



**“Implicación del sistema GSTT1 en la patogénesis de la
hepatitis inmune *de novo*”**

TESIS DOCTORAL

ANTONIO JESÚS POZO BORREGO

Sevilla, 2019



D. ANTONIO NÚÑEZ ROLDÁN, CATEDRÁTICO DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y JEFE DEL SERVICIO DE INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCÍO

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que lleva por título: **“Implicación del sistema GSTT1 entre donante y receptor en la patogénesis de la hepatitis inmune *de novo*”**, ha sido realizado bajo su dirección por el licenciado D. ANTONIO JESÚS POZO BORREGO, y reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como tesis para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que conste a los efectos oportunos, expide la presente certificación en Sevilla, a 22 de octubre de 2019.

Antonio Roldán

Fdo.: Dr. Antonio Núñez Roldán

DIRECTOR DE LA TESIS

TUTOR DE LA TESIS



**D^a ISABEL AGUILERA GARCÍA, DOCTORA EN BIOLOGÍA E INVESTIGADORA
DEL INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE SEVILLA**

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que lleva por título: **“Implicación del sistema GSTT1 entre donante y receptor en la patogénesis de la hepatitis inmune *de novo*”**, ha sido realizado bajo su dirección por el licenciado D. ANTONIO JESÚS POZO BORREGO, y reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como tesis para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que conste a los efectos oportunos, expide la presente certificación en Sevilla, a 22 de octubre de 2019.

Fdo.: Dra. Isabel Aguilera García

DIRECTORA DE LA TESIS

FINANCIACIÓN

El doctorando durante el transcurso de la presente tesis doctoral ha sido beneficiario de una beca PIF (Personal Investigador en Formación) del V plan propio de la US.

Abreviaturas

alo-TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico

APC: Célula presentadora de antígenos

CD107a: Proteína de membrana asociada a lisosomas 1

dNTPS: nucleótidos

DMSO: Dimetilsulfóxido

DN: Linfocitos T dobles negativos (CD4⁻CD8⁻)

EICH: Enfermedad injerto contra huésped

EICHc: Enfermedad injerto contra huésped crónica

ELISA: Enzimoimmunoanálisis de adsorción

GSTT1: Glutación S-transferasa T1

HIdn: Hepatitis inmune *de novo*

HLA: Antígeno leucocitario humano

HUVR: Hospital Universitario Virgen del Rocío

IC50: Concentración inhibitoria máxima media

Ig: Inmunoglobulina

IFN: Interferón

IL: Interleukina

mHags: Sistemas menores de histocompatibilidad

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

pb: Pares de bases

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SFB: Suero fetal bovino

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

TTO: Tratamiento

Tx: Trasplante

ÍNDICE

Índice

INTRODUCCIÓN	18
1. Historia del trasplante hepático	20
2. Antecedes de la hepatitis inmune <i>de novo</i>	21
3. Complejo principal de histocompatibilidad (HLA)	22
4. Maduración linfocitaria, procesamiento del antígeno, presentación a los linfocitos T y activación de los linfocitos T, tanto CD4 ⁺ como CD8 ⁺	26
4.1. <i>Maduración linfocitaria</i>	26
4.1.1. Selección positiva	26
4.1.2. Selección negativa	26
4.2. <i>Procesamiento del antígeno</i>	27
4.3. <i>Presentación antigénica a los linfocitos T</i>	28
4.4. <i>Activación de los linfocitos T</i>	30
4.4.1. Linfocitos T CD4 ⁺	30
4.4.2. Linfocitos T CD8 ⁺	31
5. Tipos no usuales de linfocitos T	31
6. Antecedentes de la teoría humoral del trasplante	32
7. Sistemas menores de histocompatibilidad	33
8. Anticuerpos anti-GSTT1 en el trasplante de órganos sólidos	35
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
PACIENTES	43
MÉTODOS	47
1. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica	49
1.1. <i>Sistema MagNA Pure Compact (Roche, Mannheim, Alemania)</i>	49
2. Caracterización genética de nuestra población de estudio atendiendo a un sistema menor de histocompatibilidad (mHags)	49

2.1. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	49
2.2. <i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	50
2.3. <i>Relación de los cebadores usados</i>	51
2.3.1. <i>Genotipo de la Glutación S-transferasa T1 (GSTT1)</i>	51
3. <i>Obtención de muestras de suero de los pacientes trasplantados hepáticos</i>	52
4. <i>Determinación de anticuerpos anti-GSTT1 mediante test de ELISA</i>	52
4.1. <i>Determinación de anticuerpos anti-GSTT1 de isotipo IgG total</i>	52
4.2. <i>Determinación de las distintas subclases de anticuerpos anti-GSTT1</i>	53
5. <i>Exploración de la distribución celular de la proteína GSTT1</i>	54
5.1. <i>Caracterización línea celular HepaRG</i>	54
5.1.1. <i>Lisis celular</i>	54
5.1.2. <i>Cuantificación de proteínas</i>	54
5.1.3. <i>Preparación gel de proteína</i>	54
5.1.4. <i>Transferencia a membrana de nitrocelulosa</i>	55
5.1.5. <i>Inmunoblot</i>	55
6. <i>Estudio de la distribución celular de la proteína GSTT1</i>	56
6.1. <i>Inmunocitoquímica</i>	56
6.2. <i>Inmunocitoquímica in vivo</i>	57
6.3. <i>Citometría de flujo</i>	57
7. <i>Medios de cultivo</i>	58
8. <i>Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)</i>	58
9. <i>Recuento y estudio de viabilidad celular</i>	58
10. <i>Congelación celular</i>	59
11. <i>Cultivos celulares</i>	59
12. <i>Descongelación de células</i>	59
13. <i>Determinación de linfocitos T alo-específicos frente a GSTT1</i>	60
14. <i>Cultivos para la activación de linfocitos T usando péptidos de GSTT1</i>	61

15. Detección intracelular de citoquinas en linfocitos activados mediante péptidos de GSTT1	61
16. Paneles citometría de flujo multicolor	62
17. Predicción de moléculas HLA presentadoras de los péptidos de la GSTT1	63
RESULTADOS	65
Objetivo 1	67
1.1. Inmunocitoquímica	67
1.2. Estudio de la expresión de GSTT1 mediante citometría de flujo	69
1.3. Determinación de las distintas subclases de anticuerpos anti-GSTT1	70
1.4. Ratio IgG1 _{-GSTT1} /IgG4 _{-GSTT1} en el momento diagnóstico de hepatitis inmune <i>de Novo</i>	74
Objetivo 2	76
2.1. Determinación de linfocitos T alo-específicos frente a GSTT1	76
2.1.1. Estudio pentámeros	76
2.1.2. Pacientes	76
2.1.3. Jerarquía.....	77
2.1.4. Resultados.....	77
2.1.5. Estudio tetrámeros.....	82
2.1.6. Pacientes	82
2.1.7. Jerarquía.....	82
2.1.8. Resultados.....	83
Objetivo 3	80
3.1. Resultados activación péptidos GSTT1	84
3.1.1. Pacientes	84
3.1.2. Jerarquía.....	84
3.1.3. Resultados.....	85
3.1.4. Análisis activación IFN- γ	88
3.1.5. Análisis activación IL-4	88
3.1.6. Análisis activación IL-10	89

3.1.7. Análisis activación CD107a.....	90
3.1.8. Conclusión.....	90
3.2. Análisis global resultados hepatitis inmune <i>de novo</i>	90
3.2.1. Jerarquía.....	90
3.2.2. Análisis poblacional CD4 ⁺ CD8 ⁻	91
3.2.3. Análisis de activación global.....	92
3.2.4. Población CD8 ⁺	92
3.2.5. Población CD4 ⁺	93
3.2.6. Población CD4 ⁺ CD8 ⁻	94
3.2.7. Consideraciones finales.....	95
DISCUSIÓN.....	98
CONCLUSIONES.....	106
BIBLIOGRAFÍA.....	110
ANEXO.....	123
IgG subclass profile among anti-Glutathione S-transferase T1 antibodies in post-transplant <i>de novo</i> immune hepatitis.....	125

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. Historia del trasplante hepático

Aunque bastante menos mitificado que el corazón, el hígado es sin embargo el órgano noble por excelencia. Además, el hígado es como órgano, tremendamente más complejo que el corazón o el riñón. Su trasplante, mucho más trabajoso y complicado, además de por supuesto tan vital como el cardiaco, si bien con bastante menos literatura que éste. Es el trasplante que requiere un equipo multidisciplinario más numeroso y mejor conjuntado.

La historia del trasplante hepático va indisolublemente ligada a la de un cirujano norteamericano nacido en Iowa: Thomas Starzl. Verdadero antecesor de los "*Transplant Surgeons*", que fundamentalmente en el mundo anglosajón constituyen hoy una verdadera especialidad, fue uno de los primeros cirujanos en hacer trasplantes renales al inicio de los sesenta. Preparó una técnica experimental de trasplantes en animales que validó hasta la saciedad y el 1 de Marzo de 1963, casi cinco años antes de que Barnard se atreviera con el corazón, llevó a cabo el primer trasplante de hígado en el Veteran's Hospital de Denver, Colorado.

El receptor sería un niño de 3 años afecto de una estrechez congénita de las vías biliares que acaba produciendo la destrucción del hígado (atresia biliar), al que implanta el órgano de otro niño fallecido como consecuencia de un tumor cerebral. Como el mismo Starzl describiera gráficamente, la intervención comenzó en un clima de confianza que sin embargo acabó en tragedia. El niño muere a las cinco horas de acabar el trasplante. Dos meses después, el 5 de Mayo realiza el segundo en un hombre de 48 años con un cáncer de hígado, que recibe en este caso el órgano de un paciente de 55 años con un tumor cerebral. El paciente vive 22 días, pero muere por una embolia pulmonar con un hígado normal.

Entre 1963 y 1967, en Francia (Demirleau en Noviembre de 1963), Inglaterra (Roy Calne) y los Estados Unidos se hicieron varias decenas de trasplantes hepáticos con resultados diversos, pero ninguno alcanzó el año de supervivencia. La historia del trasplante de hígado está plagada de numerosos intentos en todo el mundo durante los sesenta y los setenta, pero con unos resultados muy pobres, que en las mejores manos apenas supone una supervivencia al año de un 30% de los pacientes. No es hasta 1967 cuando tiene lugar el primer trasplante con supervivencia prolongada realizado en la Universidad de Colorado a una niña de un año y medio de edad. Los trabajos realizados por Starzl a partir de este momento, así como los de Calne y Williams permitieron que la mejoría de resultados fuera tal que lo que se consideraba un tratamiento experimental, pasara a ser una alternativa terapéutica.

Hay que esperar a los ochenta para que las mejoras de todo tipo: quirúrgicas, de anestesia, de manejo de la coagulación, pero sobre todo de inmunosupresión con el descubrimiento de la ciclosporina en 1980 lleven a una verdadera explosión de la técnica. Una conferencia de consenso celebrada bajo los auspicios de los NIH norteamericanos en Bethesda (Maryland) en Junio de 1983 supone la declaración del trasplante hepático como de utilidad terapéutica

demostrada y su verdadera difusión por todo el mundo. La supervivencia al año pasa del 30% al 70% y sigue mejorando en las siguientes décadas.

En España fueron los doctores Carles Margarit y Eduardo Jaurrieta en el hospital de Bellvitge de l'Hospitalet, Barcelona, en 1984 quienes hicieron con éxito la primera operación. Hoy se efectúa en 24 hospitales de todo el estado y son más de mil los enfermos que anualmente reciben un trasplante hepático en nuestro país, con diferencia el que más realiza del mundo en relación a su población.

2. Antecedentes de la hepatitis inmune *de novo*

La hepatitis inmune *de novo* es una patología descrita inicialmente en trasplante pediátrico a finales de los años 90 como una disfunción tardía del injerto asociada a una serie de características serológicas e histológicas compatibles con una hepatitis autoinmune, a pesar de que los pacientes no habían desarrollado hepatitis autoinmune antes del trasplante. Entre las características descritas inicialmente podemos mencionar: elevación de enzimas hepáticas (aminotransferasas), existencia de autoanticuerpos, elevada concentración de IgG en suero y presencia de un denso infiltrado linfocitario en la zona portal (*Kerkar N y col., 1998*).

Más tarde fue descrita en adultos por diversos grupos (*Jones DE y col., 1999; Heneghan MA y col., 2001*). En sus estudios iniciales, el grupo del Hospital Gregorio Marañón describió la presencia de un anticuerpo atípico, con un patrón de inmunofluorescencia indirecta que recordaba a los anticuerpos antimicrosomales de hígado/riñón de tipo 1 (anti-LKM1) y por tanto los denominaron anticuerpos anti LKM atípicos (*Hernández-Albújar A, Salcedo M y col., 1997; Salcedo M y col., 2002*).

En el año 2001, nuestro grupo identificó la diana antigénica de los anticuerpos anteriormente citados. Se trataba de una enzima metabolizadora de fármacos, de fase II, implicada en la protección frente a compuestos tóxicos, denominada Glutatión S Transferasa Theta 1 (GSTT1). De tal forma que los anticuerpos anti-LKM1 atípicos pasaron a denominarse anti-GSTT1 (*Aguilera I y col., 2001*).

Posteriormente en 2004 estudiamos una gran cohorte de pacientes trasplantados de hígado en el Hospital Virgen del Rocío y confirmamos que esta patología ocurre cuando los donantes tienen una o dos copias del alelo positivo para GSTT1 y los receptores carecen de este gen, lo que se denomina alelo nulo, y que esta incompatibilidad genética es requerida para que se desarrolle hepatitis inmune *de novo*, siempre precedida por la producción de anticuerpos anti-GSTT1 (*Aguilera I y col., 2004*). Estos resultados fueron confirmados varios años más tarde por el grupo del Hospital Rodríguez Marañón (*Rodríguez-Mahou M y col., 2007*).

En el año 2011 vinculamos por primera vez la inmunopositividad de C4d en biopsias hepáticas con alo-reactividad donante-específica no relacionada con anticuerpos anti-HLA DSA ni con incompatibilidad ABO (*Aguilera I y col., 2011*).

Cabe destacar la importancia que adquiere la terapia inmunosupresora inicial administrada a los pacientes. La terapia combinada de tacrolimus con micofenolato mofetilo presenta un

efector protector en comparación con la terapia combinada de ciclosporina junto con micofenolato mofetilo. Este efecto protector reduce la probabilidad de producir anticuerpos y por tanto evita la progresión de la patología (Aguilera I y col., 2011).

3. Complejo principal de histocompatibilidad (HLA)

Los linfocitos T sólo pueden reconocer antígenos presentados por células presentadoras de antígenos especializadas (APC, del acrónimo inglés *Antigen Presenting Cells*). La tarea de presentar antígenos corre a cargo de proteínas específicas que son codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del acrónimo inglés *Major Histocompatibility Complex*). Esta especificidad de los linfocitos T contrasta con la de los linfocitos B y sus productos secretados, los anticuerpos, que pueden reconocer antígenos tanto solubles como asociados a células.

En un principio el sistema MHC humano (HLA, del acrónimo inglés *Human Leukocyte Antigen*) fue descubierto como un locus extendido con un alto contenido de genes sumamente polimórficos. Ahora sabemos que las funciones fisiológicas de las moléculas del sistema HLA es la presentación de péptidos a los linfocitos T. De hecho, sus receptores de membrana o TCR (del acrónimo inglés *T-Cell receptor*), en realidad son específicos frente a complejos formados por péptidos de antígenos extraños y moléculas HLA propias.

La información genética para la codificación de las moléculas HLA se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31-6p21.32) con un alto contenido de genes que están en desequilibrio de ligamiento (Imagen 1). Su expresión se realiza de forma codominante, es decir, cada persona expresa los alelos del HLA heredados de ambos padres. Esta característica hace posible que se eleve al máximo el número de moléculas HLA disponibles para ejercer su función fisiológica. Es importante destacar que las moléculas HLA de un individuo no discriminan entre los péptidos extraños, es decir, los derivados de antígenos microbianos, y los derivados del propio sujeto (antígenos propios).

Existen dos tipos principales de productos génicos del MHC, las moléculas de clase I y las de clase II, con estructuras distintas pero homólogas. Las moléculas del MHC de clase I presentan péptidos y son reconocidos por los linfocitos T CD8⁺, mientras que las moléculas MHC de clase II presentan péptidos a los linfocitos T CD4⁺.

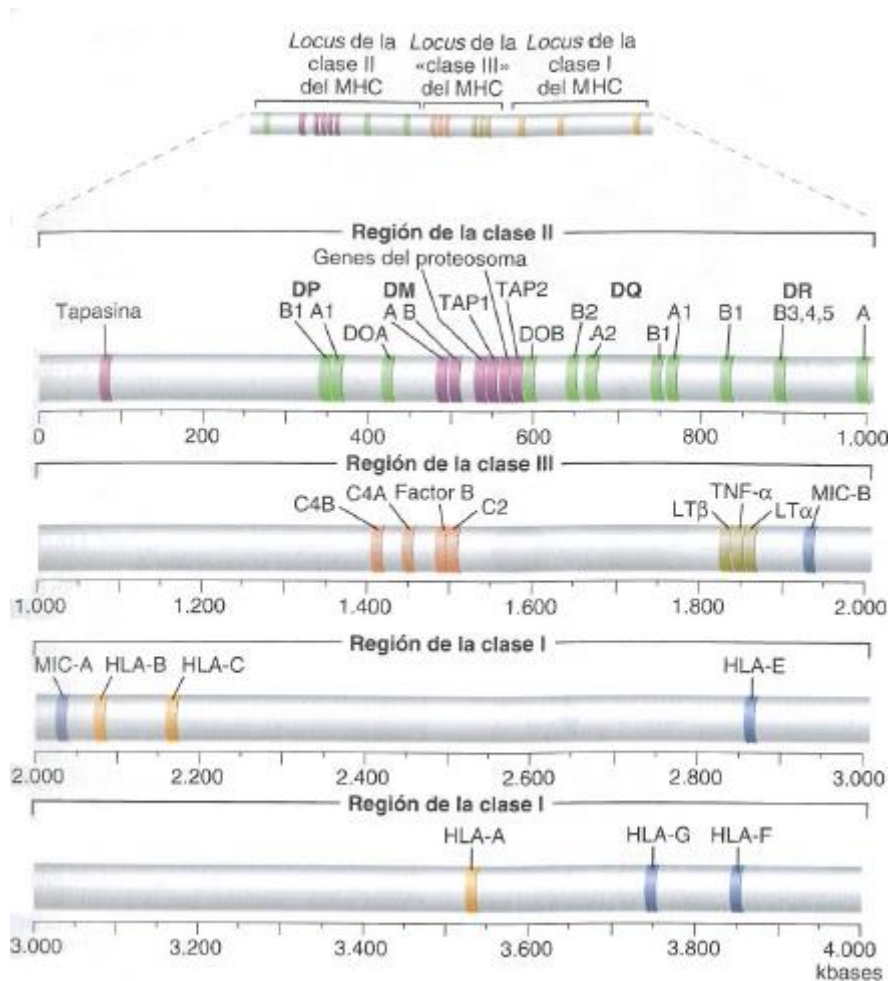


Imagen 1. Distribución de los genes HLA en el brazo corto del cromosoma 6. Tomada de Inmunología celular y molecular. 8ª Edición. Abul K. Abbas, Andrew Lichtman y Shiv Pillai. Editorial Elsevier Saunders.

La región de clase I codifica a los genes de la cadena pesada de las moléculas clásicas de clase I (A, B y Cw) así como de los genes no clásicos como HLA-E, F, G, MICA y MICB. La molécula HLA de clase I totalmente ensamblada es un heterodímero que consta de una cadena α , una β 2-microglobulina y un péptido antigénico unido (Imagen 2). La expresión estable de las moléculas de clase I sobre la superficie celular requiere la presencia de los tres componentes. Los péptidos presentados por este tipo de moléculas tienen una longitud media de unos 9 aminoácidos (aa). Todos los individuos heterocigotos expresan seis moléculas HLA de clase I diferentes y se presentan de forma constitutiva en todas las células nucleadas del organismo.

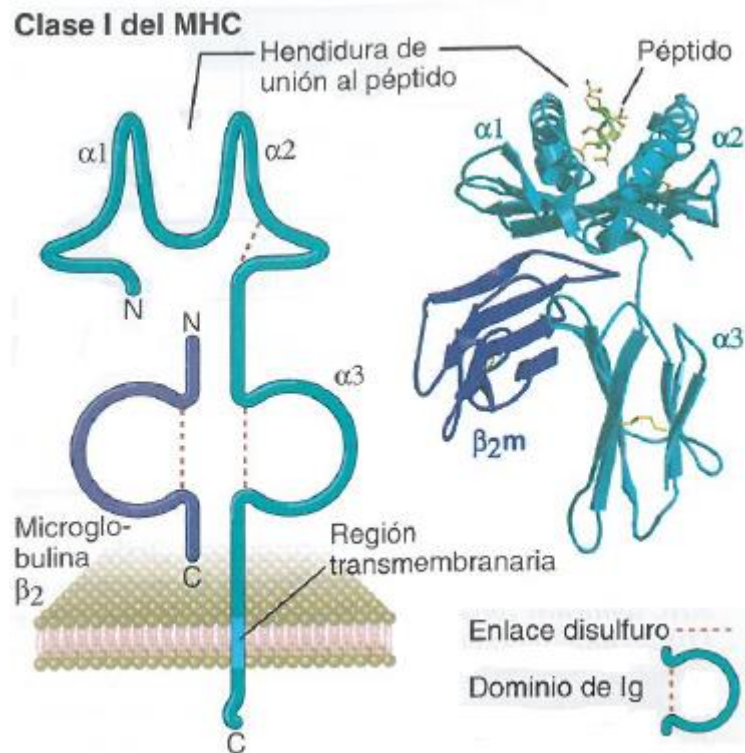


Imagen 2. Estructura de una molécula MHC de clase I. Tomada de Inmunología celular y molecular. 8ª Edición. Abul K. Abbas, Andrew Lichtman y Shiv Pillai. Editorial Elsevier Saunders.

Por otro lado, la región de clase II contiene los genes que codifican las moléculas α y β de los tres tipos clásicos de moléculas HLA de clase II (DQ, DR y DP). La molécula HLA de clase II totalmente ensamblada es un heterodímero que consta de una cadena α , una cadena β y un péptido antigénico unido (Imagen 3). Al igual que ocurría con las moléculas HLA de clase I, la expresión estable de las moléculas de clase II sobre la superficie celular requiere la presencia de los tres componentes del heterodímero. Los péptidos presentados por este tipo de moléculas tienen una longitud media de 12 a 14 aa.

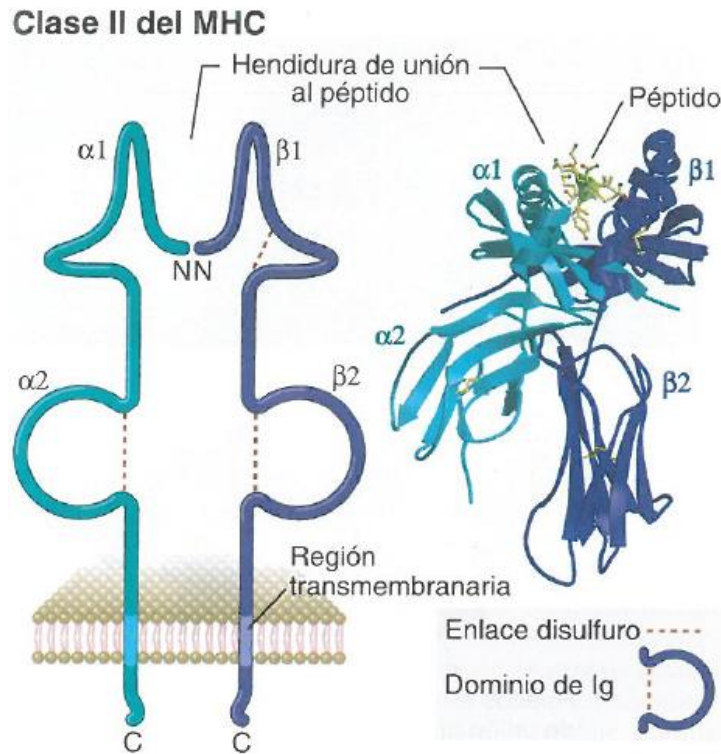


Imagen 3. Estructura de una molécula MHC de clase II. Tomada de *Inmunología celular y molecular*. 8ª Edición. Abul K. Abbas, Andrew Lichtman y Shiv Pillai. Editorial Elsevier Saunders.

Estas moléculas HLA de clase II sólo se expresan en las APC, como los macrófagos, linfocitos B y células dendríticas. La presentación de péptidos mediante HLA clase II a los linfocitos T CD4⁺ vírgenes, va a activarlos y éstos contribuirán a la maduración de otros tipos celulares, como los linfocitos B, desencadenando la conocida como respuesta humoral (*Inmunología celular y molecular*, 8ª Edición. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman y Shiv Pillai. Editorial Elsevier Saunders).

Al contrario del origen endógeno de los péptidos unidos a moléculas de clase I, los fragmentos antigénicos unidos a moléculas de clase II derivan de antígenos de origen exógeno. En este último caso, las moléculas extracelulares son internalizadas por endocitosis. Los endosomas se fusionan con lisosomas y su contenido es digerido parcialmente. Los fragmentos resultantes se unen a las moléculas de clase II y retornan a la superficie celular donde serán presentados. Por el contrario, los péptidos presentados por las moléculas HLA de clase I son los fragmentos resultantes de la degradación proteínica llevada a cabo por el proteasoma. No obstante, y debido a la importancia que tiene esta característica en la maduración y posterior activación de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, el procesamiento del antígeno se explicará con detalle en el siguiente apartado.

4. Maduración linfocitaria, procesamiento del antígeno, presentación a los linfocitos T y activación de los linfocitos T, tanto CD4⁺ como CD8⁺

Los linfocitos T tienen funciones importantes en todas las respuestas adaptativas contra antígenos proteicos. En la inmunidad celular, los linfocitos T CD4⁺ activan a los macrófagos para que destruyan microbios fagocitados, mientras que en los linfocitos T CD8⁺ tienen un efecto citotóxico frente a células infectadas por microbios intracelulares. En la inmunidad humoral, por otro lado, los linfocitos T CD4⁺ cooperadores o *helper* (Th) interactúan con los linfocitos B y estimulan su proliferación y diferenciación. Tanto la fase de inducción como la efectora de las respuestas de linfocitos T están desencadenadas por el reconocimiento específico de antígenos extraños.

Debido a que el reconocimiento antigénico es crucial para la capacidad efectora de los linfocitos T, es importante que dichas células sólo sean activadas en presencia de péptidos extraños y que no se activen cuando los péptidos presentados por las moléculas HLA sean propios. Para evitar este hecho, en el timo se lleva a cabo una selección muy estricta que elimine aquellas células potencialmente auto-reactivas. A este proceso se le conoce como maduración linfocitaria.

