO* e *Lilacs*.

Dentre as palavras-chave incluíram-se xenotransplante, imunologia xenotransplante, ética xenotransplante, edição genômica, entre outras. A compilação dos dados priorizou estudos recentes (1999-2017), no entanto não se excluíram publicações antigas com material relevante.

4 ALOTRANSPLANTE

Alotransplante corresponde ao transplante de tecidos entre membros da própria espécie. Neste tipo de metodologia, a resposta imunológica é controlada pela administração de imunossuppressores. No entanto, mesmo com a resposta imunológica controlada, em muitos dos casos ocorrem rejeição crônica de enxertos transplantados (CASCALHO; PLATT, 2003).

4.1 Reconhecimento Imunológico nos Alotransplantes

O polimorfismo do complexo MHC faz com que haja a expressão de uma grande variedade de diferentes antígenos. Esta condição torna improvável que dois indivíduos em uma população mista apresentem exatamente o mesmo grupo de moléculas do complexo. Devido a esses fatos, as reações de rejeição são muito comuns mesmo em alotransplantes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O sistema imune possui dois mecanismos principais (direto e indireto) pelos quais reconhece e responde às moléculas do MHC do enxerto. No mecanismo de reconhecimento direto, as células T do hospedeiro identificam as moléculas MHC estranhas (alogênicas) presentes nas células do enxerto. As moléculas alogênicas do MHC imitam estruturalmente o MHC do indivíduo, portanto, o reconhecimento do MHC alogênico é particularmente uma reação imunológica cruzada. O efeito mais significativo do reconhecimento direto é o recrutamento das células T CD8⁺ do hospedeiro, que reconhecem as moléculas de MHC de classe I no enxerto. Essas células T se diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTLs), que em seus grânulos contêm proteases chamadas de granzimas que penetram nas células-alvo e clivam as proteínas, desse modo, o CTLs exterminam as células-alvo induzindo de forma direta a apoptose, sem a ação das mitocôndrias ou dos receptores de morte. As células T auxiliares CD4⁺ do hospedeiro são incitadas a se proliferar e a liberar citocinas ao reconhecerem moléculas MHC da classe II do doador, levando a uma resposta inflamatória (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Por outro lado,

reconhecimento indireto as células T CD4⁺ do hospedeiro identificam as moléculas do MHC do doador depois que essas moléculas são capturadas, processadas e apresentadas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) do hospedeiro. Esse processo é similar ao processamento e apresentação fisiológicos de outros antígenos. As células T CD4⁺ ativadas então reconhecem as APCs expondo os antígenos do enxerto e posteriormente é secretado citocinas que levam a inflamação que irá causar dano ao enxerto (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

5 XENOTRANSPLANTE

O xenotransplante é o transplante de órgãos ou tecidos transplantados entre diferentes espécies. À primeira vista, o transplante de órgãos de espécies mais próximas ao homem parece ser ideal (primatas), no entanto existem desvantagens significativas, que incluem transmissão de doenças infecciosas e o custo da criação e manutenção dos mesmos. A fonte mais promissora de doação de órgãos para os humanos são os porcos. Os suínos atingem rapidamente a sua fase adulta, são fáceis de reproduzir, e também o tamanho dos seus órgãos e a fisiologia são notavelmente similares aos dos humanos (BIGAM et al., 1999).

5.1 Controvérsias Imunológicas

Assim como nos alotransplantes, no xenotransplante existem complicações imunológicas. Inicialmente, o receptor do xenoenxerto estimula a produção de anticorpos xenorreativos ao sistema complemento e as células NK iniciam a resposta celular, o que resulta em rejeição hiperaguda, aguda (vascular) e celular (BIGAM et al., 1999).

As células NK, que são importantes componentes celulares do sistema imune inato, têm grande relevância para o xenotransplante. Tais células possuem um mecanismo específico de ativação, o qual é regulado por um balanço entre sinais inibitórios e ativadores que são gerados a partir de duas classes de receptores denominados receptores de inibição e receptores de ativação. Os receptores com atividade inibitória se ligam a moléculas do MHC de classe I próprias, enquanto os receptores ativadores reconhecem moléculas de superfície da maioria das células estranhas ao organismo e também moléculas presentes em produtos microbianos. Quando ocorre ligação simultânea dos receptores de ativação e de inibição a célula

NK não é ativada, pois a função inibitória é sempre dominante, ou seja, para que haja ativação da célula NK é necessária a ligação do receptor de ativação na ausência da ligação do receptor de inibição (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). No caso do xenotransplante, quando as interações inibitórias ocorrerem de forma insuficiente para equilibrar as ativadoras resulta-se na destruição do xenoenxerto, causando rejeição hiperaguda, aguda (ou vascular), celular e crônica (MIDDLETON; CURRAN; MAXWELL, 2002; BIGAM et al., 1999).

5.1.1 Rejeição Hiperaguda

A rejeição hiperaguda é causada por anticorpos xenorreativos preexistentes e proteínas do sistema complemento do receptor que atuam contra as células endoteliais do órgão animal. Caracteriza-se pela formação de trombos nos vasos sanguíneos do enxerto; tem início dentro das primeiras 24 horas após o processo cirúrgico, e a mais comum ocorre dentro da primeira hora após a perfusão do sangue pelo órgão recém-transplantado. O mecanismo pelo qual se dá a oclusão trombótica dos vasos do enxerto é decorrente da ação de anticorpos preexistentes na circulação do receptor, os quais se ligam a antígenos presentes na vasculatura do enxerto (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Como consequência, ocorre a perda de função do enxerto e à morte do órgão dentro de um período de horas. A rejeição hiperaguda é caracterizada pelo desenvolvimento de trombos plaquetários e hemorragias no enxerto (COOPER; EKSER; TECTOR, 2015).

No caso do xenotransplante de órgãos porcinos, a rejeição hiperaguda acontece em maior parte pela presença do carboidrato 1,3-galactose (Gal) nas membranas celulares dos suínos as quais estão ausentes nas membranas celulares de humanos. A primeira resposta de rejeição aguda é a ativação da coagulação sanguínea que resulta em um trombo capaz de fazer a oclusão dos vasos (SQUINTO, 1997). A formação do trombo também pode ocorrer pela interação do fator de von Willebrand porcino, o qual estimula a agregação plaquetária humana de forma rápida e espontânea, o que causa a rejeição vascular aguda (PUGA YUNG et al., 2017; COWAN; ROBSON; D'APICE, 2011).

A grande maioria dos animais expressa Gal na superfície de suas células, porém o ser humano e macacos mais próximos na escala evolutiva perderam a capacidade de sintetizar Gal devido à inativação genética da enzima α -1,3-galactosiltransferase (COWAN; ROBSON; D'APICE, 2011). Os anticorpos se

desenvolvem durante a vida neonatal; isso ocorre pela grande exposição a bactérias que expressam Gal que colonizam o trato gastrointestinal. Os seres humanos produzem anticorpos anti-Gal que permanecem na circulação e ativam a destruição mediada pelo complemento de qualquer célula ou tecido que expresse a α -Gal em sua membrana (GALILI; 2005).

5.1.2 Rejeição Aguda

A rejeição aguda é um processo de lesão da vasculatura do enxerto decorrente da ação de linfócitos T e anticorpos xenorreativos induzidos. Geralmente, tem início na primeira semana após a realização do transplante. Os linfócitos T CD8⁺ reconhecem as moléculas MHC classe I presentes no endotélio do enxerto e causam lesão direta à vasculatura, e ao mesmo tempo, linfócitos T CD4⁺ secretam citocinas inflamatórias que recrutam leucócitos para o local. Os anticorpos participam da rejeição aguda de modo secundário, podendo mediar uma resposta imune humoral contra antígenos específicos do endotélio dos vasos sanguíneos do enxerto, ativando o sistema complemento (COOPER; EKSER; TECTOR, 2015; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; FARIA et al., 2008).

5.1.3 Rejeição Crônica

A rejeição crônica é a reação indesejável que se observa depois de um longo período de tempo após exposição a um aloenxerto que acarreta em uma vasculopatia caracterizada por fibrose e anormalidades vasculares. Os mecanismos desencadeadores da rejeição crônica são menos compreendidos, entretanto acredita-se que a fibrose e a lesão vascular podem ser causadas pelas citocinas liberadas pelas células T ativadas que atuam nas células da parede vascular. Nos xenoenxertos que sobrevivem por mais de algumas semanas podem desenvolver características de vasculopatia crônica, semelhante à rejeição crônica notada nos aloenxertos. Os fatores que levam a essa vasculopatia continuam desconhecidos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; EKSER; COOPER, 2010).

Os tipos de rejeição aguda e crônica podem ocorrer também em transplantes intra espécies (COELHO, 2004).

5.2 Solução Imunológica

A modificação genética tem se tornado a técnica chave para a criação de

porcos com órgãos e tecidos com antigenicidade reduzida e aumento da compatibilidade com seres humanos. O sistema CRISPR/Cas9 é a melhor escolha para a produção de porcos com menor imunogenicidade para serem utilizados no xenotransplante (COWAN; TECTOR, 2017). Além disso, este sistema oferece oportunidade de trocar com precisão quaisquer genes de qualquer genoma (MAEDER; GERSBACH, 2016).