4.1. *Maduración linfocitaria*

Los linfocitos inmaduros presentes en el timo reciben el nombre de timocitos, que son originalmente dobles negativos por no presentar ni TCR ni correceptores CD4 ni CD8, pero que al final de la maduración ya serán dobles positivos. No obstante, este repertorio celular posee receptores que pueden reconocer cualquier antígeno peptídico, con distintos grados de avidéz, mostrado por cualquier molécula MHC. Es por ello que los procesos de selección actúan en el repertorio de los linfocitos T inmaduros para asegurarse de que sólo finalizan el proceso de maduración linfocitos útiles. Las distintas fases de selección son las siguientes:

4.1.1. Selección positiva

Se lleva a cabo al favorecer la supervivencia selectiva y la expansión de timocitos con TCR restringidos por el MHC propio, es decir, si el TCR de una célula reconoce a las moléculas MHC de clase I cargadas con péptidos y al mismo tiempo la molécula CD8 interactúa con las moléculas MHC de clase I, ese linfocito recibe señales que impiden su muerte celular. En un proceso totalmente análogo, se llevaría a cabo la selección de linfocitos T CD4 restringidos por el MHC de clase II.

4.1.2. Selección negativa

Se produce induciendo la muerte apoptótica de las células cuyos receptores reconocen complejos péptidos-MHC en el timo con una avidéz elevada. Esto se debe a que los TCR generados pueden llegar a reconocer auto-antígenos con una afinidad elevada lo que conduciría a fenómenos de autoinmunidad. Por lo tanto, estos mecanismos de selección en la maduración de los timocitos hacia linfocitos T maduros son cruciales para evitar procesos de pérdida de tolerancia de lo propio por parte del sistema inmunitario.

4.2. Procesamiento del antígeno

Los primeros estudios que se realizaron sobre la naturaleza de los antígenos que estimulan la inmunidad celular mostraron que las formas fisicoquímicas de los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T son diferentes a las de los que son reconocidos por los linfocitos B y los anticuerpos, de tal manera, que los antígenos reconocidos por los linfocitos T deben cumplir los siguientes requisitos:

- La mayoría de los linfocitos T reconocen solamente péptidos, es decir, sólo reconocen antígenos proteínicos, mientras que los linfocitos B pueden reconocer péptidos, proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y pequeñas moléculas.
- Los linfocitos T son específicos frente a secuencias de aminoácidos de los péptidos. Por otro lado, los linfocitos B pueden reconocer determinantes tridimensionales que existen cuando los antígenos, como las proteínas globulares, están en su configuración terciaria original.
- Los linfocitos T de una persona reconocen y responden a antígenos peptídicos extraños sólo cuando éstos están unidos a sus moléculas HLA, denominándose a esta característica restricción por el HLA propio, mientras que los linfocitos B y los anticuerpos secretados se unen a antígenos solubles en los líquidos corporales, así como a antígenos de superficie celular.
- Los linfocitos T cooperadores CD4⁺ reconocen péptidos unidos a moléculas HLA de clase II, mientras que los linfocitos T citotóxicos (CTL, del inglés *Cytotoxic T Lymphocyte*) CD8⁺ reconocen péptidos unidos a moléculas HLA de clase I.

En la vía del MHC de clase II, los antígenos β extracelulares se endocitan en vesículas en las que son degradados a péptidos, uniéndose los productos resultantes a las moléculas del MHC de clase II. En la vía del MHC de clase I, las proteínas citosólicas son degradadas gracias a la acción de proteasomas. Los péptidos así formados, se transportan hacia el retículo endoplásmico (RE) mediante TAP (transportador asociado al procesamiento del antígeno), donde se ensamblan a las moléculas MHC de clase I formando el complejo MHC-péptido que se expresará en la superficie celular (Imagen 4).

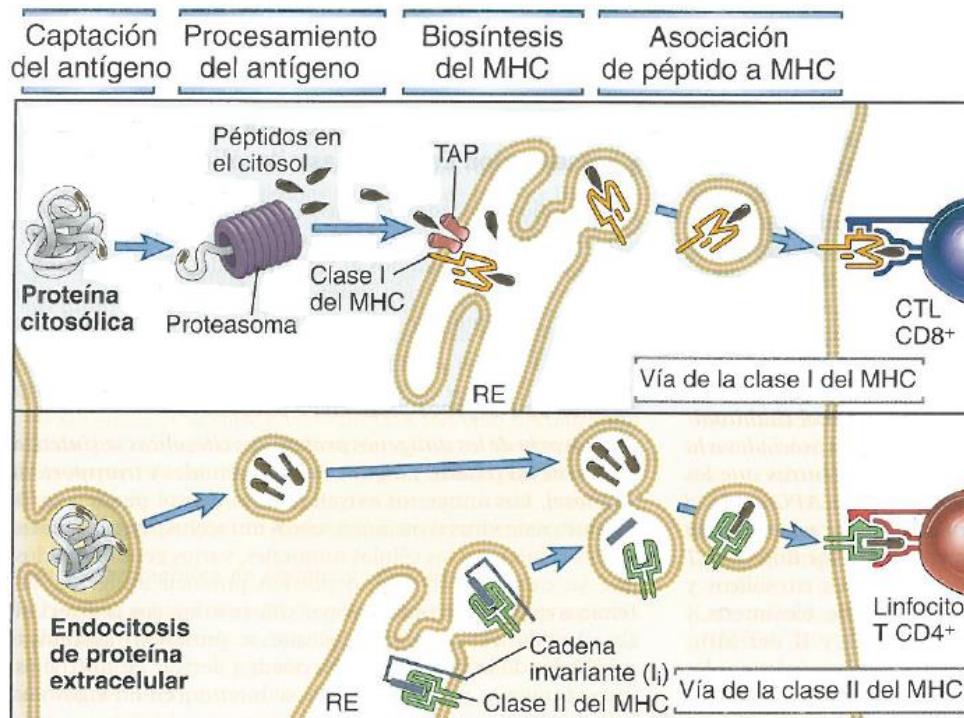


Imagen 4. En este gráfico se muestra el procesamiento de las proteínas citosólicas o endocitadas del medio extracelular. Dependiendo de la procedencia de la proteína, ésta será degradada por la vía del proteasoma o la vía vesicular lo que condicionará el HLA que la presentará a los linfocitos T. Tomada de Inmunología celular y molecular. 8ª Edición. Abul K. Abbas, Andrew Lichtman y Shiv Pillai. Editorial Elsevier Saunders.

4.3. Presentación antigénica a los linfocitos T

Las APC tienen dos funciones importantes en la activación de los linfocitos T, la presentación y el suministro de señales coestimuladoras necesarias para que se produzcan las respuestas completas en los linfocitos T.

Las células dendríticas son las APCs más eficaces para activar a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ vírgenes. No obstante, existen en el organismo otras APCs, entre ellas los macrófagos y los linfocitos B. Los primeros, en la fase efectora de la inmunidad celular, presentan antígenos a los CD4⁺ diferenciados, mientras que los segundos lo hacen a los linfocitos T cooperadores durante las respuestas inmunitarias humerales.

Para inducir una respuesta primaria en los linfocitos T CD8⁺, las células dendríticas pueden ingerir células infectadas y tumorales, así como fagocitar antígenos presentes en el medio extracelular, y proceder a la presentación de sus antígenos mediante el HLA de clase I. Esta vía de presentación es contraria a la regla habitual de presentación de que los antígenos ingeridos en el interior de vesículas se presentan sobre moléculas HLA de clase II, mientras que los péptidos asociados al HLA de clase I proceden de proteínas citosólicas. Este proceso se denomina presentación cruzada e indica que un tipo celular puede presentar antígenos de otra célula a la que ha fagocitado cargados en moléculas HLA de clase I.

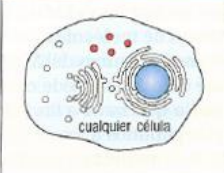
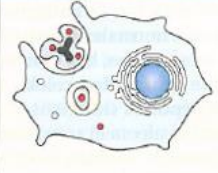


	Agentes patógenos citosólicos	Presentación cruzada de antígenos exógenos	Agentes patógenos intravesiculares	Agentes patógenos y toxinas extracelulares
				
Degradación en	Citosol	Citosol (mediante retrotranslocación)	Vesículas endocíticas (pH bajo)	Vesículas endocíticas (pH bajo)
Unión de los péptidos a	MHC de clase I	MHC de clase I	MHC de clase II	MHC de clase II
Presentación a	Células T CD8 efectoras	Células T CD8 indiferenciadas	Células T CD4 efectoras	Células T CD4 efectoras
Efecto sobre la célula presentadora	Muerte celular	La célula presentadora, generalmente una célula dendrítica, activa a la célula T CD8	Activación para eliminar bacterias y parásitos intravesiculares	Activación de células B para que secreten Ig y eliminar bacterias/toxinas extracelulares

Imagen 5. En este gráfico se representan los distintos mecanismos por los que proteínas procedentes del medio extracelular pueden llegar a ser presentadas por moléculas MHC de clase I y II. Tomada de Inmunología celular y molecular. 8ª Edición. Abul K. Abbas, Andrew Lichtman y Shiv Pillai. Editorial Elsevier Saunders.

Por otra parte, los linfocitos B interiorizan antígenos proteínicos solubles y presentan péptidos procesados procedentes de estas proteínas a los linfocitos T cooperadores. Esta interacción es necesaria para la maduración de los linfocitos B, un proceso que se produce principalmente en los órganos linfáticos.

No obstante, y siguiendo con la vía de presentación antigénica clásica, podemos hablar de dos vías de procesamiento del antígeno diferentes dependiendo de la procedencia de éste, de tal forma que los antígenos proteínicos presentes en los compartimentos vesiculares ácidos de las APC generan péptidos asociados a la clase II, mientras que los que proceden de antígenos presentes en el citosol, serán degradados por el proteasoma originando péptidos asociados a la clase I. Las principales características comparativas de las vías HLA de clase I y II de la presentación del antígeno se resumen en la siguiente tabla:

Características	Vía del MHC de clase II	Vía del MHC de clase I
Composición del complejo péptido-MHC estable	Cadenas α y β polimorfos + péptido	Cadena α polimorfa + β 2-microglobulina + péptido
Tipos de APC	Células dendríticas, fagocitos mononucleares, linfocitos B, células endoteliales, epitelio tímico	Todas las células nucleadas
Linfocitos T sensibles	Linfocitos T CD4 ⁺	Linfocitos T CD8 ⁺
Origen de los antígenos proteínicos	Proteínas endosómicas/lisosómicas (principalmente interiorizadas a partir del ambiente extracelular)	Proteínas citosólicas (principalmente sintetizadas en la célula; pueden entrar en el citosol desde los fagosomas)
Enzimas responsables de la generación del péptido	Proteasas endosómicas y lisosómicas	Proteasoma citosólico
Lugar de carga del péptido en el MHC	Compartimento vesicular especializado	Retículo endoplásmico

Tabla 1. Esta tabla nos resume las principales características de la presentación clásica antigénica, ya sea mediada por moléculas HLA de clase I o II.

Una vez llevada a cabo la presentación antigénica a los linfocitos T, y tras recibir éstos la señal coestimuladora apropiada, se producirá en ellos la activación necesaria que lleve a cabo la destrucción de la célula infectada.

4.4. Activación de los linfocitos T

4.4.1. Linfocitos T CD4⁺

Existen dos subpoblaciones características de linfocitos T CD4⁺ que difieren la una de la otra en diversos rasgos entre los que cabe destacar la síntesis de diferentes conjuntos de citoquinas y la realización de distintas funciones efectoras. Dichas subpoblaciones reciben el nombre de linfocitos T *helper*, Th1 y Th2.

Mientras que los linfocitos CD4⁺ Th1 se activan principalmente cuando los macrófagos son infectados por microorganismos intracelulares, los linfocitos Th2 lo hacen en respuesta a parásitos extracelulares o ante estimulaciones persistentes y repetitivas con poca activación de los macrófagos y escasa inflamación.

La diferenciación de los linfocitos Th2 es dependiente de la IL-4, mientras que la de los linfocitos Th1 es el IFN- γ .

En lo que a función se refiere, la defensa mediante fagocitosis frente a infecciones intracelulares es la que caracteriza a los linfocitos Th1. Esta acción la llevan a cabo poniendo en marcha mecanismos de activación de macrófagos y neutrófilos así como estimulando la liberación de anticuerpos fijadores de complemento y opsonizadores, los cuales favorecen la fagocitosis, por parte de los linfocitos B. En cambio, los linfocitos Th2 favorecen las reacciones inmunitarias mediadas por la activación de linfocitos B productores de IgE e IgG4, siendo ambos subtipos anticuerpos neutralizantes de microorganismos y toxinas. La activación de

eosinófilos/mastocitos también está mediada por los linfocitos Th2, así como la supresión de la activación de los macrófagos, con lo que conseguirán la inactivación de la vía Th1 (Tabla 2).

Características	Linfocitos Th1	Linfocitos Th2
Fuente de activación	Microorganismos intracelulares que infectan a macrófagos	Parásitos extracelulares y estimulaciones persistentes con escasa inflamación
Citoquinas sintetizadas	IFN- γ	IL-4
Principal función	Defensa mediada por fagocitosis	Activación de eosinófilos/mastocitos y liberación de IgE e IgG4
Células a las que pueden llegar a activar	Macrófagos, neutrófilos y linfocitos B productores de IgG fijadores de complemento y opsonizadores	Linfocitos B para producir IgG e IgG4 (anticuerpos neutralizantes) y eosinófilos. Suprime la activación de macrófagos

Tabla 2. Tabla en la que se resumen las principales características que diferencian las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ Th1 y Th2.

4.4.2. Linfocitos T CD8⁺

Su principal función es la eliminación de microorganismos intracelulares mediada por la destrucción de la célula infectada. Dicha destrucción celular es específica del antígeno y dependiente de contacto, es decir, destruyen a las dianas que presentan el mismo antígeno asociado al HLA de clase I que desencadenó la proliferación y diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ en CTL, pero no destruyen a las células adyacentes no infectadas que no expresan este antígeno.

Cuando el reconocimiento por parte del HLA de clase I tiene lugar, debe formarse un conjugado adicional formado por la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), principal ligando del LFA-1. En este momento, el conjugado de activación ya se ha formado por completo y el CTL induce en la célula diana una serie de cambios que promueven la muerte celular mediante apoptosis.

5. Tipos no usuales de linfocitos T

Se ha identificado en sangre periférica de personas sanas una población de linfocitos T que presenta un marcador de células NK. Estos linfocitos son CD8⁺CD56⁺CD161⁻ y en su mayoría no son linfocitos memoria (CD45RO⁻). Se les denomina CD8 T reguladoras y tras su activación *in vitro* son capaces de lisar linfocitos T CD4⁺ activados, sin importar la compatibilidad HLA. Además existe otra población CD8⁺CD56⁺CD161⁺ a las que se denomina NKT (*Hu D y col., 2013*). El término NKT se utiliza indistintamente para distintos tipos celulares en diversos estudios por lo que es bastante ambiguo.

Actualmente, se recomienda usar la terminología NK-like T cells. En general, se necesitaría hacer una caracterización fenotípica y funcional mucho más profunda para llegar a entender el mecanismo de adaptación de estas células a procesos tan importantes como envejecimiento, autoinmunidad, inflamación y respuesta a antígenos virales o tumorales.

Un aumento en la expresión de marcadores de NK en linfocitos CD8⁺ se ha asociado con inmunosenescencia y con activación crónica del sistema inmune (*Tarazona R y col., 2000*).

6. Antecedentes de la teoría humoral del trasplante

Desde la década de los 50 del pasado siglo XX, se plantea una de las cuestiones más controvertidas en el mundo del trasplante: ¿Los rechazos de los injertos son producidos por células o por anticuerpos?

Bien es cierto, que los anticuerpos son producidos por células, por lo que en este sentido sería correcto decir que todos los rechazos son celulares. Pero la principal diferencia entre la teoría celular y humoral es si el daño al injerto se genera principalmente por la acción de los anticuerpos o por el efecto directo que ejercen los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, entre otros tipos celulares (*Terasaki PI, 2003*).

Durante más de 40 años, fue ampliamente aceptada como correcta la teoría celular que propuso Sir Peter Medawar, hasta el punto de que fue considerada casi un dogma de la inmunología del trasplante. No obstante, Gorer fue el primero en mostrar en modelos animales, que ratones trasplantados podían llegar a producir anticuerpos dirigidos frente a antígenos del locus H-2 de histocompatibilidad cuando existían incompatibilidades entre donante y receptor (*Gorer PA, 1956*).

Gracias a estos estudios, se llevó a cabo un esfuerzo internacional de colaboración en el que se pretendía encontrar anticuerpos dirigidos frente a los antígenos del sistema HLA humano. El papel que pueden llegar a alcanzar estos anticuerpos en la disfunción del injerto quedó patente en los trasplantes renales en los que el receptor tenía ya anticuerpos preformados frente al HLA del injerto, despertando el conocido como rechazo hiperagudo (*Patel R y Terasaki PI, 1969; Terasaki PI y Cai J, 2005*). Posteriormente se ha observado el papel que juegan estos anticuerpos en otro tipo de trasplantes, tales como el de pulmón (*Frost AE y col., 1996; Scornik JV y col., 1999*) y corazón (*Higuchi ML y col., 1989*).

Por otro lado, un gran número de publicaciones han confirmado la asociación existente entre la presencia de depósitos de C4d en biopsias de riñón, como marcador de rechazo humoral en situaciones de rechazo mediado por anticuerpos (*Feutch HE y col., 1998; Crespo M y col., 2001; Watschinger B y Pascual M, 2002*).

7. Sistemas menores de histocompatibilidad

En el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) HLA-idéntico, se pueden dar situaciones en las que exista disparidad genética en proteínas polimórficas entre donante y receptor capaces de despertar una respuesta inmunitaria que puede desencadenar una enfermedad injerto contra huésped (EICH), ya sea aguda o crónica. Estas proteínas se denominan antígenos menores de histocompatibilidad (mHags) (*Simpson E, y col., 2002*). Los mHags se han identificado tradicionalmente como péptidos discretos que son reconocidos por las células T del donante tras el alo-TPH (Trasplante de progenitores hematopoyético alogénico). Estos péptidos podrán ser presentados tanto por HLA de clase I como de clase II observándose respuesta tanto en los linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺.

La existencia de estos mHags se debe a que existen variaciones individuales en la secuencia del ADN, estimadas en un 0,1% en el genoma humano, que pueden provocar que entre donantes y receptores HLA idénticos, haya un gran número de genes codificantes en los que difieran. Estas variaciones de la secuencia de ADN, conocidas como polimorfismos genéticos, pueden tener o no consecuencias biológicas selectivas y deben detectarse en al menos el 1% de los individuos de una población. En la práctica, para que un locus sea considerado polimórfico, el alelo más común de dicho locus debe tener una frecuencia poblacional menor del 99% y, de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg, al menos un 2% de la población debe ser heterocigota para ese locus. Estos caracteres suelen ser estables y se transmiten por herencia mendeliana simple y constituyen una expresión de la diversidad genética entre individuos de la misma especie. Las primeras variaciones genéticamente determinadas se hallaron en proteínas de los eritrocitos, denominados por ello antígenos de grupos sanguíneos.

Los polimorfismos pueden ir desde la modificación de una sola base (SNP, *single nucleotide polymorphism*), hasta cambios en número y/o tamaño en la unidad de repetición, siendo la más común en el alo-TPH la delección de la secuencia codificante para una proteína.

Como ejemplo de mHags cuyo polimorfismo se debe a un SNP, se han descrito en la literatura las proteínas HA-1, HA-2, HA-3 y HA-8. Todas ellas están codificadas por genes autosómicos con polimorfismos de un solo nucleótido que son reconocidos por las células del donante en el organismo huésped tras el alo-TPH (*den Hann JM y col., 1995; Brickner AG y col., 2001; Spierings E y col., 2003; den Haan JM y col., 1998*). Cada SNP es capaz de generar un antígeno lo suficientemente inmunogénico como para conseguir que los linfocitos T del donante lo reconozcan en las células del receptor cuya consecuencia clínica sería la aparición de EICH.

Otro ejemplo de mHags son los derivados de proteínas del cromosoma Y. Estas proteínas son diferentes en ciertos aminoácidos dependiendo de si son codificadas por el cromosoma Y o por el cromosoma X, cuyos productos génicos muestran una identidad entre el 91 y el 99%. Pues bien, estos antígenos son capaces de despertar una respuesta tipo T en las células de los donantes dirigida contra las células del receptor cuando hay una incompatibilidad sexual entre ambos (D mujer / R varón), incrementándose el riesgo de padecer EICH si se compara con otras combinaciones sexuales de donante-receptor (*Kollman C y col., 2001*). Algunos ejemplos de proteínas ligadas al cromosoma Y capaces de despertar la respuesta inmune celular en este contexto de alo-TPH son DBY (*Dead-box 3, Y-linked*), UTY (*Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on Y chromosome*), ZFY (*Zinc Finger Protein, Y-linked*), RPS4Y

(*Ribosomal Protein S4, Y-linked*) y EIF1AY (*Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked*) (Wang W y col., 1995; Vogt MH y col., 2002; Skaletsky H y col., 2003; Randolph SS y col., 2004).

No obstante, también se ha descrito una respuesta humoral ligada a estas proteínas. De hecho, está bien establecido que un 50% de receptores varones que reciben una infusión de células de donantes mujeres, pueden llegar a desarrollar anticuerpos dirigidos frente a proteínas del cromosoma Y, en concreto frente a la proteína DBY, (Miklos DB y col., 2004) que están relacionados con el desarrollo de EICH crónica (Miklos DB y col., 2005).

Una proteína susceptible de ser estudiada en el contexto de SNP asociado al desarrollo de EICH es el caso de la Glutación S-transferasa P1 (GSTP1), donde un cambio en un solo nucleótido produce un polimorfismo en la posición 105 de isoleucina (Ile) por valina (Val). La distribución del alelo mayoritario Ile/Ile en la población caucásica es del 42-69%, mientras que la frecuencia en homocigosis Val/Val es del 10% y en heterocigosis Ile/Val del 35% (Gao Y y col., 2009). La disparidad entre donante y receptor para la GSTP1 no se ha estudiado en el contexto de EICH tras el alo-TPH, pero existen otros polimorfismos del tipo SNP que se han asociado a EICH, tales como IL-17 (Espinoza JL y col., 2011) o el receptor de IL-23 (Wermke M y col., 2010).

Por otro lado, existen numerosos ejemplos de mHags procedentes de la delección completa de la parte codificante de la proteína. Debido a que el sistema inmune de ese individuo sería homocigoto para la delección, presumiblemente su sistema no ha aprendido a tolerar la proteína codificada por ese gen, por lo que podrá llegar a reconocerla como un alo-antígeno (Murata M y col., 2003).

No obstante, para que la delección de una proteína sea considerada como mHag potencial, debe cumplir ciertos criterios (McCarroll SA y col., 2009), la delección del alelo debe tener una frecuencia en la población superior al 10% y es indispensable que la localización natural de la proteína delecionada esté asociada a uno o más tejidos en los que se desarrolle EICH. Por lo que, algunas proteínas que cumplen estas características son la UDP-glicosiltransferasa 2B17 (UGT2B17) y 2B28 (UGT2B28), OR51A2 (proteínas de receptores olfativos), LCE3C (*Late Cornified Envelop*) y enzimas metabolizadoras de fármacos de la familia de las Glutación-S-transferasas GSTM1 y GSTT1, las cuales presentan el alelo nulo en un 50% y 20% de la población caucásica, respectivamente.

Aunque este tipo de delecciones se han estudiado ampliamente en su posible relación con diversos tipos de cáncer (Economopoulos KP y Sergeantanis TN, 2010; Zhang ZJ y col., 2011; Nadeau G y col., 2011), en el caso de la proteína UGT2B17, cuya delección está presente en el 12% de la población caucásica, se ha demostrado que la disparidad genética entre donante y receptor tras el alo-TPH, puede llegar a despertar el reconocimiento por parte de los linfocitos T del donante como alo-antígenos, lo que podría llegar a desencadenar la EICH (Terakura S y col., 2007). Incluso se ha demostrado la respuesta inmune humoral en un paciente que desarrolló anticuerpos anti-UGT2B17 (McCarroll SA y col., 2009). Por tanto, ya hemos observado la importancia que pueden llegar a tener los anticuerpos dirigidos frente a mHags en el contexto del alo-TPH.

De entre estos mHags, el mejor estudiado por nuestro grupo en el trasplante de órganos sólidos es el formado por el sistema GSTT1 que a continuación explicaremos con detalle.

8. Anticuerpos anti-GSTT1 en el trasplante de órganos sólidos

El sistema menos de histocompatibilidad más ampliamente estudiado en nuestro grupo es el formado por la proteína Glutación S-Transferasa T1 (GSTT1).

La GSTT1 es una enzima citosólica que actúa en la fase II de la detoxificación de fármacos. Tiene 29 kDa de peso molecular y su localización es muy variada, pero destacan el hígado, riñón, eritrocitos, paratiroides y próstata como tejidos en los que se expresa en mayor grado. En la población caucásica existe un 20% de personas que presentan genotipo nulo para la GSTT1, es decir, son homocigotos para la delección del gen y por tanto no la expresan, mientras que el 80% restante de la población, bien sean heterocigotos u homocigotos para el gen silvestre, sí expresan esta proteína.

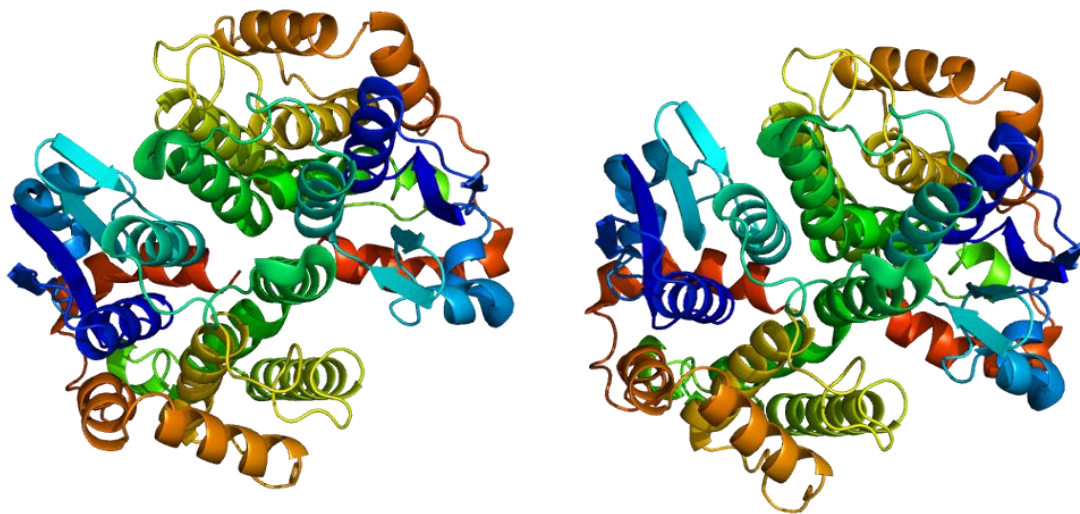


Imagen 6. Estructura terciaria de la proteína GSTT1.

Nuestro grupo ha descrito previamente, tanto en trasplante renal (Aguilera I y col., 2005; Aguilera I y col., 2008) como en hepático (Aguilera I y col., 2001; Aguilera I y col., 2004), que en el momento en el que el sistema inmune de un receptor nulo recibe un injerto positivo para la GSTT1 puede desarrollar anticuerpos anti-GSTT1. Dichos anticuerpos, preceden al desarrollo de la hepatitis inmune (HI) *de novo*, en el caso del trasplante hepático, y del rechazo mediado por anticuerpos, en el caso del trasplante renal. Estas enfermedades pueden desencadenar la pérdida de la funcionalidad del injerto si no se administra el tratamiento adecuado, consistente en esteroides.

En el caso de la HI *de novo*, la primera vez que se describió fue hace algunos años como una nueva forma de disfunción del injerto en niños sometidos a trasplante hepático debido a otras indicaciones que no implicaban la hepatitis autoinmune. Los criterios mínimo de diagnóstico de la HI *de novo*, acordados en Banff, incluyen que existan infiltrados linfocitarios en las regiones portales, presencia significativa de anticuerpos, que en nuestro caso serán dirigidos frente a la proteína GSTT1, hipergammaglobulinemia y exclusión diagnóstica de otros tipos de hepatitis como la viral o la derivada de fármacos (Banff Working Group).

A lo largo de estos años y tras haber analizado aproximadamente 700 trasplantes, entre renales y hepáticos, nuestro grupo ha demostrado que la producción de anticuerpos anti-GSTT1 sólo ocurre bajo la situación de incompatibilidad genética donante GSTT1-positivo / receptor GSTT1-nulo. En el resto de combinaciones (donante-positivo / receptor-positivo; donante-nulo / receptor-nulo y donante-nulo / receptor-positivo) no se han encontrado anticuerpos. De hecho, hemos observado que los únicos pacientes que se diagnostican de HI *de novo* son aquellos a los que les hemos detectado anticuerpos anti-GSTT1. Nuestro grupo ha descrito, además, la presencia de depósitos de C4d en las áreas portales de biopsias hepáticas de pacientes incompatibles trasplantados de hígado diagnosticados de HI *de novo*, lo que apoyaría la hipótesis del papel patogénico de los anticuerpos anti-GSTT1, aunque se desconocen los mecanismos (Aguilera I y col., 2011).

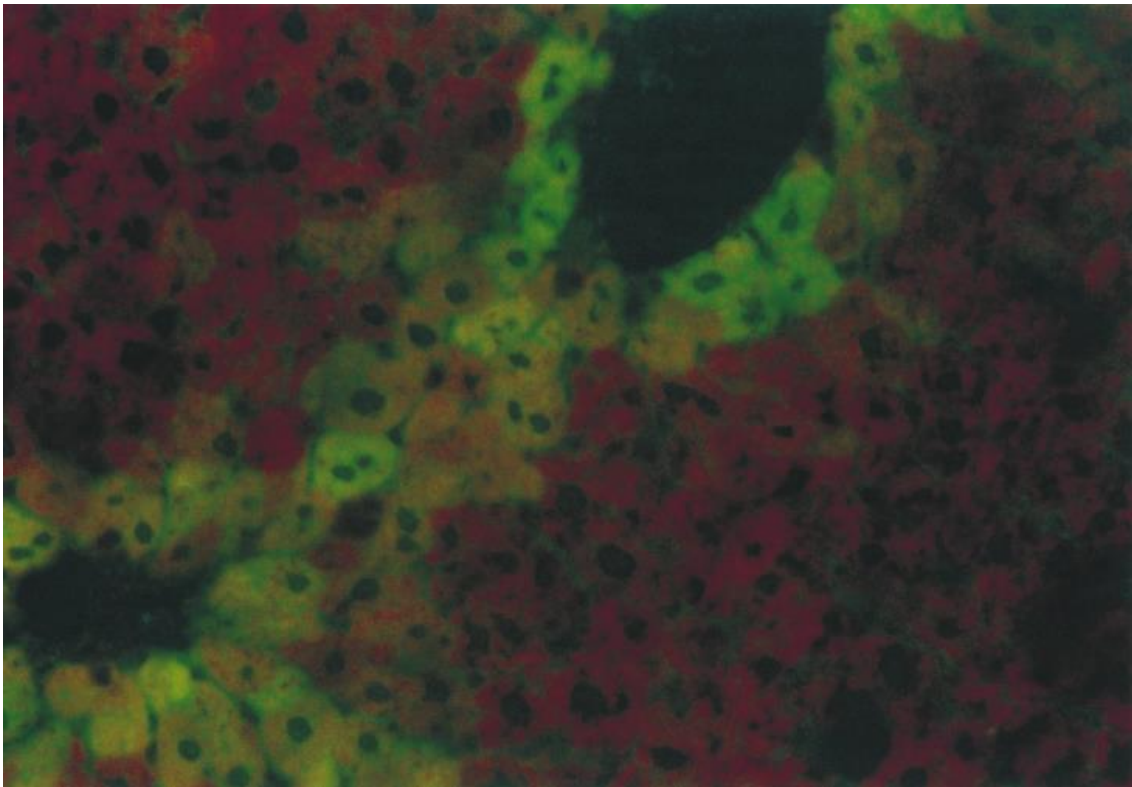


Imagen 7. Identificación del patrón producido mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) por los anticuerpos anti-GSTT1 en hígado de rata, presentes en el suero post-trasplante de un paciente GSTT1-nulo que recibió un hígado GSTT1-positivo (dilución del suero 1:80).

Estos anticuerpos también se han encontrado en el suero de las personas no trasplantadas con genotipo GSTT1-nulo, que han sido sometidas a transfusiones procedentes de donantes GSTT1- positivos, o en mujeres embarazadas de fetos GSTT1-positivos (Wichmann I y col., 2006). En el primer caso es debido a que la proteína se expresa en la membrana de los eritrocitos, lo que provoca que cuando el sistema inmune del paciente se pone en contacto con la proteína, genera una respuesta frente a ella mediada por linfocitos B. En el caso de las mujeres GSTT1-nulas que tienen hijos GSTT1-positivos, esta circunstancia puede repetirse al entrar en contacto las células del sistema inmunitario de la futura madre con la proteína expresada por el feto.

Si bien es cierto que no todos los casos de pacientes GSTT1-nulos que se ponen en contacto con la proteína llegan a desarrollar una respuesta inmunitaria frente a ésta, con estas evidencias podemos poner de manifiesto el alto grado de inmunogenicidad que presenta esta proteína.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Pensamos que para el desarrollo de la enfermedad se requieren dos pilares fundamentales:

- Por un lado, la presencia de linfocitos B alo-específicos frente a GSTT1, los cuales:
 - Producen anticuerpos GSTT1-específicos. No se conoce si estos anticuerpos tienen un papel patogénico ya que el antígeno diana se localiza en el citoplasma celular, aunque se desconoce si en determinadas situaciones se expresa en superficie. Otro concepto fundamental es la faceta de los linfocitos B como células presentadoras de antígeno. Además, estas células son importantes en el mantenimiento de la respuesta inmunitaria prolongada en el tiempo.
- Por otro lado la presencia de linfocitos T alo-específicos frente a GSTT1, los cuales:
 - Creemos que son los responsables de provocar el daño tisular con el consiguiente fracaso del injerto.

Objetivos

Dilucidar los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de la hepatitis inmune *de novo*:

1. Explorar la distribución celular de la proteína GSTT1 y estudiar la implicación de los anticuerpos GSTT1 específicos en el fracaso del órgano trasplantado.
2. Determinar la presencia de linfocitos T alo-específicos frente a la proteína GSTT1.
3. Dilucidar el papel que desempeñan los linfocitos T alo-específicos de GSTT1 en el rechazo del injerto.

PACIENTES

Pacientes

De los individuos que fueron trasplantados de hígado entre los años 1996 y 2011 en el HUVR de Sevilla, se seleccionó un número de 25 pacientes (genotipo GSTT1 nulo) atendiendo a la condición de riesgo (donante GSTT1 positivo / receptor nulo). De igual modo, se escogió otro número de 4 pacientes (genotipo GSTT1 positivo), los cuales conformaron el grupo control. Debido a la distinta metodología experimental llevada a cabo, el número de pacientes que componen cada grupo será especificado en cada apartado correspondiente. En todos los casos los trasplantes se realizaron de donante cadáver. Las muestras biológicas de los pacientes siempre fueron procesadas siguiendo los parámetros marcados en la Declaración de Helsinki del año 1975 y tras llevarse a cabo la firma del consentimiento informado.

En este caso, hemos de agradecer al Servicio de aparato digestivo y al Servicio de inmunología del HUVR de Sevilla, por su colaboración en nuestro estudio, ya que nos ofrecieron toda la información clínica que podíamos necesitar referente a los diagnósticos de rechazo, evolución y tratamiento inmunosupresor que recibieron dichos pacientes.

Con respecto al diagnóstico de Hepatitis Inmune (HI) *de novo* se llevó a cabo según marcan los criterios de los que se rige el Servicio de Anatomía Patológica del HUVR, mediante la detección de anticuerpos anti-GSTT1 en el Servicio de Inmunología y otros parámetros bioquímicos.

MÉTODOS

Métodos

1. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica

Tras recopilar las muestras de sangre periférica de todos los participantes en el estudio, realizamos la extracción de ADN usando el siguiente método comercial:

1.1. *Sistema MagNA Pure Compact (Roche, Mannheim, Alemania)*

Con esta tecnología, el ADN se une selectivamente a bolas paramagnéticas en presencia de sales caotrópicas mientras que el resto de los contaminantes son eliminados de la muestra. El ADN purificado se eluye de la solución con las bolas paramagnéticas bajo condiciones de baja salinidad y quedando listo para ser usado en posteriores aplicaciones con una concentración aproximada de 40-50 ng/ μ l.

2. Caracterización genética de nuestra población de estudio atendiendo a un sistema menor de histocompatibilidad (mHags)

2.1. *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Para conocer la distribución genética de los distintos alelos que estudiaremos en la población tanto de trasplantados como en la de sus donantes, llevamos a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cuyo objetivo es la obtención de un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo.

El fundamento de dicha técnica, desarrollada en 1986 por Kary Mullis (*Mullis K y col., 1986*), es usar la propiedad natural de las enzimas ADN polimerasas para replicar hebras de ADN cuando están en presencia de una secuencia molde o cebador, capaz de servirle de inicio, y de los nucleótidos (dNTPS; *New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra*) necesarios para llevar a cabo dicha replicación. Para ello, emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación, y a continuación, dejar que vuelvan a unirse las polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

Los cambios de temperatura se realizan en el termociclador, y oscilan entre los 55 y los 95 °C, por lo que se hace imprescindible el uso de ADN polimerasas termoestables, como es la Taq polimerasa (*New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra*). Dicha Taq polimerasa, para actuar óptimamente, necesita un ambiente salino específico generado por una solución tamponante específica suministrada por la misma casa comercial (*New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra*).

El proceso de PCR consiste, por lo general, en una serie de 30 a 45 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos, consistiendo cada uno de ellos en 2 o 3 pasos a diferentes temperaturas. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros, entre los que destaca la temperatura óptima de unión de los

cebadores, así como la longitud del ADN que se desea amplificar. De tal forma que las condiciones fueron las siguientes:

- Paso 1- Desnaturalización inicial, 94°C durante 5 minutos.
- Paso 2- 40 ciclos con 3 pasos cada ciclo:
 - Desnaturalización, 94°C durante 30 segundos.
 - Unión al cebador, durante 45 segundos.
 - Extensión, 72°C durante 1 minuto.
- Paso 3- Extensión final, 72°C durante 5 minutos.

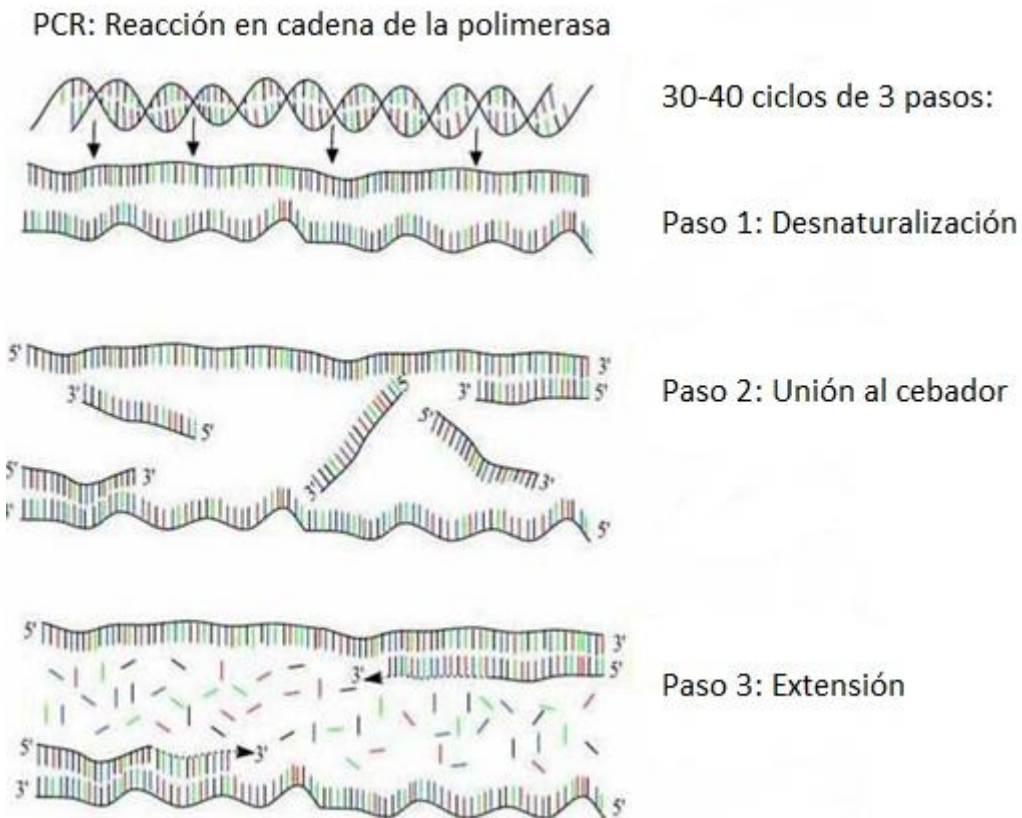


Imagen 8. En este gráfico se esquematizan los distintos procesos por los que pasa el ADN en un ciclo en el termociclador, donde se alternan procesos de desnaturalización del ADN, unión del cebador y extensión por la enzima Taq polimerasa.

2.2. Electroforesis en gel de agarosa

Los distintos productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis horizontal en gel de agarosa 2%, llevándose a cabo a un voltaje constante de 180 voltios durante aproximadamente 30 minutos.

2.3. Relación de los cebadores usados

2.3.1. Genotipo de la Glutación S-transferasa T1 (GSTT1)

Para llevar a cabo el genotipado en la proteína GSTT1, se usaron el cebador GSTT1 forward (o cebador sentido) con la secuencia 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3', y el cebador GSTT1 reverse (o cebador antisentido) 5'TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'. Como control interno de la reacción recurrimos a la amplificación del gen K-Ras, haciendo uso del cebador forward o sentido: 5'-GTA CTG GTG GAG TAT TTG ATA GTG-3' y el cebador reverse o antisentido: 5'-TAG CTG TAT CGT CAA GGC AC-3'. La temperatura óptima de unión al cebador para ambas amplificaciones es de 58°C.

Reactivos	Cantidad
ADN (35-50 ng/μl)	2 μl
Solución tamponante 10X	5 μl
DNTPs	0.4 μl
GSTT1 forward	0.2 μl
GSTT1 reverse	0.2 μl
K-Ras forward	0.2 μl
K-Ras reverse	0.2 μl
Taq polimerasa	0.2 μl
Agua c.s.p.	50 μl

Si la muestra analizada es positiva para GSTT1, ya sea homocigota o heterocigota, aparecerá una banda de 498 pares de bases, además de la debida a la amplificación de K-Ras que será de en torno a 190 pares de bases. En cambio, si es homocigota nula, sólo aparecerá la banda correspondiente a la amplificación de K-Ras (*Pemble S y Col., 1994*).

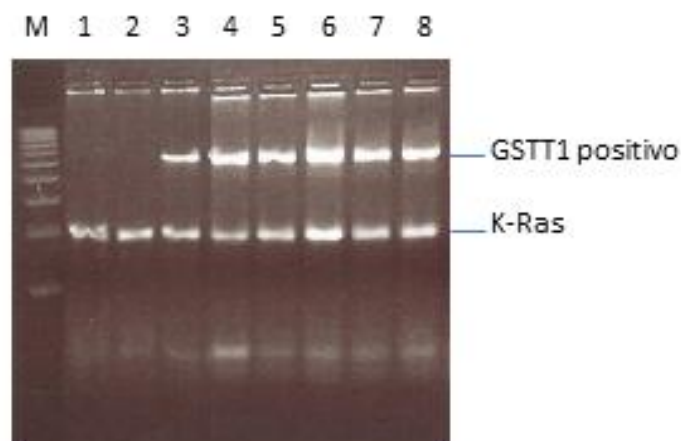


Imagen 9. Observamos cómo en esta electroforesis horizontal, en los carriles 1 y 2 los pacientes parecen ser GSTT1-nulos, ya que sólo se observa la banda de 190 pb correspondiente a la amplificación del control interno de reacción, el K-Ras. En cambio en los carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8 los pacientes son GSTT1 positivos por presentar una banda de 498 pb.

Para distinguir entre los pacientes con genotipo positivo, los que eran homocigotos (+/+) de los heterocigotos (+/-), realizamos una segunda PCR- Con esta PCR lo que conseguimos amplificar es precisamente la secuencia delecionada. Para ello, los cebadores usados fueron GSTT1-Null *Forward* 5'-GGA TTA CAG TTG TGA GCC ACG GTA-3' y GSTT1-Null *Reverse* 5'-ACA CCG GGG TGG TTG AT-3'. El programa del termociclador usado fue un poco distinto al programa general antes explicado (Naito M y col., 2006):

- Paso 1- Desnaturalización inicial, 95°C durante 10 minutos.
- Paso 2- 35 ciclos con 3 pasos cada ciclo:
 - Desnaturalización, 95°C durante 1 minuto.
 - Unión al cebador, 59° durante 1 minuto.
 - Extensión, 72°C durante 1 minuto.
- Paso 3- Extensión final, 72°C durante 5 minutos.

Reactivos	Cantidad
ADN (35-50 ng/μl)	2 μl
Solución tamponante 10X	5 μl
DNTPs	0.4 μl
GSTT1-Null forward	0.2 μl
GSTT1-Null reverse	0.2 μl
Taq polimerasa	0.2 μl
Agua c.s.p.	50 μl

Si tras la electroforesis en gel de agarosa de 2% confirmamos la amplificación de un producto de 580 pares de bases aproximadamente, esos pacientes serán nulos para la GSTT1. Si en cambio no se amplifica nada, el paciente será GSTT1 positivo.

3. Obtención de muestras de suero de los pacientes trasplantados hepáticos

De los pacientes incluidos en el estudio obtuvimos muestras de suero, considerando imprescindible que los sueros fueran recogidos a distintos tiempos post-trasplante, de tal forma que se tomaron de forma seriada desde el primer mes post-trasplante hasta completar un seguimiento mensual mínimo de 9 meses o hasta el momento de exitus del paciente. También obtuvimos muestras de suero en situación pre-trasplante.

4. Determinación de anticuerpos anti-GSTT1 mediante test de ELISA

4.1. *Determinación de anticuerpos anti-GSTT1 de isotipo IgG total*

Para determinar la presencia y título de los anticuerpos presentes en las muestras de suero y plasma de los pacientes trasplantados de hígado, usamos el test ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción) comercializado por *Biomedal* (Sevilla, España) que está cebado con la proteína

humana recombinante GSTT1. Este es un ensayo inmunocromatográfico diseñado para la detección de anticuerpos dirigidos contra la GSTT1 en sueros humanos ya que tras varias incubaciones y lavados, termina produciéndose una reacción colorimétrica que se relaciona de forma no lineal con la cantidad de anticuerpos anti-GSTT1 presente en los pocillos.

El protocolo empleado en este caso fue el marcado por el fabricante. En resumen, la técnica consiste en una incubación de 1 hora entre la proteína recombinante y la dilución 1:100 del suero de estudio. Tras los lavados correspondientes, se procedió a llevar a cabo una segunda incubación, pero esta vez, con el anticuerpo secundario anti-humano IgG completa, conjugado con fosfatasa alcalina (AP). De este modo, al añadirle el sustrato cromogénico que el fabricante suministra, se produce una reacción colorimétrica con la AP y, tras analizar la señal espectrofotométricamente, a una longitud de onda de 405 nm, obtenemos el título bruto de anticuerpos. Todo el proceso debe realizarse por duplicado y el valor final será la media de ambos menos el valor de absorbancia obtenido por el blanco. Usando las recomendaciones del fabricante, tomamos como valores positivos aquellos en los que la absorbancia media a 405 nm era superior a 1 y negativos aquellos en los que la absorbancia no alcanzara el valor 0.5. La zona cuyos valores oscilan entre 0.5 y 1 es considerada zona gris, cuyos resultados deben ser analizados con precaución y atendiendo a posibles valores positivos o negativos en muestras posteriores en el tiempo a la analizada.

4.2. Determinación de las distintas subclases de anticuerpos anti-GSTT1

Gracias al experimento anterior podemos determinar si nuestra población de pacientes posee anticuerpos IgG específicos frente a la proteína GSTT1, pero no somos capaces de discernir la subclase de dichos anticuerpos. Para ello llevamos a cabo el mismo experimento, pero usando esta vez unos anticuerpos secundarios específicos de cada subclase, de tal forma que haremos un barrido sobre las cuatro posibilidades: anticuerpo monoclonal secundario anti-humano hecho en ratón dirigido frente a IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 todos ellos conjugados con fosfatasa alcalina (*AbCam*, Cambridge, Reino Unido).

En este caso, y debido a que hemos cambiado las condiciones del kit comercial, ajustaremos las absorbancias obtenidas en cada una de las subclases en función del valor mayor obtenido, para ello, las equipararemos al valor máximo en proporción tanto por 1. Consideraremos que los anticuerpos anti-GSTT1 son positivos para un isotipo determinado si el valor ajustado en tanto por 1 es superior a 0.33, ya que dicho valor será 3 veces inferior al valor máximo.

5. Exploración de la distribución celular de la proteína GSTT1

Con el objetivo de estudiar la localización celular de nuestra proteína de interés, hemos usado la línea celular HepaRG. Ésta procede de un hepatocarcinoma humano adquirida comercialmente (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU). Estas células son progenitores bipotenciales, lo cual les permite diferenciarse en hepatocitos y colangiocitos (ratio 1:1). Para conseguir dicha diferenciación en los dos tipos celulares mencionados anteriormente, se llevó a cabo el siguiente protocolo de trabajo (*Cerec y Col., 2007*):

- 4 días con medio William's E completo.
- 14 días con medio William's E completo suplementado al 1,7% con DMSO.

5.1. *Caracterización línea celular HepaRG*

Con objeto de verificar la correcta diferenciación de nuestra línea celular en hepatocitos y colangiocitos, empleamos pellet de células diferenciadas y cultivadas durante 81 días (5×10^5 células aproximadamente). Para ello utilizamos la técnica de western blot. Dicha técnica consta de los siguientes de pasos:

- Lisis celular
- Cuantificación del extracto
- Preparación de gel de proteína
- Transferencia a membrana de nitrocelulosa
- Inmunoblot

5.1.1. Lisis celular

Añadir cóctel de inhibidor de proteasas (*Sigma Aldrich*, MI, EEUU) a la concentración adecuada (1 μ l de inhibidor de proteasas en 100 μ l de buffer de lisis). A partir de este momento todo el proceso se realiza en hielo. Para un botón de células de aproximadamente 50 μ l, añadir 100-500 μ l de buffer de lisis NP-40. Machacar durante 1 minuto con una varilla y dejar durante 30 minutos en hielo. Repetimos el paso anterior. A continuación, centrifugar a 4°C, 12000 rpm durante 30 minutos. Seguidamente, recoger el sobrenadante con cuidado y pasar a un tubo nuevo. Finalmente, guardar en el congelador a -20°C.

5.1.2. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteína usamos el kit "Pierce BCA Protein Assay Kit" (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.1.3. Preparación gel de proteína

Colocar dos cristales limpios con en la cubeta de sujeción con las dos tiras grises a los lados. Preparar e introducir en los cristales con ayuda de una pipeta Pasteur el "resolving gel" al 10% con cuidado de no formar burbujas. Cubrir con etanol para evitar que el gel quede en contacto con el aire y dejar polimerizar durante 15 minutos. Pasado ese tiempo, retirar el etanol y lavar el gel unas 2-3 veces con agua destilada. A continuación, preparar y cargar el "stacking gel" al 4% y colocar el peine para que se formen los pocillos de carga. Dejar polimerizar durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, quitar el peine, lavar el gel unas 2-3 veces con agua

destilada. Posteriormente, colocar el gel en la cubeta de electroforesis y añadir “running buffer”. Preparar la muestra, para la cual, mezclar la muestra de proteína con el buffer de carga en proporción 1:1, calentar la muestra en agua hirviendo durante 3 minutos. Cargar el marcador de peso molecular y la muestra. Finalmente, correr el gel a 200 V durante una hora.

5.1.4. Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Poner dos esponjitas bien empapadas en buffer de transferencia en una cubeta mediana por cada gel obtenido. Rellenar otra cubeta con buffer de transferencia, poner 2 papeles de filtro 1 una membrana de nitrocelulosa, por cada gel, para que empapen. Quitar los cristales con cuidado para evitar romper los geles. De nuevo, rellenar otra cubeta mayor con buffer de transferencia. Sacar los cristales de la cubeta de donde hemos realizado la electroforesis y colocarlos en la cubeta mayor con buffer de transferencia. Sobre una placa agujereada colocar una esponjita. A continuación, poner un papel de filtro y sobre él se coloca el gel. Posteriormente, poner la membrana de nitrocelulosa y presionar suavemente con una varilla de vidrio para quitar las burbujas. Por último, colocar otro papel de filtro, otra esponjita y cerrar la estructura. Introducir la placa en la estructura de transferencia y posicionarla sobre el agitador magnético. Poner hielo en la estructura de transferencia y un imán, con objeto de activar la agitación de manera suave. Realizar la transferencia a 100 V durante una hora. Tras finalizar la transferencia, desmontar la estructura, recoger la membrana, cortar en tiras y conservar a -20°C.

5.1.5. Inmunoblot

Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave, las tiras con la solución de bloqueo para bloquear los anticuerpos inespecíficos. Tras el bloqueo inicial, incubar las tiras con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo a la concentración deseada, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave. En nuestro caso, se utilizaron los anticuerpos:

- Rabbit anti-human HNF-4 α (1:100) (*AbCam*, Cambridge, Reino Unido).
- Rabbit anti-human CK19 (1:10000) (*AbCam*, Cambridge, Reino Unido).
- Rabbit anti-human ALDOB (1:250) (*AbCam*, Cambridge, Reino Unido).
- Rabbit anti-human β -actina (1:10000) (*AbCam*, Cambridge, Reino Unido).

Transcurrido ese tiempo, realizar tres lavados de 10 minutos en agitación con TTBS. A continuación, añadir el anticuerpo secundario disuelto en solución de bloqueo y dejar durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave. En nuestro caso, se usó el anticuerpo goat anti-rabbit IgG (H-L) (1:20000) (*AbCam*, Cambridge, Reino Unido). Posteriormente, volver a repetir los 3 lavados. Para el revelado, se utilizó el reactivo de detección de Western Blotting GE Healthcare Life Sciences™ Amersham™ ECL Select™ (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, la señal se registró usando el sistema ImageQuant LAS 4000 mini.