6 EDIÇÃO GENÔMICA PELO SISTEMA CRISPR/Cas9

O sistema de curtas repetições palindrômicas regularmente interespaçadas/genes associados a CRISPR (CRISPR/Cas9 do inglês – *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9*) (BARRANGOU et al., 2007) é uma ferramenta de edição genômica eficiente que pode editar alvos múltiplos de forma simultânea. O CRISPR atua como um tipo de imunidade adaptativa nos procaríotos, a qual pode degradar genes exógenos de um fago invasor ou plasmídeo. Foi observado pela primeira vez no ano de 1987, em bactérias da espécie *Escherichia coli* (LIU et al., 2017; ISHINO et al., 1987).

Existem três principais tipos CRISPR, sendo que o tipo II é o mais importante, pois é o mais simples, eficiente, específico e utiliza apenas uma única proteína para sua nuclease, a Cas9. A endonuclease Cas9 atua em conjunto com dois RNAs guia: CRISPR RNA (crRNA) e CRISPR RNA de transativação (tracrRNA) (CHARPENTIER; DOUDNA, 2013).

Com o intuito de simplificar e otimizar o sistema CRISPR, a tecnologia do DNA recombinante pode ser empregada para construção de um único fragmento gênico contendo as sequências crRNA e tracrRNA separadas por um arco denominado guia único de RNA (single guide RNA ou sgRNA), o qual atua na clivagem específica de Cas9 no DNA (JINEK et al., 2012). As sequências conservadas de 2-5 pb, conhecidas como motivo adjacente ao proto-espaçador (PAM), localizadas no lado oposto à da hibridização RNA-DNA, são necessárias para o reconhecimento do DNA pela Cas9 (BOLOTIN et al., 2005). Uma vez que o reconhecimento ocorre, a clivagem de DNA de cadeia dupla é realizada por dois domínios de Cas9, um cliva a cadeia complementar à sequência guia crRNA e outro, a não complementar. Por esse mecanismo, as nucleases podem ser programadas

com sgRNA personalizado para reconhecer qualquer *locus* específico sobre o DNA genômico (JINEK et al., 2012).

6.1 Expressão de HLA da Classe I na Superfície Celular do Doador

Uma das estratégias para impedir a rejeição hiperaguda e aguda é a adição de HLA da Classe I à superfície celular do animal. Isto possibilita uma ligação inibitória para as células *Natural-Killer* humanas e assim diminuir a habilidade de agressão ao xenotecido. Por este motivo, foram gerados suínos transgênicos humanos que expressam HLA-E; estudos indicam que suas células são realmente resistentes à citotoxicidade gerada pelas células NK humana em comparação com células de suíno de tipo selvagem (WEISS et al., 2009).

7 DISCREPÂNCIA FISIOLÓGICA

A grande diferença filogenética entre suínos e humanos pode limitar o uso do xenotransplante devido aos distintos processos fisiológicos de ambos. Porém, ainda não existem informações suficientes e precisas sobre como os órgãos animais transplantados nos seres humanos funcionam. Sabe-se que xenoenxertos de sucesso provindo de animais são predominantemente órgãos de função mecânica, como coração ou pulmões. A compatibilidade fisiológica de órgãos mecânicos em um receptor humano pode ser alcançada mais facilmente do que órgãos com atividades metabólicas, como rins ou fígado. Os rins transplantados funcionam bem em vários níveis, porém não têm compatibilidade com a função da eritropoietina (EPO), uma vez que a sequência da proteína porcina e da humana difere em maior parte. O mesmo ocorre em transplantes de fígado, nos quais as diferenças entre as proteínas produzidas podem impedir o funcionamento adequado do órgão no corpo humano. Esses motivos tornam a realização do xenotransplante mais difícil uma vez que órgãos produzem enzimas e metabolitos diferentes entre as espécies (DENNER; TÖNJES, 2012; MAGRE; TAKEUCHI; BARTOSCH, 2003).

8 XENOZOONOSE

A transmissão de zoonoses, ou seja, a transferência de agentes patogênicos entre espécies é ressaltada no xenotransplante, uma vez que as barreiras da

imunidade inata presente como na pele e nas mucosas são ignoradas quando tecidos internos do animal entram em contato com os do homem. Em circunstâncias normais, os patógenos animais não são infecciosos para os seres humanos, porém se tornam infecciosos em um cenário de xenotransplante. Mesmo com o desenvolvimento de porcos livres de agentes infecciosos exógenos conhecidos, não é possível remover retrovírus endógenos, como o Gammaretrovirus (PERV). O genoma porcino transporta pelo menos 50 cópias provirais de PERV, das quais algumas são capazes de infectar células humanas *in vitro* (TAKEFMAN et al., 2002).