En esta imagen podemos observar los resultados para los distintos marcadores ensayados por western blot. El marcador HNF-4 α es característico de células HepaRG diferenciadas en hepatocitos, el marcador CK19 es específico de células HepaRG diferenciadas en colangiocitos,

mientras que el marcador ALDOB aparece en ambos tipos celulares. Como control interno usamos el marcador β -actina. Podemos apreciar positividad en todos los marcadores utilizados, lo cual confirma la diferenciación en los dos tipos celulares posibles (hepatocitos y colangiocitos).

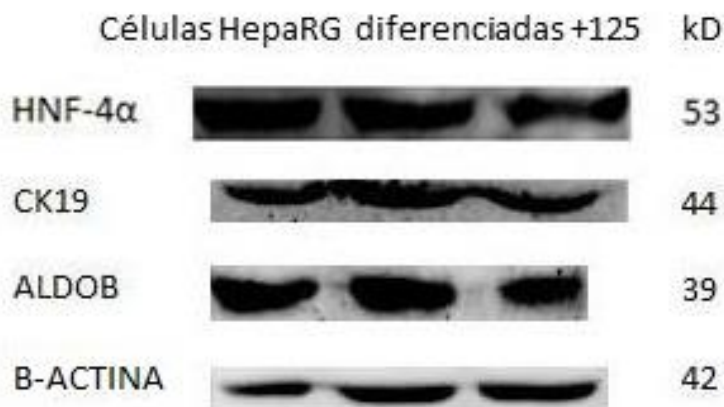


Figura 1. Resultados de la caracterización celular de la línea celular HepaRG mediante western blot.

6. Estudio de la distribución celular de la proteína GSTT1

Aunque se conoce que la proteína GSST1 tiene una expresión citoplasmática, decidimos estudiar la expresión de dicha proteína a nivel de superficie. El objetivo de esto es determinar si la proteína llega a expresarse en superficie para actuar como diana y poner en marcha los mecanismos responsables de la respuesta T. Para ello se idearon dos abordajes experimentales distintos: inmunocitoquímica y citometría de flujo.

6.1. Inmunocitoquímica

Inicialmente, la línea celular HepaRG se cultivó sobre cubres (previamente esterilizados) en placa de cultivo formada por 12 pocillos estéril (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU). Las células se dejaron crecer hasta que se expandieron y ocuparon la superficie del cubre. A continuación, tomamos los cubres con las células y los pasamos a una nueva placa de 12 pocillos no estéril para lavar con PBS. Posteriormente, fijamos las células con metanol previamente enfriado a -20°C durante 6 minutos. Seguidamente, algunos cubres fueron permeabilizados con solución de tritón 0,5% en PBS durante 10 min para usarlos como comparativa con los cubres de células sin permeabilizar. Realizamos 3 lavados con PBS. Llegados a este punto, incubamos con el anticuerpo primario (suero de pacientes con la enfermedad y que presentan anticuerpos anti-GSTT1, cuyo título había sido evaluado previamente, a una dilución (1:20)) durante 45 min. Tras la incubación, lavamos 3 veces con PBS e incubamos con el anticuerpo secundario (mouse anti-human IgG FITC (*Jackson ImmunoResearch Europe Ltd*, Cambridge, Reino Unido), dilución (1:100), durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente, lavamos 3 veces con PBS, añadimos medio de montaje con DAPI (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) y montamos el cubre sobre un porta.

6.2. Inmunocitoquímica in vivo

Inicialmente, cogemos los cubres con las células y los pasamos a una nueva placa de 12 pocillos no estéril para lavar con PBS-BSA 0,1% en agitación suave. Seguidamente, descomplementar los sueros a 56°C durante 30 minutos. A continuación, realizamos un comarraje con los anticuerpos primarios durante 2 horas en agitación suave:

- Suero de pacientes con la enfermedad y que presentan anticuerpos anti-GSTT1, cuyo título había sido evaluado previamente, a una dilución (1:20).
- Marcador de membrana mouse anti-human CD81 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU), dilución (1:50).

Transcurrido el tiempo de incubación, lavar las células 3 veces con PBS-BSA 0,1% en agitación suave. Posteriormente, fijamos las células en metanol frío a -20°C durante 6 minutos. De nuevo, realizamos 3 lavados con PBS-BSA 0,1% en agitación suave. Llegados a este punto, incubamos con los anticuerpos secundarios, dilución (1:300) durante 30 minutos en oscuridad y agitación suave:

- Goat anti-human IgG TRITC (*Jackson ImmunoResearch Europe Ltd*, Cambridge, Reino Unido).
- Goat anti-mouse IgG FITC (*Jackson ImmunoResearch Europe Ltd*, Cambridge, Reino Unido).

Finalmente, lavar 3 veces con PBS-BSA 0,1% en agitación suave, añadimos medio de montaje con DAPI (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) y montamos el cubre sobre un porta.

6.3. Citometría de flujo

Inicialmente, levantamos las células con tripsina-EDTA (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU). Añadimos suero fetal bovino (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) para bloquear el efecto de la tripsina. Seguidamente, lavamos las células con DPBS e incubamos con LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) según las instrucciones del fabricante. A continuación, lavamos las células con 1 ml de DPBS (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) y realizamos el marcaje con los anticuerpos primarios a la dilución recomendada por el fabricante durante 30 minutos:

- Rabbit anti-human GSTT1 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU).
- Mouse anti-human CD81 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU).

Transcurrido el tiempo de incubación, lavamos las células con 1 ml de DPBS (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) y realizamos el marcaje con los anticuerpos secundarios a la dilución recomendada por el fabricante durante 30 minutos en oscuridad:

1. Goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU).
2. Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU).

Finalmente, se hace un lavado con 1 ml de DPBS frío y resuspendemos el pellet celular en un volumen final de 500 µl de DPBS. La adquisición se llevó a cabo en un citómetro BD LSRIIFortessa (*BD Biosciences*, CA, EEUU) y para el análisis de datos se utilizó el software

FACSDiva 8.0 (*BD Biosciences*, CA, EEUU). Se adquirieron 80.000 eventos individuales (excluyendo dobletes) por cada muestra.

7. Medios de cultivo

Los cultivos primarios de PBMCs se realizaron con el medio de cultivo al que llamaremos medio RPMI completo, formado por medio RPMI 1640 suplementado con GlutaMAX, al cual hubo que adicionarle 10% Suero Fetal Bovino descomplementado (SFB), 100 IU de penicilina/ml y 100 µg de estreptomycin/ml. Todos los reactivos fueron encargados a la casa comercial (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU).

Los cultivos de la línea celular HepaRG se llevaron a cabo usando medio de cultivo William's E completo, compuesto por medio William's E suplementado con GlutaMAX (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU), al cual se le incorporó hidrocortisona hemisuccinato 50 µM (*Sigma Aldrich*, MI, EEUU), 10% SFB descomplementado (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU), insulina 5 µg/ml (*Sigma Aldrich*, MI, EEUU), 100 IU de penicilina/ml y 100 µg de estreptomycin/ml (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU). También se elaboró el mismo medio anterior suplementado con Dimetilsulfóxido (DMSO) al 1,7% (*Sigma Aldrich*, MI, EEUU).

8. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Las muestras de sangre de los trasplantados hepáticos fueron recogidas haciendo uso de los tubos BD Vacutainer® CPT™ cuyo aditivo era heparina de sodio (*Becton Dickinson (BD) Biosciences*, CA, EEUU). En el menor espacio de tiempo posible, los tubos fueron centrifugados a 1700 g durante 20 minutos a temperatura ambiente haciendo uso de la opción con aceleración y freno de la centrífuga. Una vez transcurrido este tiempo, procedimos a la recolección, tanto del plasma como del halo que contiene las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) y tras lavarlas con DPBS (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU), volvimos a centrifugar pero esta vez a 300 g durante 10 minutos. Este paso se repitió dos veces. A partir de este momento continuamos con el protocolo que de congelación que se describe en detalle más adelante.

9. Recuento y estudio de viabilidad celular

A las suspensiones celulares de todos los pacientes se les determinó la concentración celular y la viabilidad mediante la dilución con Azul Tripán (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) y recuento con microscopio en cámara de Neubauer (*Brand*, Wertheim, Alemania). El porcentaje de células vivas se estableció por la capacidad de exclusión del colorante.

10. Congelación celular

Una vez realizado el recuento celular, se procedió a la congelación de las PBMCs aisladas en condiciones de esterilidad. Para ello, ajustamos la dilución de las células en medio de congelación formado por SFB y 10% de DMSO (*Sigma Aldrich*, MI, EEUU) con el fin de tener una cantidad de $8-10 \times 10^6$ células por criotubo. Dicha dilución la realizamos en hielo para que las células no se vean afectadas por el aumento de temperatura que experimenta el SFB cuando se pone en contacto con el DMSO. Posteriormente, llevamos las células al congelador de -80°C usando el sistema "Mr. Frosty" el cual estará relleno de isopropanol. De esta forma conseguimos un descenso gradual de la temperatura de nuestras células (1°C por minuto) con objeto de lograr un reducido número de muerte celular debida a la congelación. Tras estar una noche a -80°C , pasamos las células a nitrógeno líquido, donde se conservarán hasta su uso, el cual será en un período siempre inferior a dos años.

11. Cultivos celulares

Todos los cultivos celulares se realizaron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar vertical, empleando materiales estériles de un único uso o bien de varios usos esterilizados en autoclave. Los cultivos se conservaron en una estada que mantenía una temperatura constante de 37°C , en atmósfera con 5% de CO_2 y 95% de humedad relativa.

12. Descongelación de células

Antes de llevar a cabo la descongelación celular debemos tener la precaución de tener todo el material listo y esterilizado dentro de la campana de cultivo, así como el medio celular correspondiente a temperatura ambiente, ya que todo el proceso de descongelación debe hacerse rápidamente debido a que la alta proporción de DMSO presente en el medio de congelación puede resultar tóxica a las células a temperatura ambiente.

Estando todo preparado, procedemos a extraer el tubo con células del nitrógeno líquido y las descongelamos rápidamente en un baño a 37°C . Tras este paso, llevamos el volumen completo del criotubo a un tubo de centrifugación de 15 ml el cual estará lleno de 12 ml de medio completo correspondiente. Con este paso conseguimos la dilución del DMSO y así minimizamos el efecto adverso que pueda ocasionarle a las células una vez descongeladas. Centrifugamos, sin aceleración ni freno a 300 g durante 10 minutos. Tras este paso, aspiramos el sobrenadante y resuspendemos el pellet adicionando otros 12 ml de medio completo y volviendo a centrifugar en las mismas condiciones. Retiramos el sobrenadante y volvemos a resuspender el pellet celular con los dedos. En este momento diluimos las células en un volumen de 2 ml para llevar a cabo el recuento y viabilidad celular siguiendo los pasos detallados con anterioridad. Tras la centrifugación y después de haber retirado el sobrenadante, procedemos a diluir las células en el medio completo necesario para su cultivo.

13. Determinación de linfocitos T alo-específicos frente a GSTT1

Encargamos a la empresa *Proimmune* (Oxford, Reino Unido) la síntesis de distintas combinaciones HLA-péptido tanto de clase I (pentámero) como de clase II (tetramero):

Pentámeros	
HLA clase I	PÉPTIDO
A*01:01	LTESVAILLY
A*02:01	YLAWQH TTL
B*07:02	SPQTLAATL

Tetrameros	
HLA clase II	PÉPTIDO
DRB1*01:01	LLEDKFLQNKAF LTGP
DRB1*07:01	AVGEDLFQEAHEVILK
DRB1*07:01	GDFTLTESVAILLYL
DRB1*15:01	ESVAILLYLTRKYKV

De tal forma que, después de llevar a cabo la descongelación celular, sembramos la placa de cultivo formada por 12 pocillos estéril (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) con 1×10^6 células en cada uno de ellos. Tras la siembra dejamos un período de recuperación celular de 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se recogieron las células en tubos de poliestireno de citómetro (*BD Biosciences*, CA, EEUU) y se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g sin aceleración ni freno y a una temperatura de 4°C. Seguidamente, lavamos las células con 1 ml de DPBS frío (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) e incubamos usando el tetramero conjugado con PE o el pentámero sin conjugar durante 10 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, volvemos a lavar las con 2 ml de DPBS frío y realizamos el marcaje con los anticuerpos monoclonales CD3-APC-Cy7, CD4-PE-Cy7, CD8-BV711, CD56-BV605, CD45RO-BV421 (*BD Biosciences*, CA, EEUU). Además, añadimos una etiqueta fluorescente conjugada con PE (*Proimmune*, Oxford, Reino Unido) en el caso de haber hecho un marcaje previo con el pentámero. Incubamos las células durante 20 minutos, a 4°C y en oscuridad. Finalmente, se hacen dos lavados con 2 ml de DPBS frío y resuspendemos el pellet celular en un volumen final de 500 μ l de DPBS. La adquisición se llevó a cabo en un citómetro BD LSRIIFortessa (*BD Biosciences*, CA, EEUU) y para el análisis de datos se utilizó el software FACSDiva 8.0 (*BD Biosciences*, CA, EEUU). Se adquirieron 20.000 eventos individuales (excluyendo dobletes) por cada muestra.

14. Cultivos para la activación de linfocitos T usando péptidos de GSTT1

Encargamos a la empresa *Innovative Peptide Solutions* (JPT, Berlín, Alemania) la síntesis de péptidos de 15 aminoácidos, con un solapamiento de 9, de la proteína GSTT1. Exigimos a la casa comercial que la pureza de cada péptido fuera, como mínimo, del 70% y libre de proteínas bacterianas al 100%. De esta forma obtuvimos 3 péptidos de dicha proteína. La distribución de pocillos en la placa de cultivo será la siguiente:

- Un pocillo estará en contacto con cada uno de los péptidos que vamos a ensayar a una concentración final de 10 µg/ml.
- Otro pocillo estará destinado a servir como control negativo de la reacción.
- El último pocillo hará las funciones de control positivo de reacción y se le adicionarán dos mitógenos, Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (PMA) a una concentración de 50 ng/ml, e Ionomicina a 1 µg/ml (ambos reactivos de *Sigma Aldrich*, MI, EEUU).

Todo ello por duplicado ya que vamos a utilizar dos paneles distintos de citometría de flujo para analizar la activación de las poblaciones celulares CD4 (Panel CD4) y CD8 (Panel CD8) por separado.

De este modo, inmediatamente después de llevar a cabo la descongelación celular, sembramos la placa de cultivo formada por 96 pocillos con fondo en U estéril (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) con 1×10^6 células en cada uno de ellos. Tras la siembra dejamos un período de recuperación celular de 24 horas. Transcurrido ese tiempo, añadimos las moléculas coestimuladoras CD28/CD49d (*BD Biosciences*, CA, EEUU) para una concentración final de 1 µg/ml. Los péptidos se añadirán en este momento para dejar una concentración final de 10 µg/ml. En este momento comenzarán las 24 horas de incubación necesarias para completar el protocolo.

A las 18 horas del inicio de la incubación, le añadimos a todos los pocillos Brefeldina A (BFA) (*Sigma Aldrich*, MI, EEUU) a una concentración final de 10 µg/ml, la cual actúa bloqueando la secreción de vesículas liberadas por el aparato de Golgi; y Monensina (GolgiStop, 0,7 µl/ml; *BD Biosciences*, CA, EEUU) para evitar la acidificación de vesículas tras su reinternalización. En el caso del control positivo, añadiremos en este momento además los dos mitógenos, PMA e Ionomicina, que llevarán a cabo una activación celular inespecífica que nos indicará la correcta actividad celular. No añadimos los mitógenos en el mismo momento que los péptidos porque las células pierden la expresión de los marcadores de membrana CD4 y CD8 si excedemos las 6 horas de incubación.

15. Detección intracelular de citoquinas en linfocitos activados mediante péptidos de GSTT1

Transcurridas las 24 horas de incubación, procedemos a recoger el sobrenadante de cada pocillo y lo conservamos a -20°C. Seguidamente, lavamos las células con DPBS e incubamos con LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) según las instrucciones del fabricante. A continuación, lavamos las células con 1 ml de DPBS (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EEUU) y realizamos el marcaje extracelular con los anticuerpos monoclonales CD3-APC-Cy7, CD4-PE-Cy7, CD8-BV711, CD56-BV605, CD45RO-

PerCP-Cy 5.5 y CD107a-BV786 (*BD Biosciences*, CA, EEUU) durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad.

Transcurrido el tiempo, lavamos las células con 1 ml de DPBS frío y realizamos la fijación y permeabilización de las mismas usando Cytofix/Cytoperm™ (*BD Biosciences*, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez fijadas y permeabilizadas las células, realizamos el marcaje intracelular con los anticuerpos monoclonales IFN- γ -FITC, IL-4-PE e IL-10-BV421 (*BD Biosciences*, CA, EEUU). Las células se incubaron durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad.

Finalmente, se hace un lavado con 1 ml de DPBS frío y resuspendemos el pellet celular en un volumen final de 500 μ l de DPBS. La adquisición se llevó a cabo en un citómetro BD LSRIIFortessa (*BD Biosciences*, CA, EEUU) y para el análisis de datos se utilizó el software FACSDiva 8.0 (*BD Biosciences*, CA, EEUU). Se adquirieron 100.000 eventos individuales (excluyendo dobletes) por cada muestra.

16. Paneles citometría de flujo multicolor

Para la determinación de linfocitos T alo-específicos frente a GSTT1 se usaron los siguientes paneles de citometría:

Pentámeros	
Molécula	Fluorocromo
CD3	APC-Cy7
CD56	BV605
CD45RO	BV421
CD4	PE-Cy7
CD8	BV711
Pentámero	PE

Tetrámeros	
Molécula	Fluorocromo
CD3	APC-Cy7
CD56	BV605
CD45RO	BV421
CD4	PE-Cy7
CD8	BV711
Tetrámero	PE

Para la detección intracelular de citoquinas en linfocitos activados mediante péptidos de GSTT1 se usó el siguiente panel de citometría:

Molécula	Fluorocromo
CD3	APC-Cy7
CD56	BV605
CD45RO	PerCP-Cy 5.5
CD4	PE-Cy7
CD8	BV711
CD107a	BV786
IFN- γ	FITC
IL-4	PE
IL-10	BV421
Viabilidad	BV510

17. Predicción de moléculas HLA presentadoras de los péptidos de la GSTT1

Para determinar qué péptidos son los mejor presentados por las moléculas HLA de nuestros pacientes, llevamos a cabo una estimulación virtual haciendo uso de los datos recogidos en el programa *Immune Epitope Database Analysis Resource (IEDB ANALYSIS RESOURCE)* (Kim Y y col., 2012; Nielsen M y col., 2003; Lundegaard C y col., 2008; Peters B y Sette A, 2005; Sidney J y col., 2008). Este instrumento nos permite predecir el valor IC50 de unión de los péptidos de interés a las moléculas HLA específicas, ya sean de clase I o II.

Tanto para los HLA de clase I como de clase II consideramos, tal y como indica el programa, que los percentiles inferiores a 1 corresponden con los HLA candidatos a ser los mejores presentadores para un determinado péptido.

RESULTADOS

Resultados

En este apartado vamos a detallar los diferentes resultados obtenidos para responder a las cuestiones planteadas en los objetivos.

OBJETIVO 1. Explorar la distribución celular de la proteína GSTT1 y estudiar la implicación de los anticuerpos GSTT1 específicos en el fracaso del órgano trasplantado.

A continuación, se muestran los resultados conseguidos en el estudio de la distribución celular de la proteína GSTT1 mediante los dos abordajes experimentales llevados a cabo, inmunocitoquímica y citometría de flujo.

1.1. Inmunocitoquímica

Teniendo en cuenta que la proteína GSTT1 se localiza a nivel citoplasmático, para llevar a cabo sus funciones como enzima detoxificadora, tal y como se observa en las imágenes A y B (Figura 2), donde las células HepaRG diferenciadas se permeabilizaron. Tras los experimentos realizados, podemos determinar que un bajo número de células presentan dicha proteína a nivel de la superficie celular. Esto aparece evidenciado en las imágenes C y D (Figura 2), donde el patrón de inmunofluorescencia en células que no han sido permeabilizadas es claramente distinto al que encontramos en las imágenes A y B cuyas células fueron permeabilizadas. Además, las imágenes E y F (Figura 2) apoyan lo explicado anteriormente, ya que en este caso al usar los marcadores CD81 (verde) y GSTT1 (rojo) en células no permeabilizadas, se aprecia un refuerzo de color anaranjado correspondiente al comarcaje CD81/GSTT1 en algunas zonas de la membrana celular. Estos resultados serán posteriormente corroborados, gracias a los experimentos realizados mediante citometría de flujo.

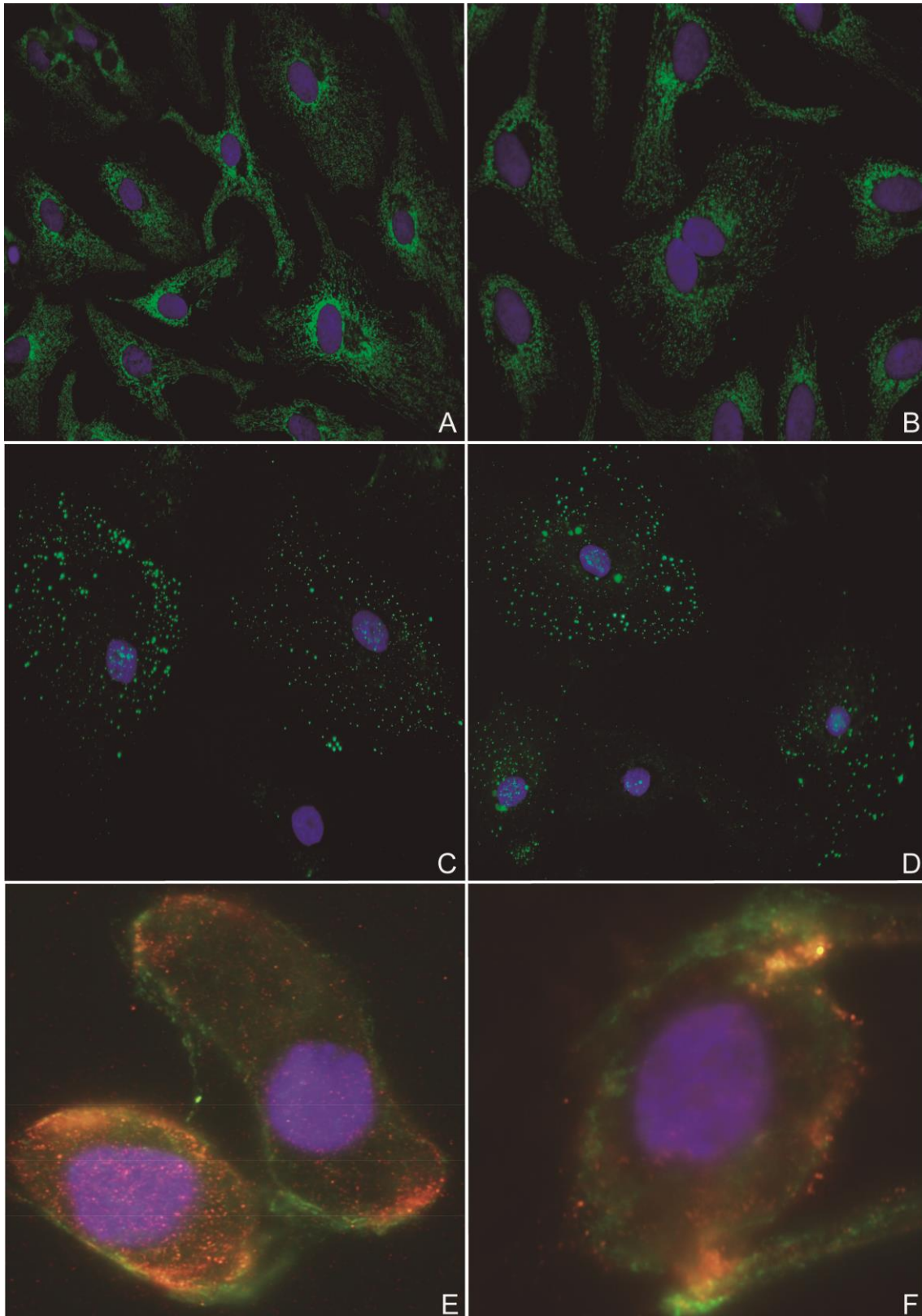


Figura 2. En esta figura observamos los resultados obtenidos atendiendo a las diferentes condiciones experimentales que hemos realizado. En las imágenes A y B, observamos la localización citoplasmática de la proteína GSTT1 en células HepaRG diferenciadas (hepatocitos y colangiocitos) que fueron fijadas y permeabilizadas. En las imágenes C y D, podemos apreciar un patrón totalmente distinto al anterior. En este caso, la proteína GSTT1 se sitúa a nivel de la membrana celular ya que las células no fueron permeabilizadas. Por último, las imágenes E y F, muestran el comarcaje de los marcadores CD81 y GSTT1 en células no permeabilizadas.

1.2. Estudio de la expresión de GSTT1 mediante citometría de flujo

Para este estudio se utilizaron HepaRG diferenciadas (hepatocitos y colangiocitos) que fueron marcadas con GSTT1 y el marcador de membrana CD81. Respecto a la jerarquía utilizada en el análisis de los datos, inicialmente hemos tomado una población total de células, a continuación se seleccionan los singletes (descartando de esta forma los dobletes celulares), seguidamente acotamos la población de células vivas gracias al marcador de viabilidad y finalmente registramos la población doble positiva para los marcadores de estudio CD81 y GSTT1. Los resultados muestran que de la población total de estudio, el 0,2% es doble positiva para ambos marcadores CD81/GSTT1 (Figura 3). Por tanto, a pesar de que la proteína GSTT1 tiene expresión citoplasmática, gracias a estos resultados podemos concluir que dicha proteína también se puede localizar en la superficie celular de forma débil. Esto reafirma los resultados obtenidos anteriormente mediante inmunocitoquímica.

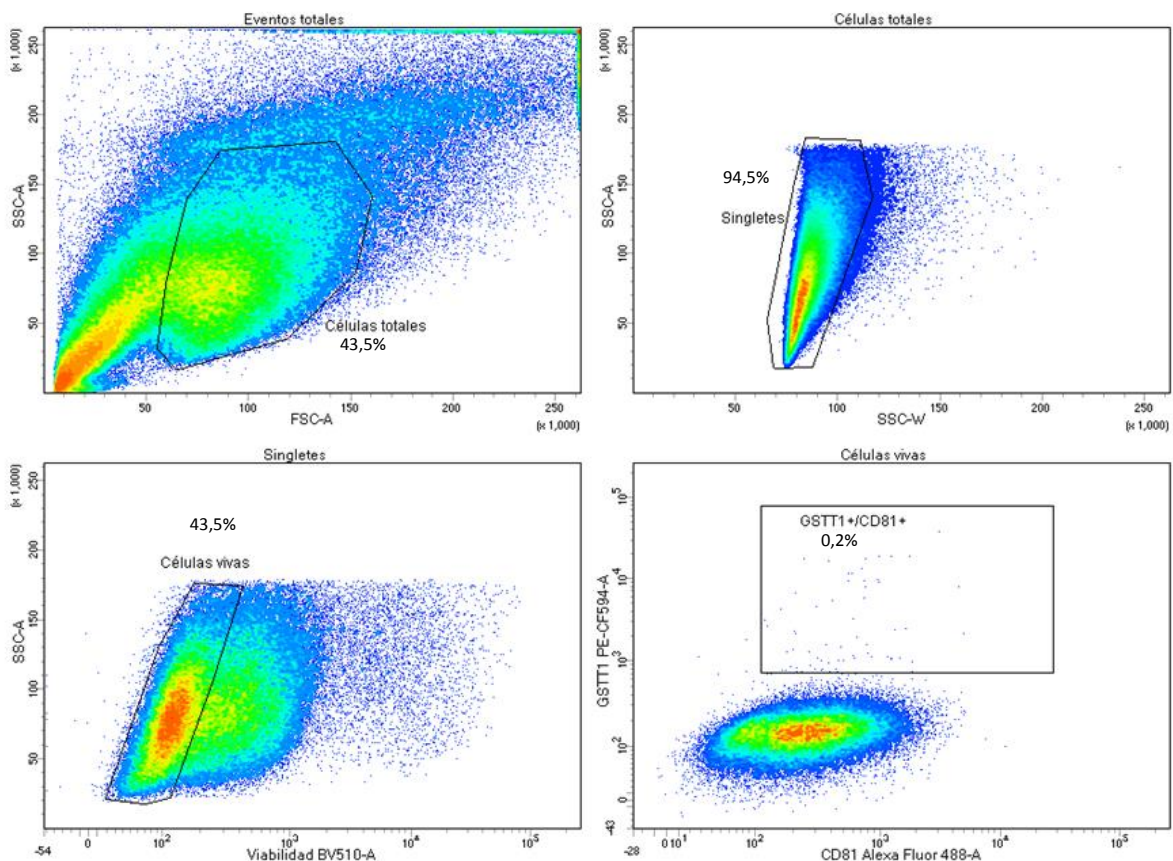


Figura 3. Jerarquía de marcadores utilizada y resultados del estudio de expresión de la proteína GSTT1 en la membrana celular mediante citometría de flujo.

Con objeto de comprobar si los anticuerpos anti-GSTT1 son activadores de complemento y por tanto pueden tener un papel patogénico, se determinaron las subclases de IgG de estos anticuerpos.

1.3. Determinación de las distintas subclases de anticuerpos anti-GSTT1

En la siguiente tabla observamos la distribución de las distintas subclases IgG de los anticuerpos anti-GSTT1 en los sueros de pacientes ensayados por ELISA. Se estudiaron retrospectivamente 57 muestras de suero de 18 pacientes:

- 12 de ellos presentaban anticuerpos anti-GSTT1 y desarrollaron la enfermedad (en rojo)
- 6 de ellos presentaban anticuerpos anti-GSTT1, pero no desarrollaron la enfermedad (en negro).

Lo más destacable de los resultados es la presencia mayoritaria de las subclases IgG1_{-GSTT1} e IgG4_{-GSTT1}, aunque también se encontraron trazas de otras subclases (IgG2_{-GSTT1} e IgG3_{-GSTT1}). Los pacientes experimentaron cambios en las subclases de anticuerpos IgG_{-GSTT1} y algunas de ellas llegaron a ser indetectables como ocurrió con IgG1_{-GSTT1} en los pacientes 3 y 6, o IgG4_{-GSTT1} en el paciente 2. La mayoría de los pacientes presentan las dos subclases mayoritarias de inmunoglobulinas (IgG1_{-GSTT1} e IgG4_{-GSTT1}), aunque también se ha observado una situación en la cual sólo se detecta una subclase de inmunoglobulina en todas las muestras analizadas durante la evolución del mismo paciente, por ejemplo IgG1_{-GSTT1} en los pacientes 5 y 8, o IgG4_{-GSTT1} en los pacientes 7, 14 y 15.

En principio no se observa un patrón diferenciable entre el grupo de pacientes diagnosticados de HI *de novo* (pacientes de 1 a 12) respecto al grupo de pacientes que no llegan a desarrollar la enfermedad (pacientes de 13 a 18).

Paciente	Fecha de la muestra (Años post-Tx)	Subclases de IgG en los anticuerpos anti-GSTT1				Ratio	Biopsia hepática en el diagnóstico
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG1/IgG4	
1	5 meses	0,361	0	0	0,36	1	
	7 meses	0,324	0	0	0,273	1.19	IgG4+/CD138+
	12 meses	0,237	0	0	0	-	
2	1,5	2,369	0	0	0,978	2.42	No disponible
	7,5	0,649	0	0	0,154	4.21	
	10	0,556	0	0	0	-	
3	7	0,133	*	*	0,252	0.53	
	10	0	*	*	0,249	-	
4	2	0,5	0	0	0,257	1.94	No disponible
	6,5	1,31	0	0	1,506	0.87	
	8,5	0,072	0	0	0,222	0.32	
	9	0,456	0	0	0,643	0.71	
5	1	0,112	*	*	0	> 1	IgG4-/CD138 débil
	5,5	0,116	0	0	0	-	
	6,5	0,168	0	0	0	-	
6	4,5	0,236	*	*	0,593	0.40	
	6,5	0,163	0	0	0,551	0.30	
	8	0,333	*	*	0,713	0.47	
	10	0	0	0	0,924	-	
	12	0	0	0	0,875	-	
7	1,5	0,163	0	0	1,526	0,107	IgG4+/CD138+
	4	0	0	0	1,204	-	
	5,5	0,254	*	*	1,235	0,206	
	8	0	0	0	1,118	-	
8	2,5	2,521	0	0	0	>1	IgG4-/CD138-
	4	0,385	0	0	0	-	
	10	0,891	0	0	0	-	
	10,5	0,853	0	0	0	-	
9	1	2,387	0	0	0,605	3.95	
	2	0,575	0	0	0,28	2.05	IgG4+/CD138+
	2,5	0,904	*	0	0,203	4.45	
10	4,5	0,111	0	0	0,136	0.82	
	5	0,117	0	0	0,209	0.56	
11	2,5	0,178	0	0	0,076	2.34	IgG4-/CD138+
	4	0,208	0	0	0,083	2.50	
	5	0,223	0	0	0,171	1.30	
12	Pre-Tx	2,017	*	*	1,754	1.15	
	1	0,493	*	*	2,47	0.20	IgG4+/CD138+
	2	0,263	0	0	1,309	0.20	
	3	1,935	0	0	3,095	0.62	
13	2	0,235	0	0	0,567	0.59	
	3	0,183	*	0	0,524	0.35	
	4	1,522	0	0	1,813	0.84	
	6	0	0	0	0,564	-	
	11	0,243	0	0	0,972	0.25	
14	Pre-Tx	0	0	*	1,068	-	
	1,5	0	0	0	0,897	-	
	2,5	0	*	0	0,316	-	
	5,5	0	0	*	0,553	-	
15	2	0	0	0	0,168	-	
	2,5	0	0	0	0,203	-	
	4	0	*	0	1,308	-	IgG4-/CD138+
16	15	0,415	0	0	0,229	1.81	
17	3	0,124	0	0	0,28	0.44	
	4	0,067	0	0	0,447	0.15	IgG4-/CD138+
18	16	0,711	0	0	0,625	1,14	

Tabla 3. En la siguiente tabla aparecen los distintos pacientes de trasplante hepático ensayados con incompatibilidad GSTT1 (donante positivo/receptor nulo) que contienen anticuerpos anti-GSTT1 en suero. Pacientes numerados en rojo: pacientes diagnosticados con hepatitis inmune *de novo*; pacientes numerados en negro: pacientes sin Hepatitis Inmune *de novo*. Los pacientes 12 y 15 tenían anticuerpos anti-GSTT1 antes del trasplante hepático, debido a embarazo o transfusión. * Indica pequeñas cantidades de la subclase marcada. El ratio IgG1-GSTT1/IgG4-GSTT1 se ha calculado cuando ha sido posible ya que hay muchas muestras con una sola subclase.

En esta figura observamos los niveles de las distintas subclases de IgG encontrados para cada muestra de suero en todos los pacientes diagnosticados con hepatitis inmune *de novo*. Se puede apreciar como fluctúan dichos niveles conforme evoluciona la enfermedad.

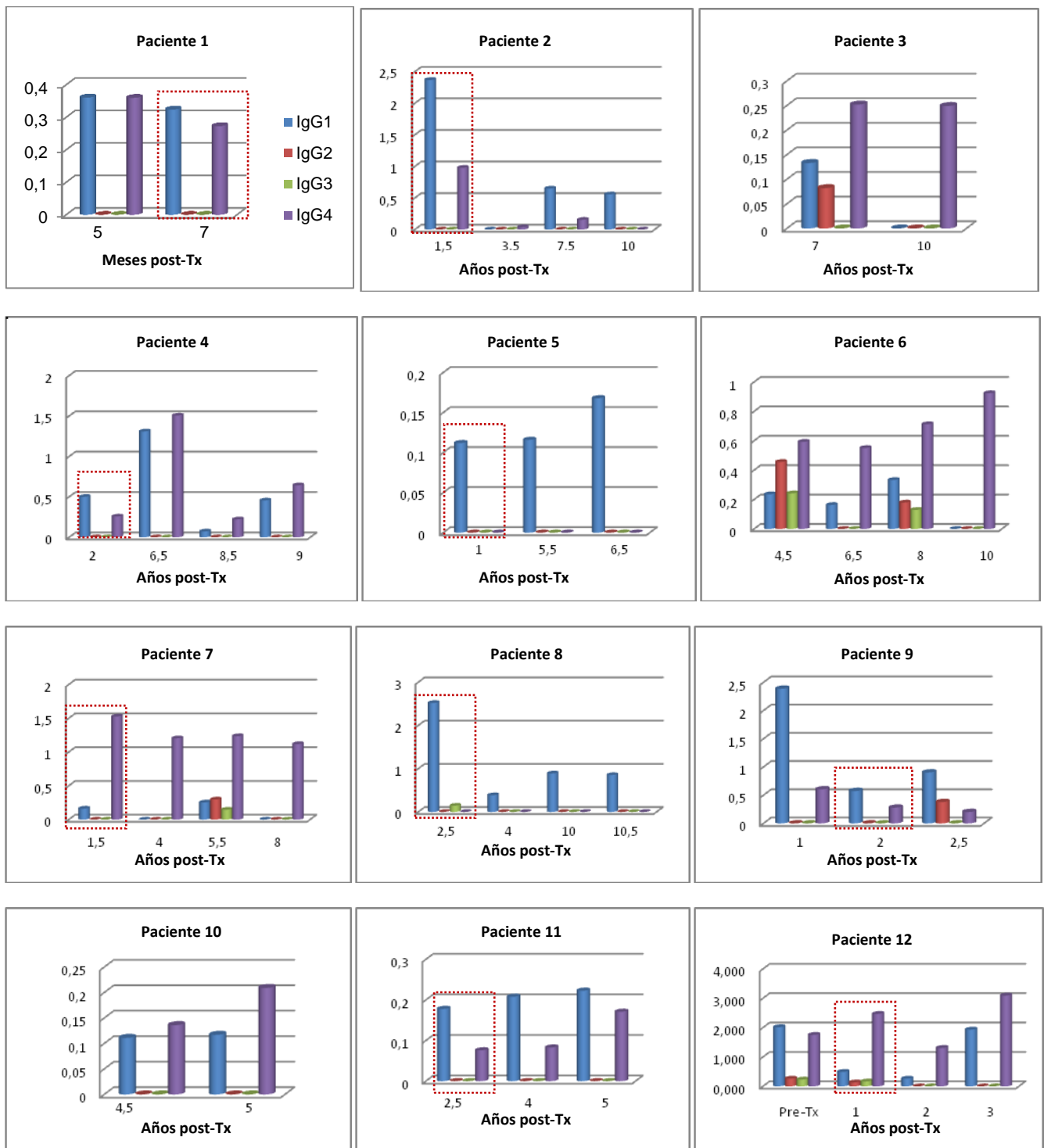


Figura 4. En la siguiente figura aparecen las subclases IgG-GSTT1 encontradas en muestras de suero de todos los pacientes con hepatitis inmune *de novo*. Las muestras más cercanas a la fecha de diagnóstico se marcan en rojo. Las proporciones de las distintas subclases así como la titulación de los anticuerpos fluctúan durante el seguimiento. IgG4 es la más abundante en la mayoría de los casos junto con la IgG1. Las otras dos subclases apenas son representativas y desaparecen con el tiempo.

En la siguiente figura observamos los niveles de las distintas subclases de IgG encontrados para cada muestra de suero en todos los pacientes que no han desarrollado hepatitis inmune *de novo*. Se puede apreciar como fluctúan dichos niveles durante el seguimiento.

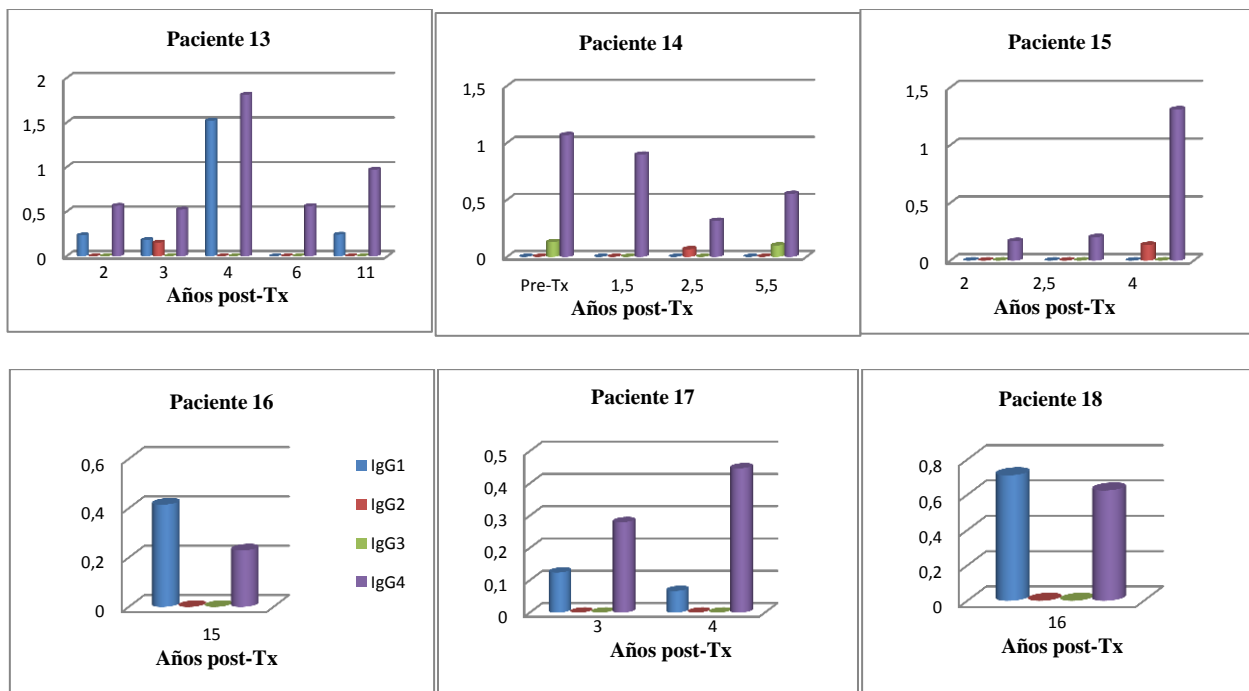


Figura 5. En la siguiente figura aparecen las subclases IgG-GSTT1 encontradas en muestras de suero de todos los pacientes que no han desarrollado hepatitis inmune *de novo*. Las proporciones de las distintas subclases así como la titulación de los anticuerpos fluctúan durante el seguimiento. IgG4 es la más abundante en las muestras cercanas al post-Tx a veces acompañada de IgG1. IgG1 predomina en dos muestras (pacientes 16 y 18) después de un largo seguimiento. IgG2 e IgG3 son prácticamente ausentes.

En esta figura se representan las subclases mayoritarias de IgG en el grupo de pacientes que han desarrollado la enfermedad y en el grupo de pacientes que no han desarrollado la enfermedad.

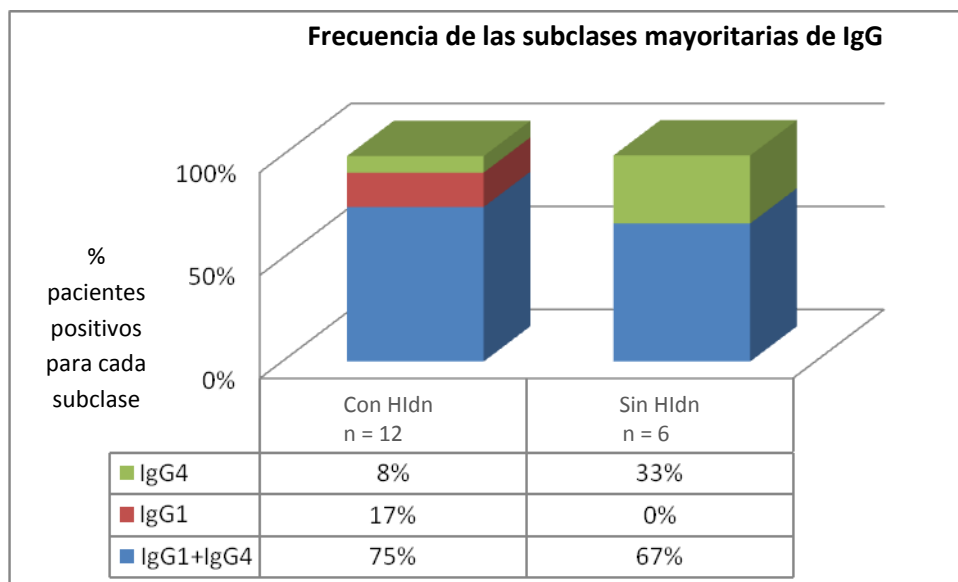


Figura 6. En la siguiente figura comparamos la presencia de las subclases mayoritarias de IgG detectadas en el suero de pacientes con enfermedad y de pacientes que no han desarrollado la enfermedad. Cabe destacar que la combinación IgG1+IgG4 es la característica mayoritaria en ambos grupos de pacientes. Podemos reseñar que pacientes que no han desarrollado la enfermedad no presentan IgG1 como única inmunoglobulina en suero, mientras que el 17% de los pacientes con la enfermedad presentan únicamente IgG1 en suero.

1.4. Ratio $IgG1_{-G_{STT1}}/IgG4_{-G_{STT1}}$ en el momento diagnóstico de hepatitis inmune *de novo*

Teniendo en cuenta que, los primeros síntomas de HI *de novo* suelen aparecer en los dos primeros años después del trasplante y muy rara vez en el tercer año, nuestro objetivo fue analizar la relación $IgG1_{-G_{STT1}}/IgG4_{-G_{STT1}}$ en la muestra de suero más cercana al diagnóstico o a tiempos comparables en los pacientes sin la enfermedad. Se excluyeron del análisis aquellos pacientes cuyas muestras de suero de una fase temprana post-trasplante no estaban disponibles (3, 6 y 10). La subclase $IgG1_{-G_{STT1}}$ era mayor que la subclase $IgG4_{-G_{STT1}}$ en el momento del diagnóstico en 7 de 9 pacientes diagnosticados de HI *de novo*. Sin embargo, cuando nos fijamos en la relación en el grupo de pacientes no diagnosticados, se observó que la subclase $IgG1_{-G_{STT1}}$ nunca era superior a la subclase $IgG4_{-G_{STT1}}$ en fases tempranas post-trasplante.

En esta figura se aprecia la variación en el ratio $\text{IgG1-GSTT1}/\text{IgG4-GSTT1}$ para los dos grupos de pacientes ensayados (con y sin diagnóstico de HI *de novo*).

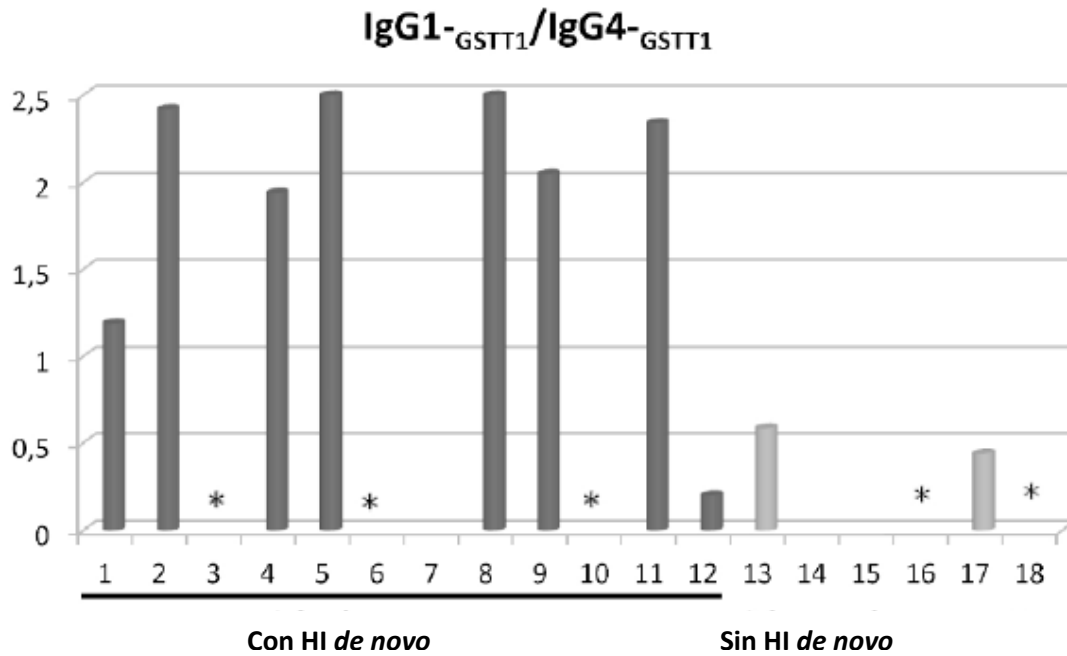


Figura 7. Ratio $\text{IgG1-GSTT1}/\text{IgG4-GSTT1}$ en muestras de suero cercanas al momento diagnóstico en pacientes con HI *de novo* (1-12). * Indica que sólo estaban disponibles muestras muy alejadas en el tiempo del momento diagnóstico y por tanto no se han considerado para el análisis. En el grupo con anticuerpos, pero sin la enfermedad (13-18), se han incluido sólo muestras a corto plazo obtenidas en puntos de tiempo equivalentes. Los pacientes 5 y 8 sólo tenían la subclase IgG1-GSTT1 , mientras que los pacientes 7, 14 y 15 sólo tenían anticuerpos IgG4-GSTT1 en las muestras analizadas.

OBJETIVO 2. Determinar la presencia de linfocitos T alo-específicos frente a la proteína GSTT1

2.1. Determinación de linfocitos T alo-específicos frente a GSTT1

2.1.1. Estudio pentámeros

2.1.2. Pacientes

En la siguiente tabla se destacan en color verde los pacientes incluidos en este apartado del estudio y sus características.

Paciente	Edad al Tx	Tx	Enfermedad primaria	Terapia inducción	Diagnóstico HIdn	TTO	Fecha extracción células
GRUPO 1							
1	46	6-5-99	C Alcohólica	CYA, MMF, EST	6 AÑOS	PRED	13/04/15
2	67	10-4-12	CVHC	CYA, MMF, EST	9M	PRED	16/03/15 08/06/15
3	46	7-5-07	Autoinmune-like	CYA, MMF, EST	32M	PRED	04/11/15
4	47	2-7-00	CVHC	CYA, EST, BAS	24M	PRED, AZA	04/03/15 03/11/15
5	49	18-9-03	Alcohólica	CYA, MMF, EST	21M	PRED	21/10/15 09/12/15
6	46	2-11-01	C Alcohólica+CVHC	CYA, EST, BAS	33M	PRED	11/01/16
GRUPO 2							
7	44	13-10-03	C Alcohólica	TAC, MMF, EST	No		
8	52	8-04-01	CVHB+HCC	CYA, MMF, EST	No		
9	39	23-11-96	C. Alcohólica+CVHB	CYA, AZA, EST	No		
GRUPO 3							
10	63	12-7-06	C Alcohólica+HCC	TAC, DAC	No		27/11/15
11	58	12-2-09	CVHB	TAC, MMF, EST	No		28/10/15
12	52	18-1-09	CVHC	TAC, MMF, EST	No		25/05/15
13	60	24-8-13	C Alcohólica	TAC, MMF, EST	No		03/06/15
14	61	17-07-13	CVHC+HCC	CYA, MMF, EST	No		
15	61	10-4-13	CVHB	TAC, BAS, EST	No		
16	50	19-4-11	CVHC+HCC	CYA, MMF, EST	No		
GRUPO 4 CONTROL							
17	63	16-02-11	C Alcohólica	MMF, EST	No		
18	53	2009	CVHC	CYA, MMF, EST	No		
19	45	10-10-01	CBP	TAC, MMF, EST	No		
20	54	21-01-05	CVHC	TAC, MMF, EST	No		

Tabla 4. En esta tabla se representan las características de los distintos pacientes incluidos en el estudio. El grupo 1 está formado por pacientes que presentan la incompatibilidad GSTT1 (donante positivo / receptor nulo), poseen anticuerpos frente a la proteína GSTT1 y además han desarrollado la enfermedad (Hepatitis inmune *de novo*). El grupo 2 está compuesto por pacientes con la incompatibilidad GSTT1, tienen anticuerpos frente a dicha proteína, pero no han desarrollado la enfermedad. Los pacientes del grupo 3 únicamente presentan la incompatibilidad GSTT1, carecen de anticuerpos y no tienen la enfermedad. El grupo 4 lo constituyen pacientes trasplantados de hígado con genotipo GSTT1+, utilizados como controles.

CYA: ciclosporina A; MMF: mofetil micofenolate; EST: esteroides; BAS: basilisimab; DAC: daclizumab; PRED: prednisona; AZA: azatioprina; HVC: hepatitis por virus C; HCC: hepatocarcinoma

2.1.3. Jerarquía

En esta figura podemos observar la jerarquía utilizada para el análisis de los datos. Inicialmente atendiendo a los parámetros de complejidad (SSC) y de tamaño (FSC) hemos tomado la población linfocitaria, a continuación se seleccionan los singletes (descartando de esta forma los dobletes celulares), seguidamente registramos la población doble positiva para los marcadores de estudio CD8 y pentámero. Finalmente, a partir de esta población doble positiva (Pentámero+CD8⁺) analizamos las distintas subpoblaciones atendiendo a los marcadores CD45RO Y CD56 (Figura 8). A modo de ejemplo en esta figura se representan los resultados obtenidos con células del paciente 3.