8.1 Solução da Xenozoonose

Apesar de já ter sido documentada a infecção de PERV em células humanas *in vitro*, a infecção de seres humanos ou primatas não humanos não tem sido observada *in vivo*, mesmo após exposição a tecidos vivos porcinos. Acredita-se que essas diferenças entre resultados *in vivo* e *in vitro* sejam devido à presença da imunidade inata dos primatas contra PERV (BUCHER; MOREL; BÜHLER, 2005).

Mesmo que seja possível a transmissão do PERV para células humanas, um estudo recente mostra a obtenção de linhagens celulares primárias porcina inativadas para PERV, com a utilização do sistema CRISPR/Cas9. Esta linhagem pode servir como cepa de base, que pode ser projetada para fornecer tecidos livres e eficazes para xenotransplantes (NIU et al., 2017).

9 ÉTICA NO XENOTRANSPLANTE

O xenotransplante gera muitos argumentos relacionados à aplicação e regulamentação de novas biotecnologias. Dentre as questões éticas levantadas ao xenotransplante, incluem-se xenozoonose, direitos dos animais e potenciais transtornos psicológicos ao receptor de tecidos de fonte não humana. Além disso, os candidatos aos primeiros ensaios desse procedimento são pacientes excluídos do alotransplante por ser considerado de excessivo risco ou por falta de disponibilidade de doadores (BIGAM et al., 1999).

Caso alguns países comecem a planejar e realizar ensaios clínicos de xenotransplante sem regras ou regulamentos específicos, há o risco de desenvolver ou espalhar novas doenças. Para evitar essas situações, a Associação Internacional de Xenotransplantes propõe que os ensaios clínicos devam ser realizados com a

supervisão de uma agência regulamentadora nacional. Os ensaios devem garantir atuação ética na pesquisa com humanos e com animais não humanos. Os grupos de pesquisa devem manter os animais em confinamento fechado, no qual patógenos conhecidos e potenciais sejam excluídos. Os ensaios devem produzir dados pré-clínicos apropriados para justificar o ensaio clínico. Além disso, deve-se ater ao fato de que é um procedimento com potencial risco para o paciente e para a sociedade (BUCHER; MOREL; BÜHLER, 2005).

De acordo com WHO (2009), (i) o xenotransplante deve ser regulado com normas e regras devido à sua complexidade, riscos, principalmente por se tratar de animais geneticamente modificados e para se evitar a possibilidade do xenoturismo; (ii) o regulamento deve ter poderes com bases legais para proibir procedimentos não padronizados e fazer cumprir todos os requisitos especificados; (iii) o sistema deve ser transparente e deve incluir avaliação científica de risco e potenciais riscos e da ética; (iv) a seleção do paciente para o ensaio deve ser feita com base em consentimento informado e na disposição do mesmo em aceitar as condições especiais exigidas; (v) todos os receptores de produtos provenientes do xenotransplante devem ser registrados em um banco de dados apropriado com capacidade de rastreamento do animal doador e garantir a privacidade do paciente; (vi) o paciente e seus contatos próximos devem ser acompanhados em longo prazo; (vii) equipes médicas devem ter conhecimentos adequados e compreensão dos riscos de doenças infecciosas para si próprios, pacientes e comunidade e (viii) caso doenças infecciosas se espalhem para a comunidade, deve-se haver um sistema de vigilância contínua com planos de contingência com tempo hábil para identificação e resposta a qualquer indicação de infecção relacionada ao xenotransplante.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia do xenotransplante em conjunto com as tecnologias de edição genômica, com a produção de suínos que não expressam o carboidrato Gal na membrana celular, tem grande potencial para se resolver o problema da falta de órgãos a nível mundial. Essa tecnologia possibilita a produzir órgãos saudáveis e viáveis, embora as questões das barreiras imunológicas e fisiológicas necessitem novos estudos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia: Celular E Molecular*, Rio De Janeiro, Elsevier, 2015.

BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D. A.; HORVATH, P. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. v. 315 p. 1709-1712. 2007.

BIGAM, D.; ZHONG, R.; LEVY, G.; GRANT, D. Xenotransplantation. *Can. J Surg*. v. 42(1) p. 12-16. 1999.

BLUSCH, J. H.; PATIENCE, C.; MARTIN, U. Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation*. v. 9(4) p. 242-251. 2002.