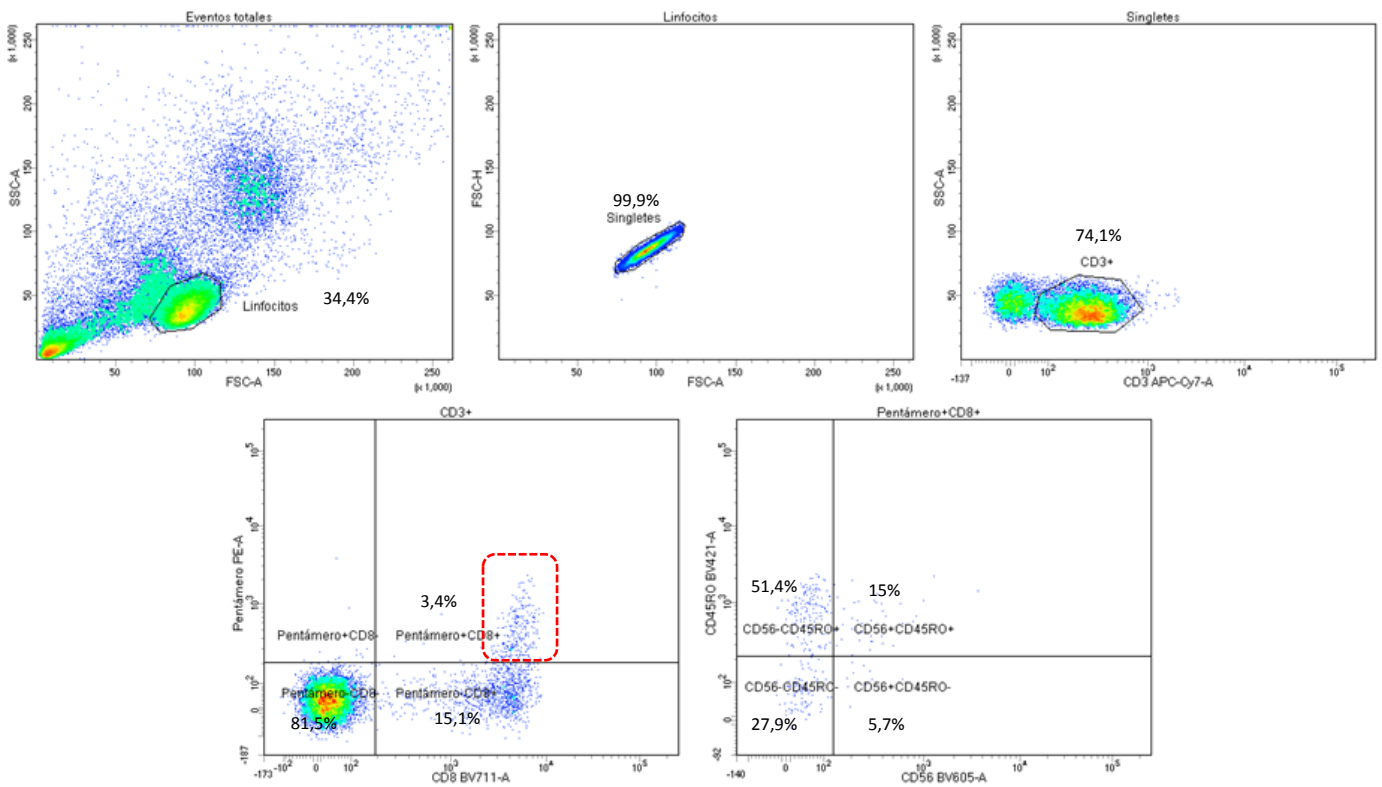


Figura 8. En esta figura se representa la jerarquía de marcadores utilizada en el estudio de pentámeros. Se observan los resultados obtenidos del paciente 3.

2.1.4. Resultados

Tras los experimentos realizados hemos podido demostrar la presencia de linfocitos T CD8⁺ alo-específicos frente a la proteína GSTT1, mayoritariamente dirigidos contra la combinación HLA/péptido A*01. Los porcentajes de células que reconocen el pentámero A*01 van desde el 1,1% al 5,4% del total de linfocitos CD3⁺. Con objeto de caracterizar mejor esta población pentámero+CD8⁺ se analizaron también los marcadores CD56 y CD45RO. Los resultados se recogen en la Tabla 5. Hemos registrado reactividad con el pentámero A*01 en 3 de los 6 pacientes del grupo 1 (50%) y en 2 de los 4 pacientes que conforman el grupo 3 (50%). Estos

resultados son totalmente plausibles, ya que teniendo en cuenta nuestra hipótesis de partida, tanto los pacientes del grupo 1 como del grupo 3, pueden presentar linfocitos T alo-específicos frente a la proteína GSTT1.

Grupo Hldn	Paciente	Pentámero ensayado	% Población CD3 ⁺ Pentámero+ CD8 ⁺	Pentámero+CD8 ⁺			
				CD56 ⁻ (T convencionales)		CD56 ⁺	
				CD45RO ⁺	CD45RO ⁻	CD45RO ⁺	CD45RO ⁻
1	1	A*01	1,1	37,1	11,7	43,4	7,8
		A*02	0	-	-	-	-
		B*07	0	-	-	-	-
	2	A*02	0	-	-	-	-
	3	A*01	3,4	51,4	27,9	15	5,7
	4	A*02	0	-	-	-	-
		B*07	0	-	-	-	-
	5	A*01	5,4	51	10,6	34,2	4,2
		A*02	0	-	-	-	-
	6	A*02	0	-	-	-	-
B*07		0	-	-	-	--	
3	10	A*02	0	-	-	-	-
	11	A*01	1,3	52,4	25,3	17,1	5,2
	12	A*01	1,8	36,7	14,4	29,8	19,1
	13	A*02	0	-	-	-	-

Tabla 5. Resultados de los pentámeros donde hemos obtenido reactividad con el A*01. Se muestran también las subpoblaciones separándolas en las que presentan el marcador de NK, CD56, y dentro de estos grupos, el marcador de memoria CD45RO.

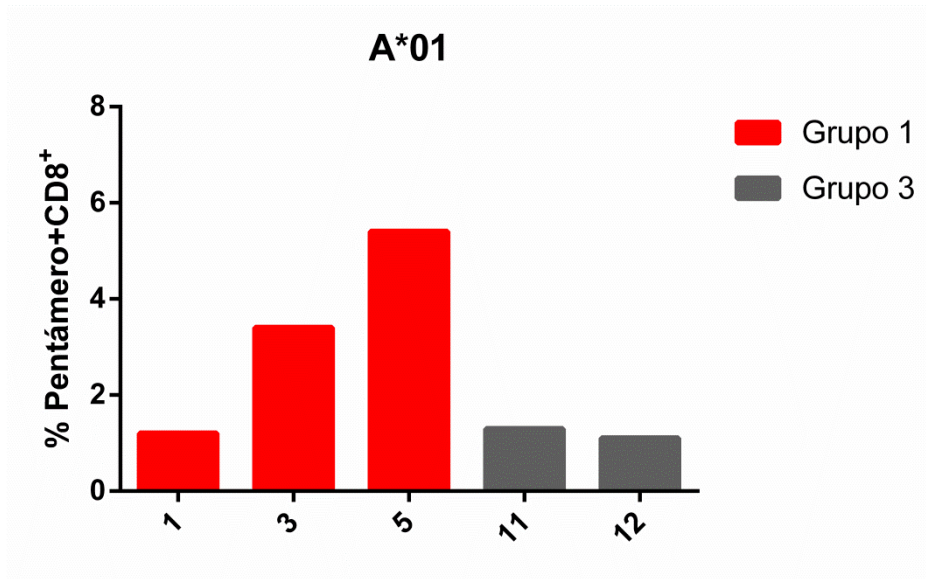


Figura 9. En esta figura se representan los valores recogidos en la tabla anterior del porcentaje de células pentámero+CD8⁺ respecto al total de linfocitos CD3⁺ con los pacientes que han dado positivo en la reacción con el pentámero A*01.

Además, se analizó la proporción de linfocitos pentámero+CD8⁺ respecto al total de células CD8⁺. En todos los casos, esta población representa una proporción importante de linfocitos específicos de antígeno, en torno al 4% en tres de los pacientes (P1, P11 y P12) y mucho más abundante en los pacientes P3 y P5 con un valor en torno al 20% (Figura 10).

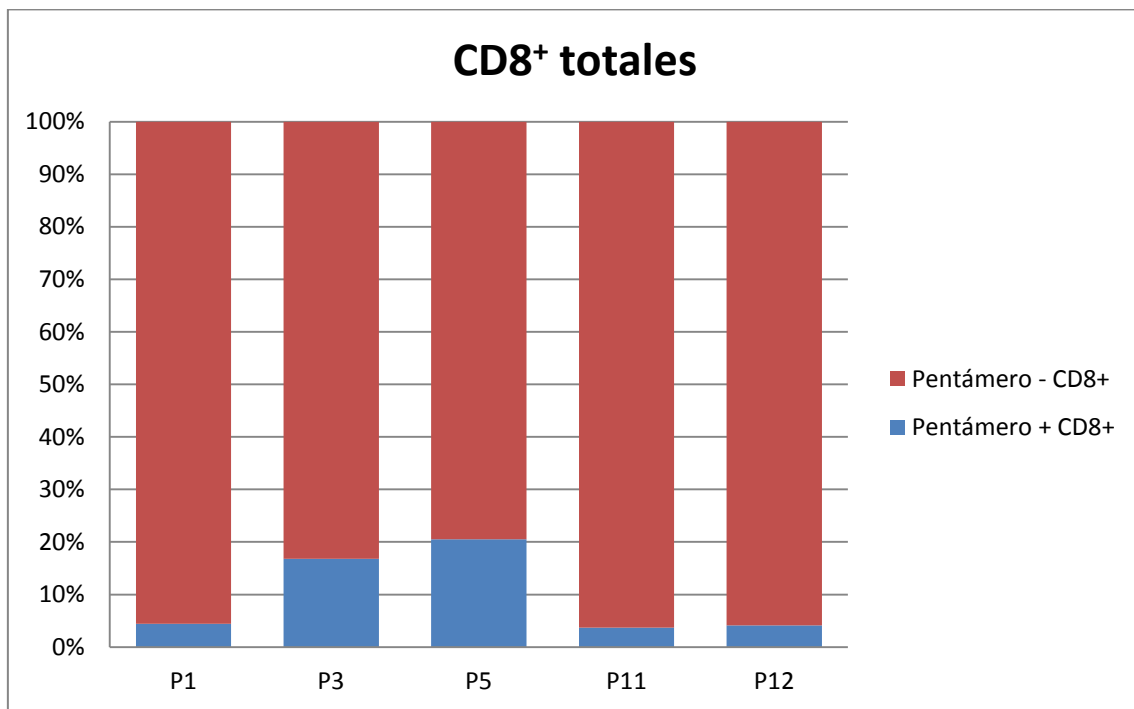


Figura 10. En esta figura se representa la proporción de linfocitos pentámero+CD8⁺ y pentámero-CD8⁺ respecto del total de células CD8⁺.

También, se analizaron las distintas subpoblaciones a partir de los resultados pentámero+CD8⁺ y pentámero-CD8⁺ obtenidos anteriormente respecto de la población CD3⁺.

A partir de los resultados pentámero+CD8⁺, se puede apreciar como en todos los casos la subpoblación CD56⁻ (T convencionales) es mayoritaria (representada en verde y azul) frente a la subpoblación CD56⁺, que incluye células T CD8⁺CD45RO⁺ y células T CD8⁺CD45RO⁻ (representadas en rojo y violeta respectivamente). Si se suman estas poblaciones no convencionales, los pacientes sin la enfermedad (P11 y 12) presentan valores superiores al 30% mientras que los pacientes con la enfermedad (P1, P3 y P5) presentan valores entre el 14,8% y el 20,7%. Por tanto, el porcentaje de linfocitos T convencionales es más alto en el grupo de pacientes con la enfermedad.

Los linfocitos T convencionales son mayoritariamente linfocitos de memoria en 4 de los pacientes, al igual que los linfocitos CD8⁺CD56⁺ que también son predominantemente linfocitos memoria (Figura 11).

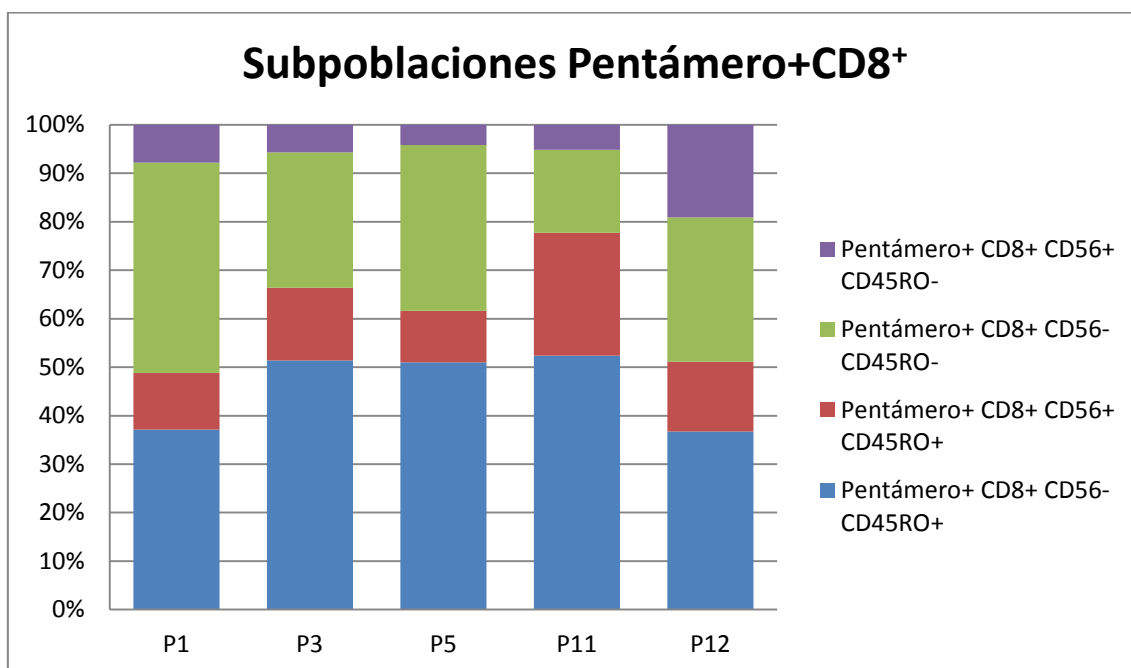


Figura 11. En esta figura se representan las distintas subpoblaciones pentámeros+CD8⁺ atendiendo a los marcadores CD56 y CD45RO.

Respecto a los resultados pentámero-CD8⁺, como en el caso anterior la subpoblación CD8⁺CD56⁻ predomina sobre la subpoblación CD8⁺CD56⁺. Por otro lado, a diferencia de los valores registrados en los resultados pentámero+CD8⁺, los linfocitos convencionales son mayoritariamente no memoria en 3 de los 5 pacientes, al igual que los linfocitos CD8⁺CD56⁺ en los que predomina la población no memoria en todos los pacientes.

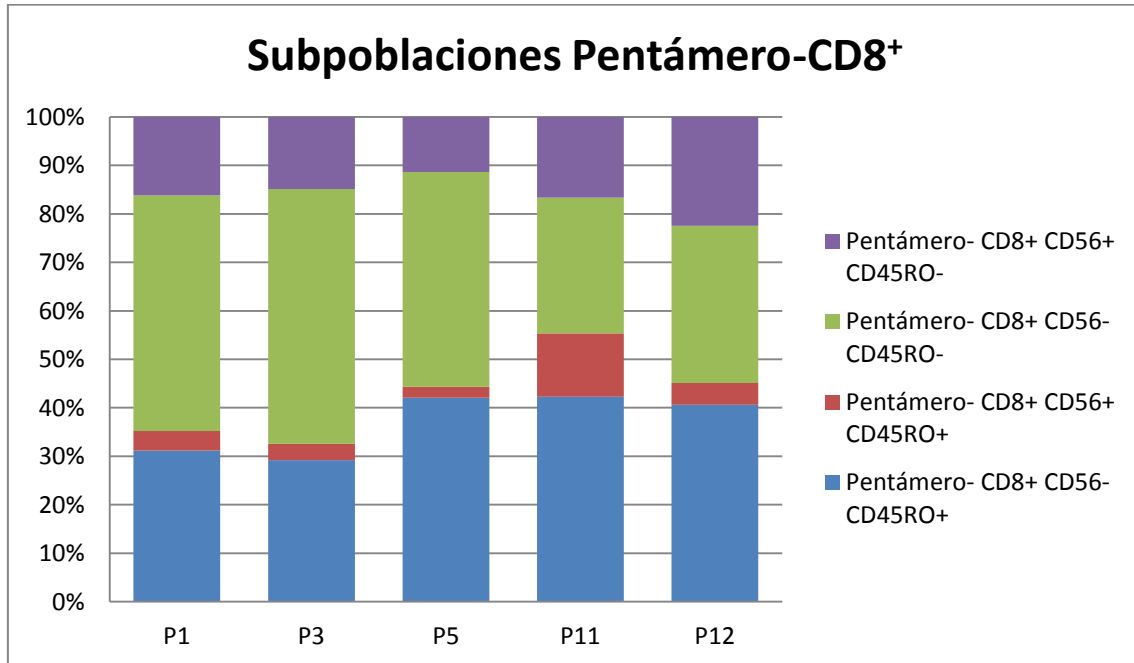


Figura 12. En esta figura se representan las distintas subpoblaciones pentámeros-CD8⁺ atendiendo a los marcadores CD56 y CD45RO.

2.1.5. Estudio tetrámeros

2.1.6. Pacientes

En la siguiente tabla se resaltan en azul los pacientes incluidos en este apartado del estudio y sus características.

Paciente	Edad al Tx	Tx	Enfermedad primaria	Terapia inducción	Diagnóstico Hdn	TTO	Fecha extracción células
GRUPO 1							
1	46	6-5-99	C Alcohólica	CYA, MMF, EST	6 AÑOS	PRED	
2	67	10-4-12	CVHC	CYA, MMF, EST	9M	PRED	08/06/15
3	46	7-5-07	Autoinmune-like	CYA, MMF, EST	32M	PRED	15/08/11 04/02/15
4	47	2-7-00	CVHC	CYA, EST, BAS	24M	PRED, AZA	13/02/17
5	49	18-9-03	Alcohólica	CYA, MMF, EST	21M	PRED	21/10/15
6	46	2-11-01	C Alcohólica+CVHC	CYA, EST, BAS	33M	PRED	11/01/16
GRUPO 2							
7	44	13-10-03	C Alcohólica	TAC, MMF, EST	No		
8	52	8-04-01	CVHB+HCC	CYA, MMF, EST	No		
9	39	23-11-96	C. Alcohólica+CVHB	CYA, AZA, EST	No		
GRUPO 3							
10	63	12-7-06	C Alcohólica+HCC	TAC, DAC	No		06/03/12
11	58	12-2-09	CVHB	TAC, MMF, EST	No		11/01/17
12	52	18-1-09	CVHC	TAC, MMF, EST	No		17/10/16
13	60	24-8-13	C Alcohólica	TAC, MMF, EST	No		03/06/15
14	61	17-07-13	CVHC+HCC	CYA, MMF, EST	No		09/12/15
15	61	10-4-13	CVHB	TAC, BAS, EST	No		30/10/15
16	50	19-4-11	CVHC+HCC	CYA, MMF, EST	No		
GRUPO 4 CONTROL							
17	63	16-02-11	C Alcohólica	MMF, EST	No		
18	53	2009	CVHC	CYA, MMF, EST	No		
19	45	10-10-01	CBP	TAC, MMF, EST	No		
20	54	21-01-05	CVHC	TAC, MMF, EST	No		

Tabla 6. En esta tabla se representan las características de los distintos pacientes incluidos en el estudio. El grupo 1 está formado por pacientes que presentan la incompatibilidad GSTT1 (donante positivo / receptor nulo), poseen anticuerpos frente a la proteína GSTT1 y además han desarrollado la enfermedad (Hepatitis inmune *de novo*). Los pacientes del grupo 3 únicamente presentan la incompatibilidad GSTT1, carecen de anticuerpos y no tienen la enfermedad. El grupo 4 lo constituyen pacientes trasplantados de hígado con genotipo GSTT1+, utilizados como controles.

CYA: ciclosporina A; MMF: mofetil micofenolate; EST: esteroides; BAS: basilisimab; DAC: daclizumab; PRED: prednisona; AZA: azatioprina; HVC: hepatitis por virus C; HCC: hepatocarcinoma.

2.1.7. Jerarquía

La jerarquía utilizada es similar a la empleada para el estudio de los pentámeros. Sin embargo, en lugar de analizar los marcadores pentámero y CD8, estudiamos los marcadores tetrámero y CD4.

2.1.8.Resultados

Sin embargo, en cuanto a los resultados obtenidos con los tetrámeros, no se ha encontrado ninguna población de linfocitos T CD4⁺ alo-específica frente a la proteína GSTT1 en ninguno de los pacientes ensayados.

Grupo HIdn	Paciente	Tetrámero ensayado	% Población CD3+ Tetrámero+ CD4+
1	2	DRB1*01(LLED)	0
		DRB1*07(AVGE)	
		DRB1*07(GDFT)	
	3	DRB1*01 (LLED)	
	4	DRB1*01 (LLED)	
		DRB1*07(AVGE)	
		DRB1*07(GDFT)	
	5	DRB1*07(AVGE)	
		DRB1*07(GDFT)	
	6	DRB1*07(AVGE)	
		DRB1*07(GDFT)	
	3	10	
DRB1*07(AVGE)			
DRB1*07(GDFT)			
11		DRB1*01 (LLED)	
12		DRB1*07(AVGE)	
		DRB1*07(GDFT)	
13		DRB1*07(AVGE)	
		DRB1*07(GDFT)	
14		DRB1*01 (LLED)	
		DRB1*15(ESVA)	
15		DRB1*07(AVGE)	
		DRB1*07(GDFT)	
	DRB1*15(ESVA)		

Tabla 7. Resultados del estudio de tetrámeros.

OBJETIVO 3. Dilucidar el papel que desempeñan los linfocitos T alo-específicos de GSTT1 en el rechazo del injerto

3.1. Resultados activación péptidos GSTT1

3.1.1. Pacientes

En la siguiente tabla se marcan en gris los pacientes incluidos en este apartado del estudio y sus características.

Paciente	Edad al Tx	Tx	Enfermedad primaria	Terapia inducción	Diagnóstico HIdn	TTO	Fecha extracción células
GRUPO 1							
1	46	6-5-99	C Alcohólica	CYA, MMF, EST	6 AÑOS	PRED	
2	67	10-4-12	CVHC	CYA, MMF, EST	9M	PRED	08/06/15
3	46	7-5-07	Autoinmune-like	CYA, MMF, EST	32M	PRED	18/05/16
4	47	2-7-00	CVHC	CYA, EST, BAS	24M	PRED, AZA	
5	49	18-9-03	Alcohólica	CYA, MMF, EST	21M	PRED	17/02/16
6	46	2-11-01	C Alcohólica+CVHC	CYA, EST, BAS	33M	PRED	03/11/15
GRUPO 2							
7	44	13-10-03	C Alcohólica	TAC, MMF, EST	No		20/06/18
8	52	8-04-01	CVHB+HCC	CYA, MMF, EST	No		15/01/18
9	39	23-11-96	C. Alcohólica+CVHB	CYA, AZA, EST	No		03/10/17
GRUPO 3							
10	63	12-7-06	C Alcohólica+HCC	TAC, DAC	No		06/10/17
11	58	12-2-09	CVHB	TAC, MMF, EST	No		17/09/17
12	52	18-1-09	CVHC	TAC, MMF, EST	No		
13	60	24-8-13	C Alcohólica	TAC, MMF, EST	No		
14	61	17-07-13	CVHC+HCC	CYA, MMF, EST	No		
15	61	10-4-13	CVHB	TAC, BAS, EST	No		
16	50	19-4-11	CVHC+HCC	CYA, MMF, EST	No		18/05/18
GRUPO 4 CONTROL							
17	63	16-02-11	C Alcohólica	MMF, EST	No		28/10/16
18	53	2009	CVHC	CYA, MMF, EST	No		23/11/15
19	45	10-10-01	CBP	TAC, MMF, EST	No		08/05/15
20	54	21-01-05	CVHC	TAC, MMF, EST	No		11/12/15

Tabla 8. En esta tabla se representan las características de los distintos pacientes incluidos en el estudio. El grupo 1 está formado por pacientes que presentan la incompatibilidad GSTT1 (donante positivo / receptor nulo), poseen anticuerpos frente a la proteína GSTT1 y además han desarrollado la enfermedad (Hepatitis inmune *de novo*). El grupo 2 está compuesto por pacientes con la incompatibilidad GSTT1, tienen anticuerpos frente a dicha proteína, pero no han desarrollado la enfermedad. Los pacientes del grupo 3 únicamente presentan la incompatibilidad GSTT1, carecen de anticuerpos y no tienen la enfermedad. El grupo 4 lo constituyen pacientes trasplantados de hígado con genotipo GSTT1+, utilizados como controles.

CYA: ciclosporina A; MMF: mofetil micofenolate; EST: esteroides; BAS: basilisimab; DAC: daclizumab; PRED: prednisona; AZA: azatioprina; HVC: hepatitis por virus C; HCC: hepatocarcinoma.

3.1.2. Jerarquía

A continuación, se presenta la jerarquía utilizada para el análisis de los resultados. En dicha jerarquía se observa cómo hemos seleccionado las distintas poblaciones de interés para posteriormente analizar su activación atendiendo a los marcadores de activación estudiados.

Inicialmente atendiendo a los parámetros de complejidad (SSC) y de tamaño (FSC) hemos tomado la población linfocitaria. Posteriormente, se seleccionan los singletes (descartando de esta forma los dobletes celulares). A continuación, designamos la población de células vivas y seguidamente acotamos la población $CD3^+CD56^-$. A partir de la población anterior, distinguimos las subpoblaciones $CD8^+$, $CD4^+$, $CD4^+CD8^+$ y $CD4^-CD8^-$ (Figura 13). Finalmente analizamos los marcadores de activación de las subpoblaciones citadas anteriormente. A modo de ejemplo en esta figura se representan los resultados obtenidos con células del paciente 3.

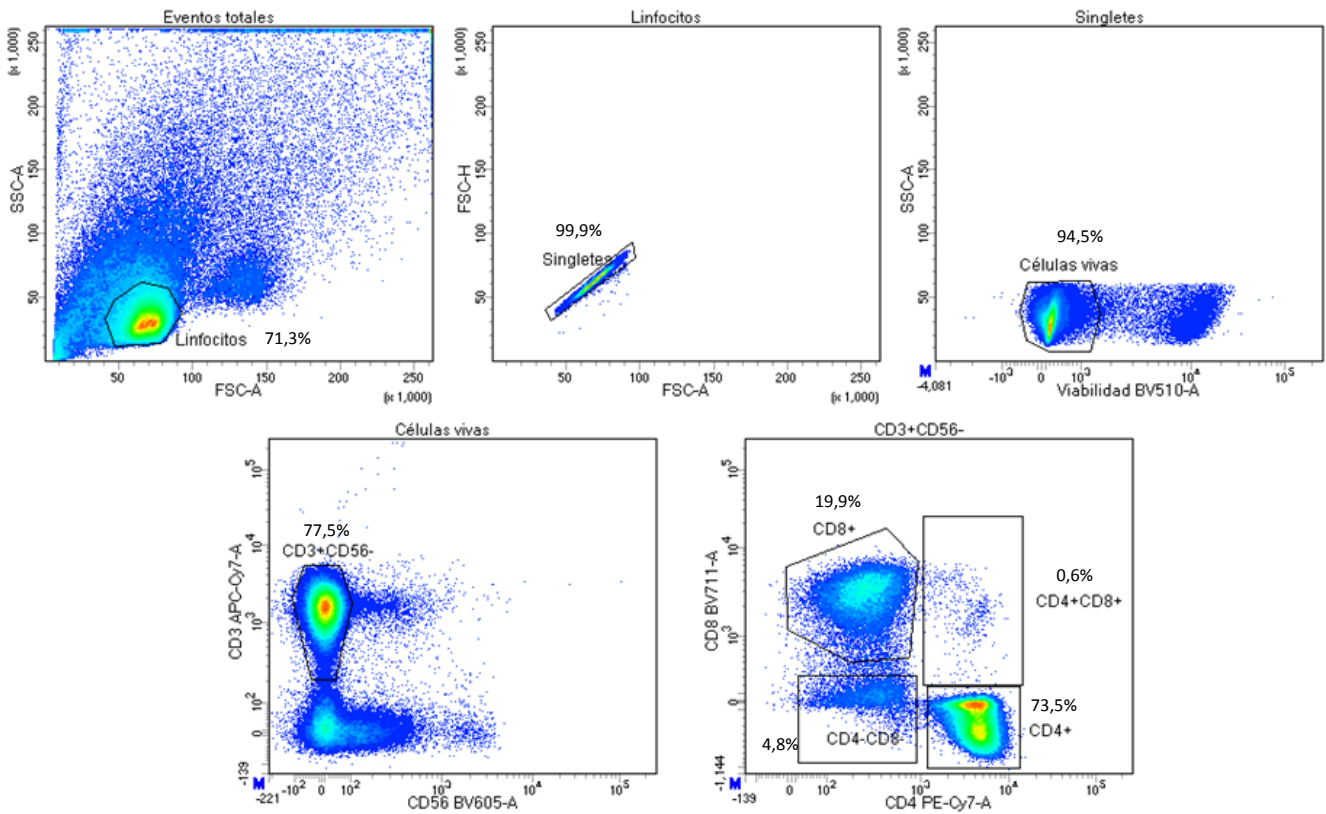


Figura 13. En esta figura se representa la jerarquía de marcadores utilizada en el estudio de estimulación con péptidos de GSTT1. Se observan los resultados obtenidos del paciente 3.

3.1.3. Resultados

En la siguiente tabla se muestran los resultados de activación obtenidos.

Grupo	Pacientes	Poblaciones	Activación			
			IFN- γ	IL-4	IL-10	CD107a
1	2	CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	*	*	*	*
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	0	0,3	0
	3	CD8 ⁺	0	0,5	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	0	0,8	0	0
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	3,5	0	0
	5	CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	*	*	*	*
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	2,2	0	0
	6	CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	5,9	0	0	1,9
2	7	CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	0	0	0
	8	CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	0	0,8	0
	9	CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	*	*	*	*
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	0	0	0
3	10	CD8 ⁺	0	0	0,3	0
		CD4 ⁺	0	0	0,4	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	0	0	0,5	0
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	0	0	0
	11	CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	*	*	*	*
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	0	0	0
	16	CD8 ⁺	0	0,4	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	1,2	0	0
4	17	CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	*	*	*	*
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	0	0	0
	18	CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	0	0	0
	19	CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	0	0	0
	20	CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	0	0	0	0
		CD4 ⁻ CD8 ⁻	0	0	0	0

Tabla 9. En la siguiente tabla se muestran los porcentajes de activación obtenidos para cada molécula de activación en las distintas poblaciones de los tres grupos de pacientes estudiados. Los valores (*) indican la escasez de eventos para poder analizar dicha población.

Todos los pacientes con HI *de novo* presentan activación en alguna población de linfocitos T, si bien llama la atención que no son las poblaciones convencionales CD4⁺ o CD8⁺ sino sobre todo, las DN CD4⁺CD8⁻. Todos ellos presentan activación de las células DN, bien vía IFN-γ (paciente 6), vía IL-4 (pacientes 3 y 5) o vía IL-10 (paciente 2), con valores altos, teniendo en cuenta las condiciones de inmunosupresión en las que se encuentran los pacientes y que repercuten en la baja reactividad de las células. También se observa activación de las células DN en el grupo 2 (paciente 8), vía IL-10 y en el grupo 3 (paciente 16) vía IL-4. En menor grado, también se observa activación de los linfocitos CD4⁺CD8⁺ dobles positivos, en paciente 3 vía IL-4 y en paciente 10 vía IL-10. Los valores registrados para el marcador CD107a (proteína de membrana asociada a lisosomas 1) nos indican que ha habido degranulación celular, lo cual coincide con la activación de otros marcadores estudiados (Figura 14). Sin embargo, el haber encontrado activación para el marcador CD107a en un único paciente se debe a que las condiciones de incubación utilizadas para ese marcador no fueron óptimas.

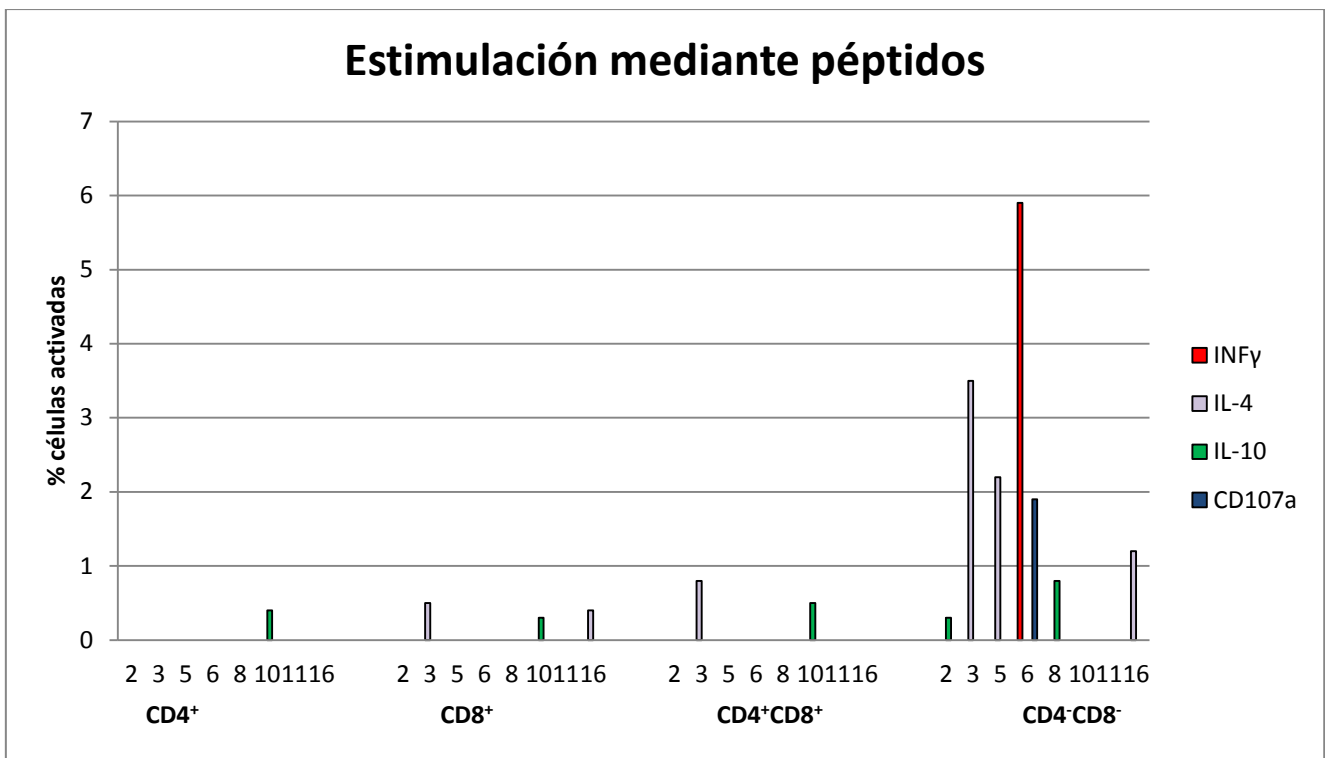


Figura 14. En esta figura se representan los valores de activación registrados en las distintas subpoblaciones estudiadas de cada grupo de pacientes.

A continuación, atendiendo a los datos de activación linfocitaria se muestra la proporción de pacientes en tanto por 1 de las distintas poblaciones en función del marcador de activación estudiado.

3.1.4. Análisis activación IFN- γ

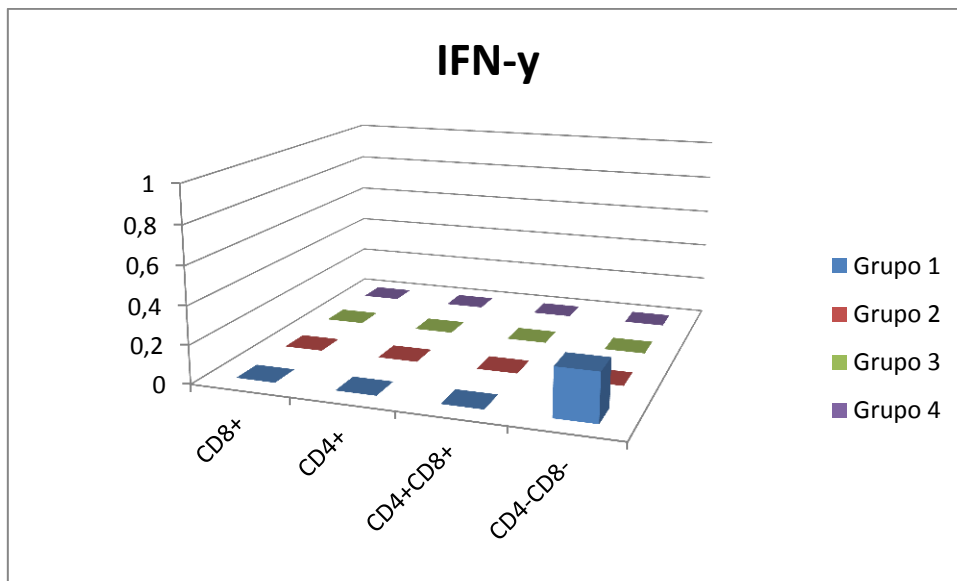


Figura 15. En esta figura se observan los valores de activación registrados de IFN- γ en las distintas subpoblaciones estudiadas de cada grupo de pacientes. Los datos se han representado en tanto por 1.

- Población CD4⁻CD8⁻

Se apreció activación en 1 paciente (25%) del grupo 1.

3.1.5. Análisis activación IL-4

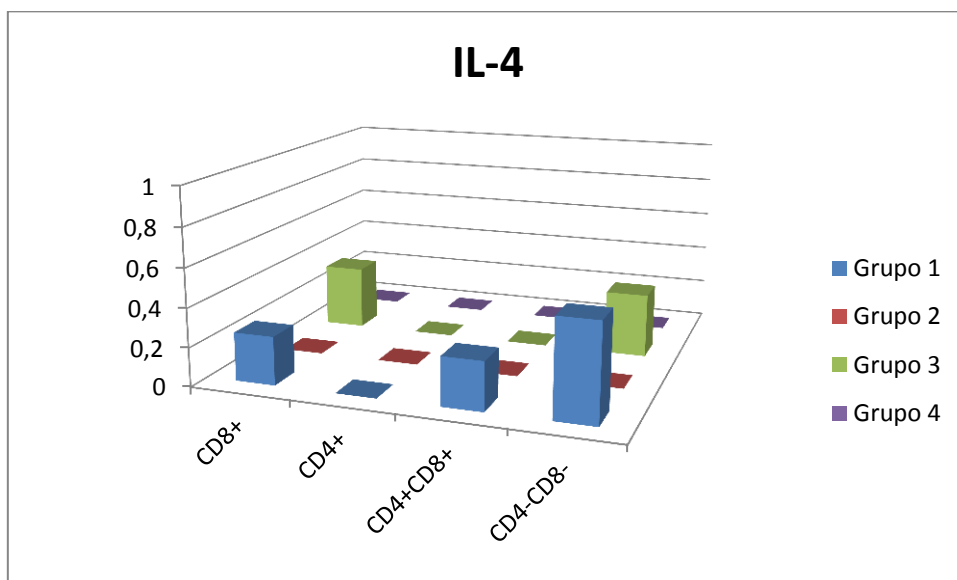


Figura 16. En esta figura se observan los valores de activación registrados de IL-4 en las distintas subpoblaciones estudiadas de cada grupo de pacientes. Los datos se han representado en tanto por 1.

- Población CD8⁺

Observamos activación en 1 paciente (25%) del grupo 1 y en 1 paciente (33%) del grupo 3.

- Población CD4⁺CD8⁺

En este caso, se detectó activación en 1 paciente (25%) del grupo 1.

- Población CD4⁻CD8⁻

Hemos registrado activación en 2 pacientes (50%) del grupo 1 y en 1 paciente (33%) del grupo 3.

3.1.6. Análisis activación IL-10

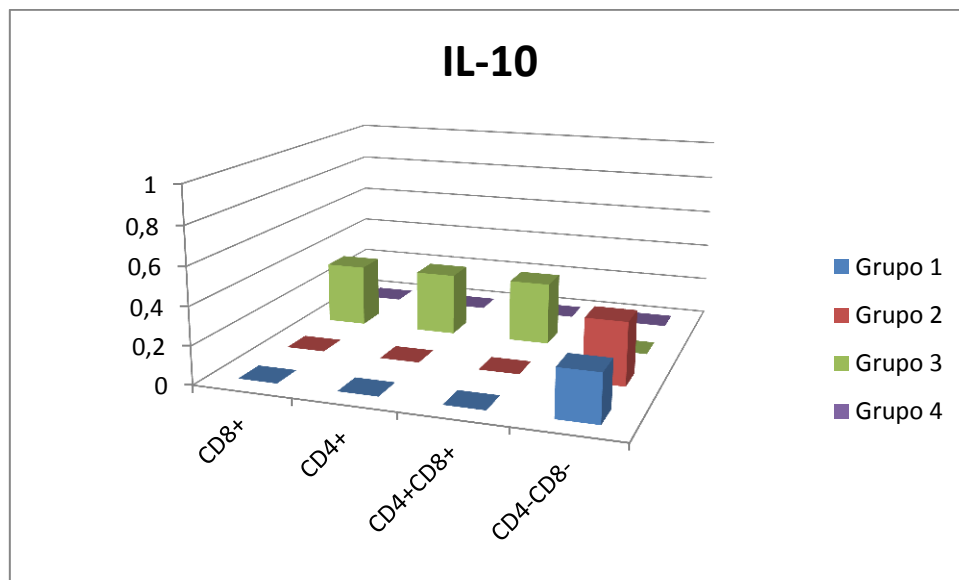


Figura 17. En esta figura se observan los valores de activación registrados de IL-10 en las distintas subpoblaciones estudiadas de cada grupo de pacientes. Los datos se han representado en tanto por 1.

- Población CD8⁺

Observamos activación en 1 paciente (33%) del grupo 3.

- Población CD4⁺

Hallamos activación en 1 paciente (33%) del grupo 3.

- Población CD4⁺CD8⁺

Encontramos activación en 1 paciente (33%) del grupo 3.

- Población CD4⁻CD8⁻

Detectamos activación en 1 paciente (25%) del grupo 1 y en 1 paciente (33%) del grupo 2.

3.1.7. Análisis activación CD107a

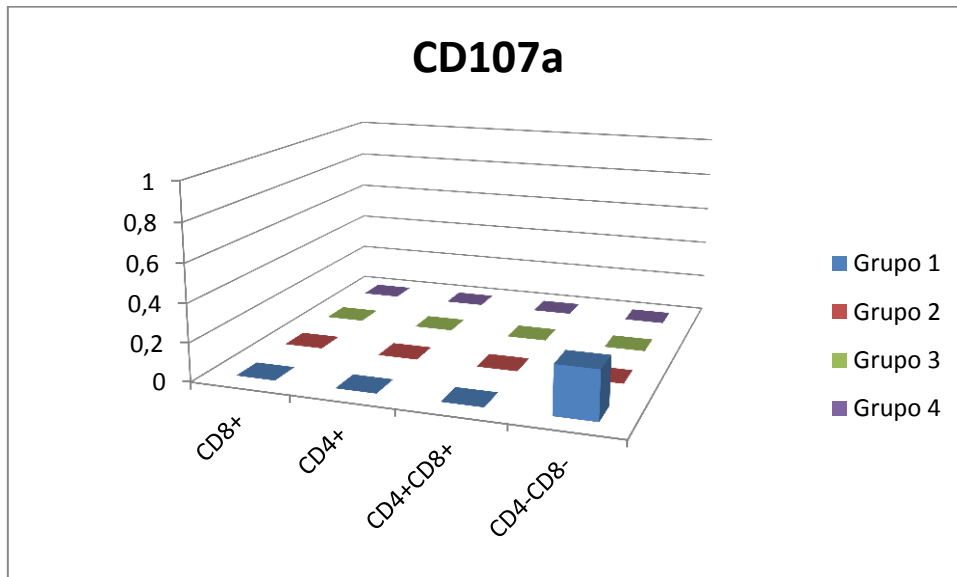


Figura 18. En esta figura se observan los valores de activación registrados de CD107a en las distintas subpoblaciones estudiadas de cada grupo de pacientes. Los datos se han representado en tanto por 1.

- Población CD4⁻/CD8⁻

En este caso, se detectó activación en 1 paciente (25%) del grupo 1.

3.1.8. Conclusión

Teniendo en cuenta los valores que hemos registrado de los distintos marcadores ensayados, podemos confirmar activación de las subpoblaciones analizadas en los pacientes estudiados. Sin embargo, dada la heterogeneidad de los resultados obtenidos así como la compleja conexión que existe entre las distintas rutas inmunológicas de activación, no se ha podido esclarecer una ruta concreta de activación.

3.2. Análisis global resultados hepatitis inmune *de novo*

3.2.1. Jerarquía

A continuación, se presenta la jerarquía utilizada para el análisis global de los resultados. En dicha jerarquía a partir de las distintas poblaciones linfocitarias donde hemos detectado activación (CD8⁺, CD4⁺ y CD4⁻/CD8⁻) hemos realizado una subdivisión atendiendo al marcador memoria CD45RO. Posteriormente, se analizaron los marcadores de activación anteriormente registrados en dichas poblaciones linfocitarias, tanto en la subpoblación memoria (CD45RO⁺)

como en la subpoblación no memoria (CD45RO⁻) (Figura 19). A modo de ejemplo en esta figura se representan los resultados obtenidos con células del paciente 5.

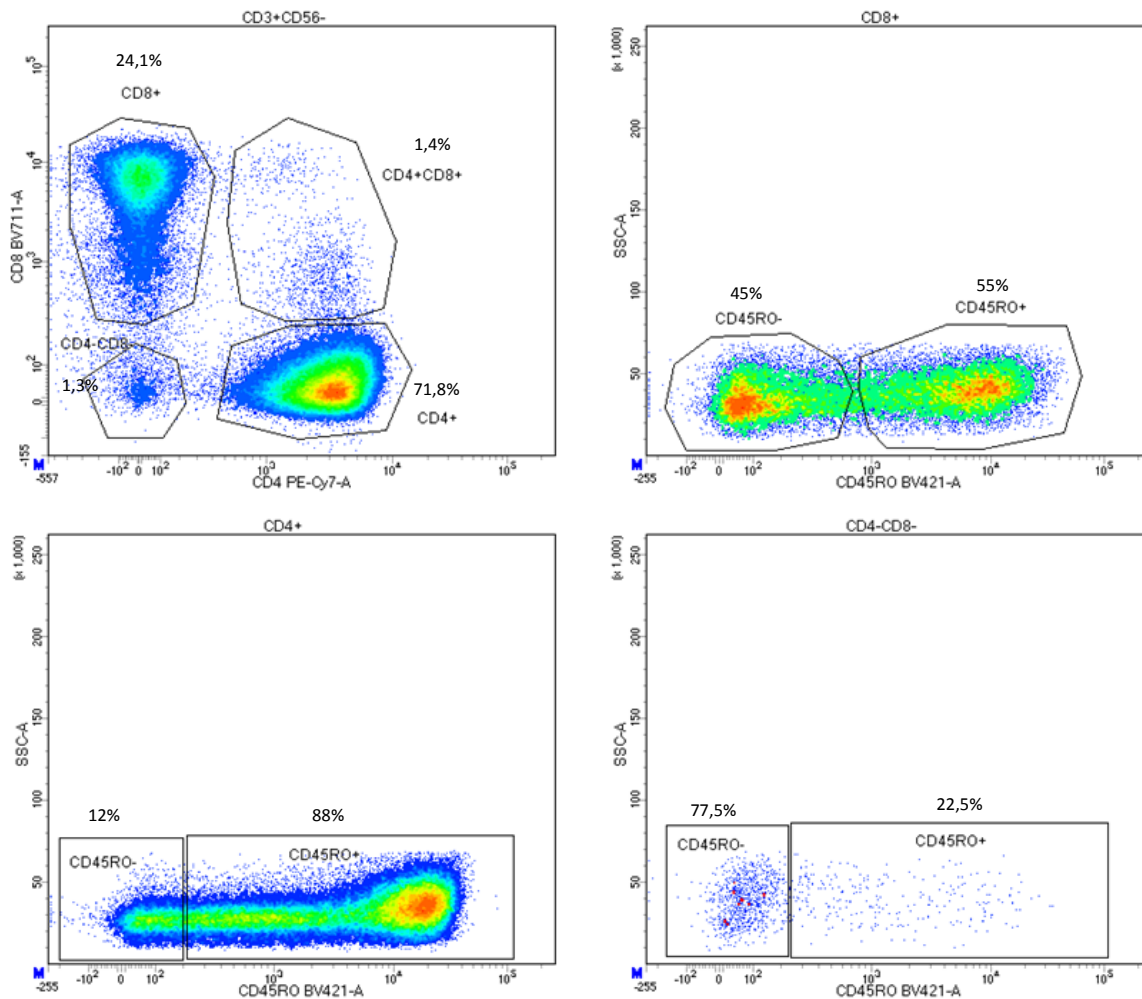


Figura 19. En esta figura se representa la jerarquía de marcadores utilizada en el análisis global del estudio de estimulación con péptidos de GSTT1. Se observan los resultados obtenidos del paciente 5.

3.2.2. Análisis poblacional CD4⁻CD8⁻

Dado que los datos de activación se concentran mayoritariamente en la población linfocitaria DN CD4⁻CD8⁻, decidimos realizar un análisis para evaluar los niveles de esta población entre los distintos grupos de estudio. Es interesante mencionar que a pesar de estar descrito en la bibliografía que dicha población linfocitaria no supera el 5% de la población linfocitaria total, aparece por encima de este umbral tanto en pacientes del grupo 1 (Paciente 1), como en pacientes del grupo 2 (Pacientes 7 y 9) y en pacientes del grupo 3 (Paciente 11). En la mayoría de los casos la subpoblación no memoria (CD45RO⁻) predomina sobre la subpoblación memoria (CD45RO⁺), excepto en un paciente del grupo 3 (Paciente 11) donde la subpoblación memoria es la mayoritaria.

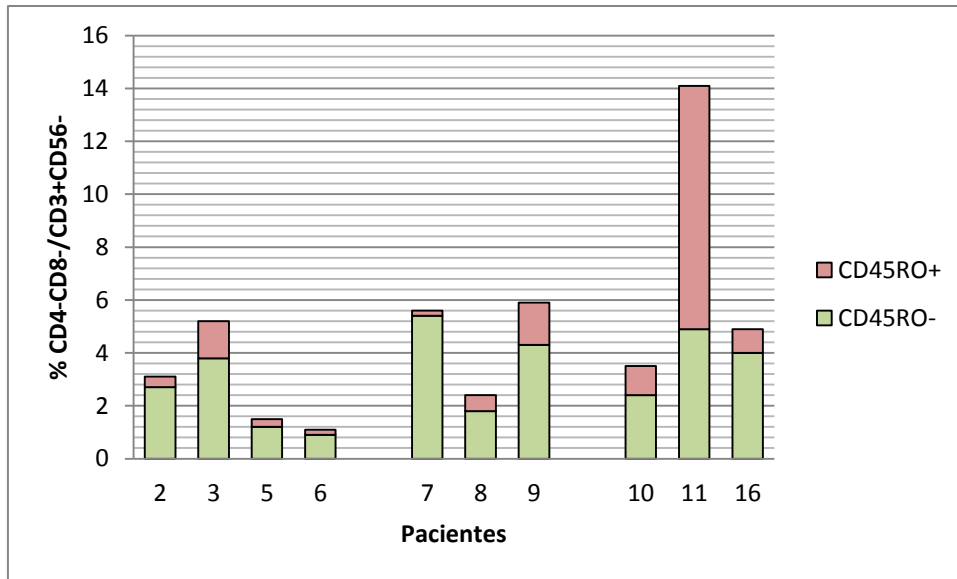


Figura 20. En la siguiente figura se observa la proporción de CD8⁺CD4⁻ dobles negativas/CD3⁺CD56⁻ de linfocitos T en sangre periférica de pacientes tras analizar el marcador de memoria CD45RO.

3.2.3. Análisis de activación global

Tras analizar la activación en las subpoblaciones anteriormente estudiadas, decidimos realizar un análisis global de los resultados y profundizar en ello usando el marcador memoria CD45RO. De tal forma que a partir de las poblaciones celulares donde habíamos detectado activación, en alguno de los marcadores ensayados, realizamos una subdivisión en base al marcador memoria distinguiendo la subpoblación memoria (CD45RO⁺) y la subpoblación no memoria (CD45RO⁻). Posteriormente, en cada subpoblación, volvimos a analizar los marcadores de activación registrados anteriormente. A continuación, se muestran los resultados obtenidos en cada población estudiada.

3.2.4. Población CD8⁺

Grupo	Paciente	CD8 ⁺			CD45RO ⁻			CD45RO ⁺		
		IFN-γ	IL-4	IL-10	IFN-γ	IL-4	IL-10	IFN-γ	IL-4	IL-10
1	2	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	3	0	0,5	0	-	0,5	-	-	0,4	-
	5	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	6	0	0	0	-	-	-	-	-	-
2	7	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	8	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	9	0	0	0	-	-	-	-	-	-
3	10	0	0	0,3	-	-	0,2	-	-	0,3
	11	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	16	0	0,4	0	-	0,3	-	-	0,6	-

Tabla 10. En esta tabla se recogen los resultados de activación de células CD8⁺ en experimentos con péptidos y el posterior análisis de activación en las subpoblaciones CD45RO⁻ y CD45RO⁺.