BOLOTIN, A.; QUINQUIS, B.; SOROKIN, A.; EHRLICH, S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. v. 151 p. 2551–2561. 2005.

BUCHER, P.; MOREL, P.; BÜHLER, L. H. Xenotransplantation: an update on recent progress and future perspectives. *Transpl. Int*. v. 18(8) p. 894-901. 2005.

CASCALHO, M.; PLATT, J. The immunologic barriers to replacing damaged organs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. v. 278 p. 1–21. 2003.

CHARPENTIER, E.; DOUDNA, J. A. Biotechnology: rewriting a genome. *Nature*. v. 495 p. 50-51. 2013.

COELHO, M. M. *Xenotransplante: Ética e teologia*, [S.I.]. Edições Loyola, 2004

COOPER, D. K. C.; EKSER, B.; TECTOR, J. Immunobiological barriers to xenotransplantation. *Int. J. Surg. (Pt B)* p. 211-216. 2015.

COWAN, P. J.; ROBSON, S. C.; D'APICE, A. J. F. Controlling coagulation dysregulation in xenotransplantation, *Curr Opin Organ Transplant*. v. 16(2). p. 214-221. 2011.

COWAN, P. J.; TECTOR, A. J. The Resurgence of Xenotransplantation. *Am. J. Transplant*. v. 10 p. 2531-2536. 2017.

DENNER, J.; TÖNJES, R. R. Infection Barriers to Successful Xenotransplantation Focusing on Porcine Endogenous Retroviruses. *Clin. Microbiol. Rev*. v. 25(2) p. 318-343. 2012.

EKSER, B.; COOPER, D. K. C. Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future. *Expert Rev. Clin. Immunol.* v. 6(2) p. 219-230. 2010.

FARIA, B. A.; SILVA, S. M.; ABREU, M. T. C. L.; NAPIMOGA, M. H. Ação dos linfócitos T regulatórios em transplantes. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v. 30 no.4 São José do Rio Preto July/Aug. 2008.

GALILI, U. The α -gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. *Immunology and Cell Biology*, v. 83 p. 674-686. 2005.

ISHINO, Y.; SHINAGAWA, H. MAKINO, K.; AMEMURA, M. NAKATA, A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* v. 169(12) p. 5429-5433. 1987.

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* v. 337 p. 816–821. 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K; ASTER, J. C. *Patologia Básica*. 9. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LIU, X.; WU, S.; XU, J.; SUI, C.; WEI, J. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharm. Sin. B.* v. 7(3) p. 292-302. 2017.

MAEDER, M. L. E.; GERSBACH, C. A. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Molecular therapy Org.* v. 24(3) p. 430-446. 2016.

MAGRE, S.; TAKEUCHI, Y.; BARTOSCH, B. Xenotransplantation and pig endogenous retroviruses. *Rev. Med. Virol.* v. 13(5) p. 311-329. 2003.

MIDDLETON, D.; CURRAN, M.; MAXWELL, L. Natural killer cells and their receptors. *Transplant immunology.* v. 10 p.147-164. 2002;

MORAES, M. W.; GALLANI, M. C. B. J.; MENECHIN, P. Crenças que influenciam adolescentes na doação de órgãos. *Rev. Esc. Enferm. USP.* v. 40(4) p. 484-492. 2006.

NIU, D. et al, Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science.* v. 357(6357) p. 1303-1307. 2017.

PUGA YUNG, G. L.; RIEBEN, R.; BÜHLER, L.; SCHUURMAN, H. J.; SEEBACH, J. Xenotransplantation: where do we stand in 2016? *Swiss Med. Wkly.* v. 147: w 14403. 2017.

SQUINTO, S. Genetically modified animal organs for human transplantation. World J., Surg. v. 21(9) p. 939-942. 1997.

TAKEFMAN, D. M.; SPEAR, G. T.; SAIFUDDIN, M.; WILSON, C. A. Human CD59 incorporation into porcine endogenous retrovirus particles: implications for the use of transgenic pigs for xenotransplantation. J. Virol. v. 76(4) p. 1999-2002. 2002.

WEISS, E. H. et al. HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity. Transplantation. v. 87 p. 35-43. 2009.

WHO Guiding Principles On Human Organ Transplantation Report of the Regional Meeting. Kuala Lumpur, Malaysia: World Health Organization Regional Office For The Western Pacific, 2009. Disponível em: <http://www.wpro.who.int/health_technology/documents/docs/HumanOrganTransplantationMeetingReport.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2017.

ZHONG, R.; PLATT, J. L. Current status of animal-to-human transplantation. Expert Opin. Biol. Ther. v. 5(11) p. 1415-1420. 2005.