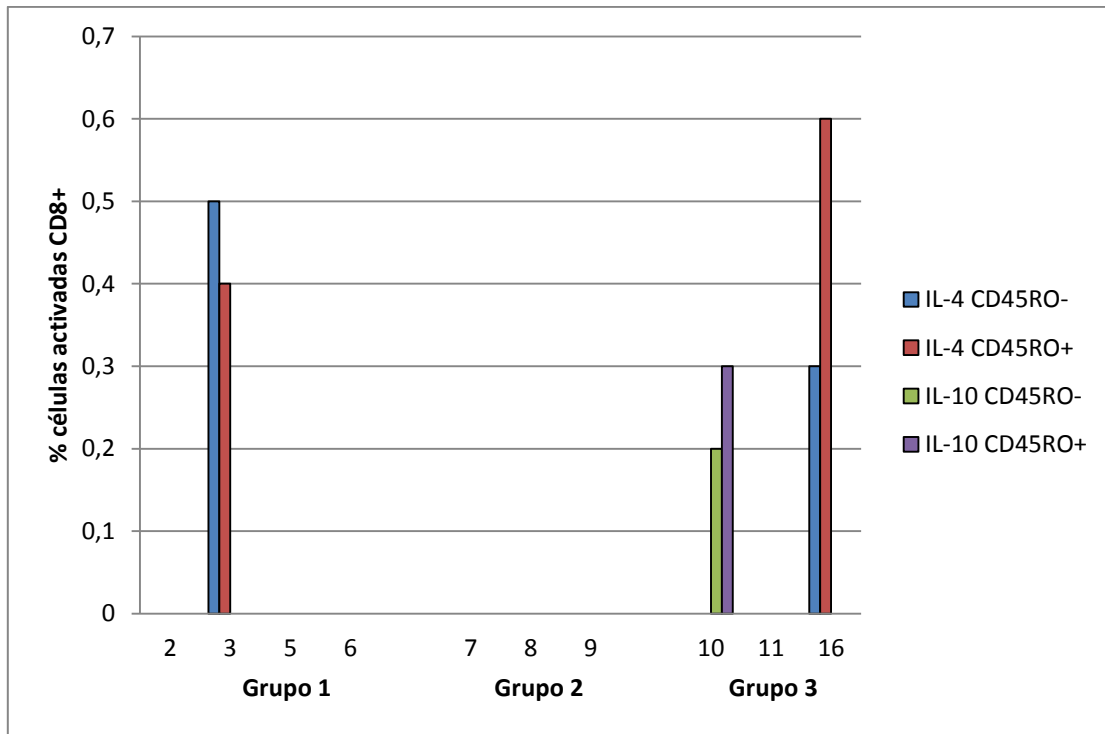


Figura 21. En esta figura se representan los valores de activación obtenidos en las distintas subpoblaciones no memoria (CD45RO⁻) y memoria (CD45RO⁺) a partir de la población CD8⁺. Aquellos casos donde no obtuvimos activación previa en la población CD8⁺ o no hubo activación en alguna de las subpoblaciones mencionadas anteriormente, no han sido representados.

3.2.5. Población CD4⁺

Grupo	Paciente	CD4 ⁺			CD45RO ⁻			CD45RO ⁺		
		IFN- γ	IL-4	IL-10	IFN- γ	IL-4	IL-10	IFN- γ	IL-4	IL-10
1	2	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	3	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	5	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	6	0	0	0	-	-	-	-	-	-
2	7	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	8	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	9	0	0	0	-	-	-	-	-	-
3	10	0	0	0,4	-	-	0,3	-	-	0,4
	11	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	16	0	0	0	-	-	-	-	-	-

Tabla 11. En esta tabla se recogen los resultados de activación de células CD4⁺ en experimentos con péptidos y el posterior análisis de activación en las subpoblaciones CD45RO⁻ y CD45RO⁺.

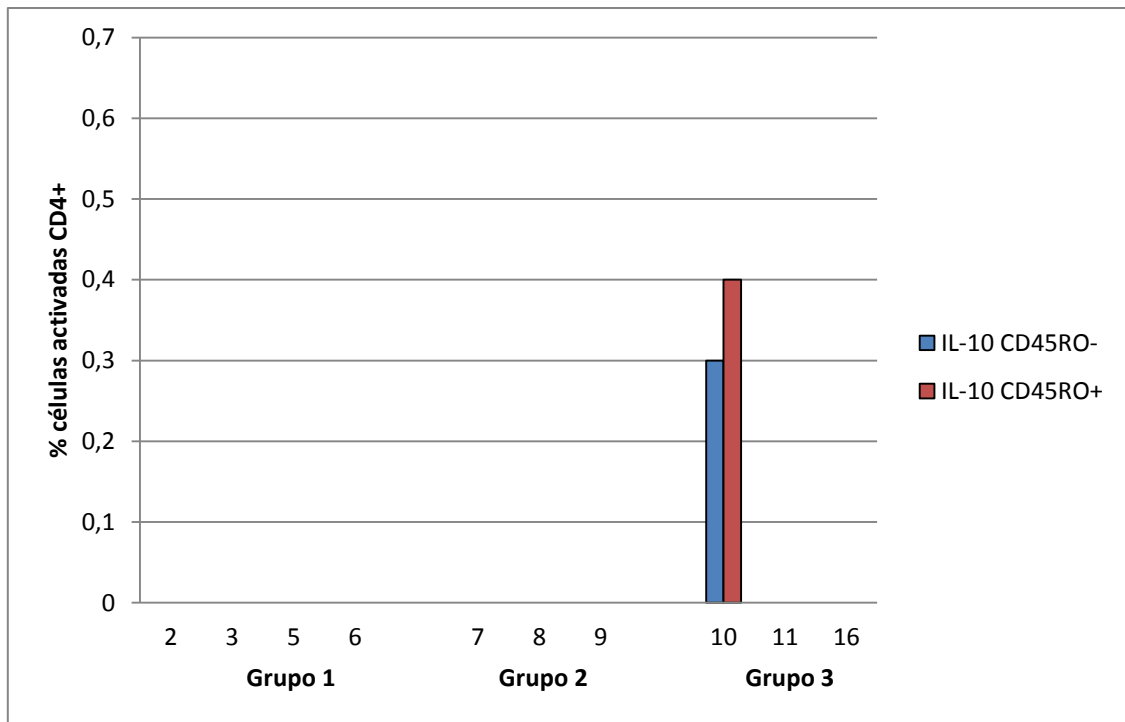


Figura 22. En esta figura se representan los valores de activación obtenidos en las distintas subpoblaciones no memoria (CD45RO⁻) y memoria (CD45RO⁺) a partir de la población CD4⁺. Aquellos casos donde no obtuvimos activación previa en la población CD4⁺ o no hubo activación en alguna de las subpoblaciones mencionadas anteriormente, no han sido representados.

3.2.6. Población CD4⁻CD8⁻

Grupo	Paciente	CD4 ⁻ CD8 ⁻			CD45RO ⁻			CD45RO ⁺		
		IFN- γ	IL-4	IL-10	IFN- γ	IL-4	IL-10	IFN- γ	IL-4	IL-10
1	2	0	0	0,3	-	-	0,3	-	-	1,1
	3	0	3,5	0	-	5,3	-	-	0	-
	5	0	2,2	0	-	1,9	-	-	0,4	-
	6	5,9	0	0	5,2	-	-	10,8	-	-
2	7	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	8	0	0	0,8	-	-	0,2	-	-	1,7
	9	0	0	0	-	-	-	-	-	-
3	10	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	11	0	0	0	-	-	-	-	-	-
	16	0	1,2	0	-	1	-	-	0,1	-

Tabla 12. En esta tabla se recogen los resultados de activación de células CD4⁻CD8⁻ en experimentos con péptidos y el posterior análisis de activación en las subpoblaciones CD45RO⁻ y CD45RO⁺.

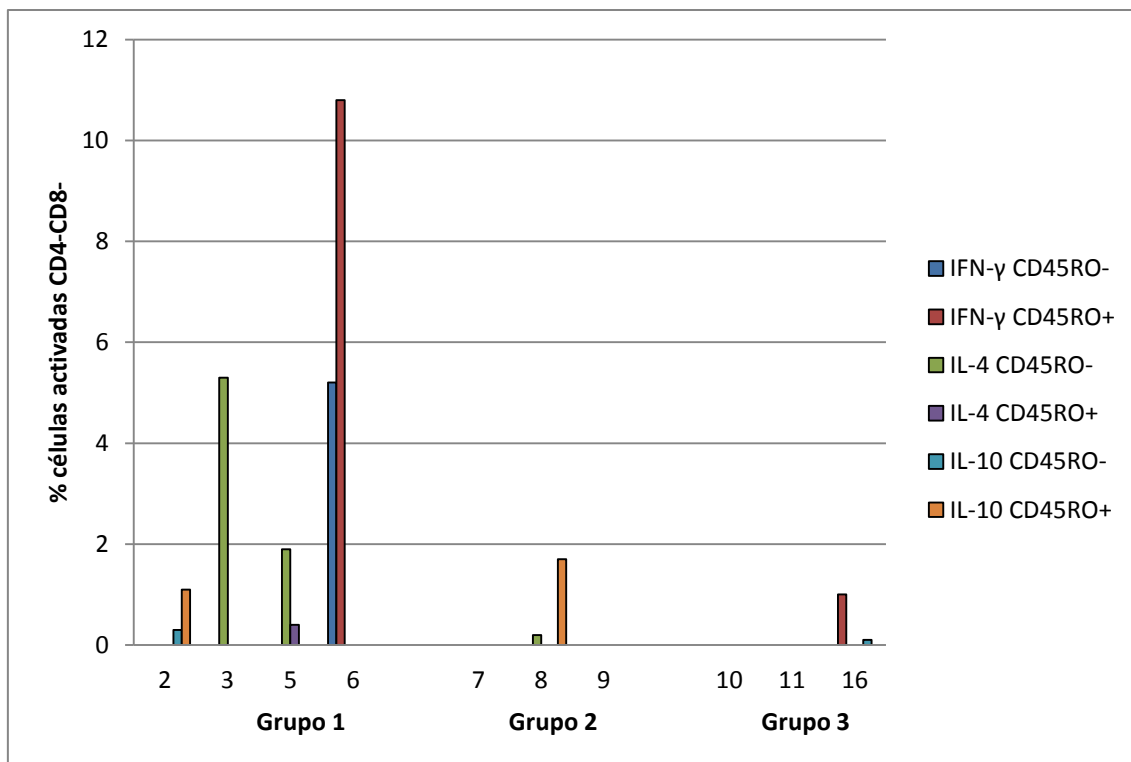


Figura 23. En esta figura se representan los valores de activación obtenidos en las distintas subpoblaciones no memoria (CD45RO⁻) y memoria (CD45RO⁺) a partir de la población CD4⁺CD8⁻. Aquellos casos donde no obtuvimos activación previa en la población CD4⁺CD8⁻ o no hubo activación en alguna de las subpoblaciones mencionadas anteriormente, no han sido representados.

Atendiendo a los resultados obtenidos, se observa que tanto la subpoblación efectora memoria (CD45RO⁺) como la subpoblación efectora no memoria (CD45RO⁻) presentan niveles de activación en los distintos marcadores ensayados. Sin embargo, existe una gran heterogeneidad en los resultados respecto al marcador CD45RO. En nuestra hipótesis, esperaríamos una rápida activación linfocitaria por parte de células efectoras memoria, lo cual queda confirmado como se puede apreciar en las tablas de resultados anteriormente expuestas. Sin embargo, en determinados casos se observa que la subpoblación efectora no memoria presenta un grado de activación mayor respecto a la subpoblación efectora memoria.

3.2.7. Consideraciones finales

Está absolutamente demostrado que las células T memoria (T_m) alo-específicas aceleran el rechazo del injerto y previenen la tolerancia. Sin embargo, y a pesar del conocimiento acumulado en el ámbito del trasplante, la posibilidad de diagnosticar el grado de alo-sensibilización de los linfocitos T en los candidatos a trasplante es problemático. No podemos olvidar que las células que generalmente se estudian provienen de sangre periférica y no hay información sobre linfocitos T_m residentes alo-específicas. En otro orden de cosas, los distintos tratamientos inmunosupresores dirigidos a bloquear la acción de los linfocitos T_m no siempre son eficaces dependiendo de cuál sea el origen de estas células. Los resultados obtenidos en este estudio nos han permitido confirmar, no solo la presencia de linfocitos T alo-específicos

en condiciones de incompatibilidad genética donante/receptor para el gen de la GSTT1, sino también su capacidad de activarse por distintas vías cuando son expuestos a su antígeno. Hemos encontrado que, además de las poblaciones clásicas CD4⁺ y CD8⁺, existen otras subpoblaciones dobles positivas CD4⁺CD8⁺ y dobles negativas CD4⁻CD8⁻, estas últimas descritas como reguladoras, cuya importancia en rechazo/tolerancia del injerto no está bien establecida. Sorprendentemente, las células DN alo-específicas para GSTT1 aparecen muy representadas en los pacientes estudiados por lo que tendremos que valorar en el futuro qué papel están jugando en la hepatitis inmune *de novo*, ya reconocida como un proceso de rechazo, denominado rechazo rico en células plasmáticas.

DISCUSIÓN

Discusión

En este apartado vamos a discutir los diferentes resultados obtenidos, siguiendo el mismo orden que establecimos para los objetivos al inicio del estudio.

Objetivo 1. Explorar la distribución celular de la proteína GSTT1 y estudiar la implicación de los anticuerpos GSTT1 específicos en el fracaso del órgano trasplantado.

Cuando nuestro grupo describió que todos los pacientes con hepatitis “autoinmune” *de novo* estaban en condiciones de incompatibilidad para los alelos de la GSTT1 con su donante y que todos presentaban anticuerpos específicos para este antígeno expresado solo en el injerto, empezamos a sugerir la idea de que se trataba de un rechazo y no de un proceso autoinmune *de novo* (Aguilera I, y col., 2001).

En la última actualización de los criterios de Banff, tras reunión de los expertos en Barcelona en el año 2016, se considera como un rechazo mediado por anticuerpos denominado “plasma cell-rich rejection” basado en la incompatibilidad GSTT1 con mención a los anticuerpos anti-GSTT1 pero sin considerarlos aún requisito imprescindible hasta que otros grupos lo validen (Demetris AJ y col., 2016).

A pesar de que GSTT1 se trata de una proteína citoplasmática, hemos podido demostrar que puede localizarse en la membrana celular. Aunque únicamente el 0,2% del total de células estudiadas presentaron doble marcaje GSTT1/marcador de membrana, no hay que olvidar que estas células se encontraban en unas condiciones fisiológicas óptimas.

Desde nuestro punto de vista, un ambiente de alto estrés oxidativo provocaría en las células hepáticas mayoritarias, los hepatocitos, un aumento en la expresión de las enzimas detoxificadoras, entre ellas GSTT1. De esta forma un mayor número de células hepáticas presentará la proteína a nivel de la membrana celular, permitiendo su reconocimiento por parte de los anticuerpos anti-GSTT1 específicos, los cuáles a través de mecanismos como la activación del sistema del complemento, provocarán daño tisular con el consiguiente rechazo del injerto.

Dada la enorme relevancia que han adquirido los anticuerpos anti-GSTT1 en nuestra patología, decidimos estudiar las distintas subclases de IgG de estos anticuerpos presentes en el suero de los pacientes. Encontramos que las subclases IgG1 e IgG4 fueron las únicas subclases representativas en todos los pacientes, independientemente de que hubiesen desarrollado la patología (Aguilera I y col., 2016).

El hecho de haber encontrado niveles elevados de anticuerpos anti-GSTT1 específicos de la subclase IgG4 en la mayoría de los pacientes de estudio resulta muy llamativo, ya que a pesar de ser un anticuerpo descrito como no fijador de complemento, esta subclase está relacionada con diversas patologías, especialmente de naturaleza autoinmune, como por ejemplo la

pancreatitis autoinmune tipo 1 (*Deshpande V y col., 2011; Okazaki K y col., 2011*). Por tanto, no está claro el papel que juega esta subclase de anticuerpo en nuestra patología de estudio.

Sin embargo, el papel de la alo-reactividad humoral en el trasplante hepático aún no está esclarecido. Desde los inicios del trasplante hepático, el hígado ha sido considerado como un órgano inmunológicamente privilegiado con resistencia relativa al rechazo (*Calne RY, Binns RM, Millard PR y col., 1967*).

La capacidad tolerogénica del hígado no solo se limita a la alo-inmunidad celular, sino que también parece extenderse a la inflamación mediada por anticuerpos. Se han propuesto varios mecanismos responsables de conferir estas propiedades tolerogénicas al hígado. Es probable que múltiples vías actúen coordinadamente para evitar el rechazo del injerto (*Cheng EY y Terasaki PI, 2015*). Entre los mecanismos que se postulan podemos mencionar la posibilidad del hígado de secretar antígenos HLA de clase I solubles (*Davies HFS, Pollard SG y Calne RY, 1989*). Además, el hígado tiene una enorme capacidad para absorber o neutralizar alo-anticuerpos dirigidos contra antígenos HLA (*Gugenheim J, Amorosa L, Gigou M y col., 1990*). La inflamación mediada por alo-anticuerpos puede ocurrir en el injerto hepático, particularmente en presencia de anticuerpos donante-específicos anti-HLA de clase II (*Cheng EY, 2017*).

Muy recientemente se ha descrito un nuevo antígeno implicado en el rechazo agudo del injerto renal (*Steers y col, 2019*). Se trata del gen LIMS1. La situación a nivel genético es muy similar a lo que ocurre con la GSTT1, donde el receptor es portador de alelos delecionados en homocigosis y recibe un órgano de un donante que tiene al menos un alelo normal. La similitud va más allá dado que se trata de una proteína citoplasmática, expresada en las células epiteliales de los túbulos renales. Por tanto, la gran pregunta sin resolver en ambos casos sigue siendo en qué momento y bajo qué condiciones estas proteínas quedan expuestas en la membrana plasmática para que pueda ser reconocida y se desencadene el rechazo mediado por anticuerpos. Curiosamente, los anticuerpos anti-LIMS1 pertenecen a las subclases IgG2 e IgG3, justo lo contrario de lo que hemos descrito para GSTT1.

Objetivo 2. Determinar la presencia de linfocitos T alo-específicos frente a la proteína GSTT1

En nuestra hipótesis planteamos que la respuesta celular T juega un papel muy importante en el desarrollo de la patología y posterior rechazo del injerto. El rechazo mediado por células T aparece ampliamente descrito en la bibliografía como por ejemplo en el trasplante renal (*Halloran PF, 2010; Randhawa P, 2015; Balaha M y col., 2019*).

Debemos mencionar que la tecnología empleada en nuestro abordaje experimental, a pesar de ser ampliamente utilizada en multitud de trabajos científicos (*Monti P y col., 2008; Giuliani L y col., 2009; Freed BM y col., 2011*) presenta una enorme complejidad técnica. En nuestro caso, algunas de las combinaciones HLA clase II-péptido no pudieron ser sintetizadas como tetrámero.

A pesar de ello, tras analizar los resultados obtenidos podemos determinar que tanto pacientes del grupo 1 (pacientes con la patología) como pacientes del grupo 3 (pacientes que sólo muestran la condición de riesgo) presentan reactividad en clase I con el pentámero A*01.

Esto concuerda con nuestra hipótesis, ya que los pacientes del grupo 3, al carecer de anticuerpos anti-GSTT1, no disponen de linfocitos B alo-específicos que actúen como células presentadoras de antígeno, a pesar de presentar linfocitos T alo-específicos. Por tanto, hemos conseguido demostrar la presencia de linfocitos T alo-específicos frente a una secuencia específica de la proteína diana en combinación con una molécula MHC concreta en células de pacientes.

Objetivo 3. Dilucidar el papel que desempeñan los linfocitos T específicos de GSTT1 en el rechazo del injerto.

Las células T memoria constituyen el mayor impedimento para la supervivencia del trasplante a largo plazo. Si las células T reguladoras pueden o no controlarlas continúa siendo un enigma.

Hay numerosas referencias en la literatura en las que se realiza una determinación de activación linfocitaria frente a péptidos, ya sean virales (*Kern F y col., 2000; Roque-Cuéllar MC y col., 2011*), donde los tiempos de incubación son más cortos (6 horas), o péptidos procedentes de proteínas humanas (*Kalache S y col., 2008; Ma Y y col., 2006*), en los que se amplían considerablemente esas incubaciones (48 horas-una semana).

En el estudio de estimulación mediante péptidos de GSTT1 se aprecia que la activación se concentra principalmente en los grupos 1 y 3. Al analizar los datos obtenidos, no se observó activación en ninguna de las rutas clásicas mediadas por IFN- γ (Tc1 y Th1). Sin embargo, se registró actividad vía IFN- γ en la subpoblación CD4⁻CD8⁻ correspondiente a pacientes del grupo 1.

En cuanto a la liberación de IL-4, se detectó activación de la ruta Tc2 en pacientes del grupo 1 y del grupo 3. Además, tanto la subpoblación CD4⁻CD8⁻ de pacientes del grupo 1 y del grupo 3 como la subpoblación CD4⁺CD8⁺ de pacientes del grupo 1 mostraron actividad vía IL-4.

Respecto a la citoquina IL-10, este marcador se registró en la subpoblación CD8⁺ de pacientes del grupo 3. También se detectó en la subpoblación CD4⁺ de pacientes del grupo 3, en las subpoblaciones CD4⁻CD8⁻ de pacientes del grupo 1 y del grupo 2, así como en la subpoblación CD4⁺CD8⁺ de pacientes del grupo 3. En un estudio realizado por Villani y col., observaron que la subpoblación CD4⁻CD8⁻ presentaba un incremento de la expresión de IL-10 al ser estimulada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (en su forma parasitaria humana de tripomastigote) (*Villani FN y col., 2010*) y en la subpoblación CD4⁺CD8⁺. Los trabajos de Eljaafari y col., aportan datos similares en un grupo de pacientes con enfermedad injerto contra huésped. Tras la estimulación con una línea celular linfoblastoide inmortalizada por infección del virus de Epstein-Barr, la subpoblación CD4⁺CD8⁺ produce mayores niveles de IL-10 (*Eljaafari A y col., 2013*).

Como hemos mencionado anteriormente, se registró activación en la subpoblación CD4⁻CD8⁻ (DN). Se trata de un grupo celular muy interesante cuya proporción está descrito en la literatura que no supera el 5% de la población total linfocitaria, aunque nosotros hemos encontrado pacientes con proporciones superiores a este número que van de 5,2 a 14,1% del total.

El modo de acción de las células T DN y su contribución a la tolerancia de manera antígeno-específica ha sido estudiado en varios escenarios, sobre todo en modelos murinos de enfermedades autoinmunes como la diabetes. Las células DN pueden eliminar no solo linfocitos T específicos sino también linfocitos B activados presentadores del antígeno afín (Zhang ZX y col., 2006). Se ha demostrado que la IL-10 limita la expansión de DN inmunoreguladoras en ratones diabéticos, hecho que está asociado a una mayor tasa de apoptosis en estas células (Hillhouse EE y col., 2010).

Las células T DN exhiben un potencial inmunoregulador que es único y específico de antígeno. Este papel se describió por primera vez hace 30 años cuando (Strober S y col., 1989) clonaron DN de ratón y posteriormente demostraron su actividad supresora en un cultivo mixto linfocitario. Ese mismo año, en piel humana, se identificaron estas células (Groh V y col., 1989). Años más tarde (Zhang ZX y col., 2000) fueron los primeros en demostrar la capacidad de DN de promover tolerancia a injertos con incompatibilidad MHC de forma antígeno-específica. Posteriormente, este mismo grupo demostró que las T reguladoras DN suprimen de forma eficaz a las células T CD4⁺CD8⁺ efectoras y las CD8⁺ memoria, pero son incapaces de suprimir las CD4⁺ memoria (Su Y y col., 2014). Desde entonces, se ha visto que la capacidad supresora de las DN se extiende a células NK (He KM y col., 2007; Su Y y col., 2012), linfocitos B (Zhang ZX y col., 2006; Ma Y y col., 2008; Hillhouse EE y col., 2010; Ford McIntyre MS y col., 2011) y células dendríticas (Gao JF y col., 2011).

En el contexto de enfermedad de injerto contra huésped, se ha visto que los niveles de células CD4⁺CD8⁻ CD45RO⁺ se correlacionan con más severidad en EICH crónica. Se documentaron niveles bajos en el momento del diagnóstico de EICHc, momento en el que los niveles de BAFF en suero y las células B aumentaron. Estos resultados apoyan la idea de que los linfocitos T DN tienen el potencial de eliminar linfocitos B, ejerciendo así una acción inmunoreguladora, de forma que si los niveles se mantienen altos se podría prevenir el comienzo de EICHc (Hillhouse EE y col., 2019).

Nosotros hemos cuantificado el número de células DN respecto al total de células CD3⁺CD56⁻ de sangre periférica en estos pacientes, aunque la muestra no corresponde al momento del diagnóstico sino a muestras extraídas años después en pacientes que reciben no solo inmunosupresión estandarizada sino que además, a aquellos diagnosticados con hepatitis inmune *de novo* se les administra terapia adicional con consiste en esteroides. Incluso en estas condiciones de inmunosupresión, observamos niveles más altos de DN en la mayoría de pacientes respecto a lo descrito para la población sana. Además, algunas de estas células antígeno-específicas se activan bajo estímulo de la GSTT1 *in vitro* por lo que cabe pensar que, en condiciones fisiológicas, están ejerciendo su acción supresora frente a otras células antígeno-específicas presentes en los pacientes.

Las células DN provienen mayoritariamente de células CD4⁺. Esta nueva ruta de diferenciación descrita por (Zhao X y col., 2016) es capaz de inclinar la balanza hacia una respuesta reguladora en vez de una respuesta desfavorable. La combinación de sus características fenotípicas y su propiedad reguladora específica de antígeno frente a diferentes tipos celulares, ha impulsado a los investigadores a examinar el papel que pueden tener en varios modelos de enfermedad y

su potencial terapéutico. Se ha estudiado en los ámbitos de tolerancia al injerto, enfermedades autoinmunes y EICH.

Dichas células fueron aisladas y caracterizadas en humanos en 2005 (*Fisher K y col.*) y se ha visto que comparten muchas de las propiedades de sus homólogas murinas, incluyendo la secreción de IFN- γ y la adquisición del alo-antígeno de las APCs del donante, seguido de reconocimiento y muerte de células T CD8⁺ activadas, específicas para el mismo alo-antígeno. La mayor parte de los conocimientos sobre el papel de DN humanas en tolerancia en trasplante proviene de estudios con pacientes trasplantados de médula ósea en los que se observó una correlación inversa entre la frecuencia de DN circulantes y la gravedad de EICH (*McIver Z y col., 2008*).

Estas células pueden presentar varias funciones. Por un lado, pueden actuar como célula inmunorreguladora, llevando a cabo la supresión de linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺ a través de los sistemas Fas/FasL o granzima/perforina. Por otro lado, pueden promover la respuesta inmunitaria liberando citoquinas propias de los linfocitos T CD4⁺ colaboradores como por ejemplo: IL-17, IL-4, IFN- γ y TNF- α (*D'Acquisto F y Crompton T, 2011; Hillhouse EE y Lesage S, 2013; X Lu y col., 2016*).

Por último, atendiendo al análisis de activación global respecto al marcador memoria CD45RO, hemos detectado que dentro de las distintas poblaciones de estudio que se activan al estimular con los péptidos de GSTT1 (CD8⁺, CD4⁺ y CD4⁻CD8⁻) existe una subpoblación efectora no memoria (CD45RO⁻). Esta subpoblación podría corresponder a las denominadas células Temra (Células T efectoras memoria RA⁺), aunque habría para confirmarlo en futuros estudios, incluyendo el marcador RA. Esta subpoblación celular se encuentra en una etapa del ciclo de diferenciación muy avanzada, por lo que expresan marcadores de senescencia. El efecto de un estímulo antigénico prologando en el tiempo, como sería la exposición al antígeno GSTT1 en pacientes trasplantados, provoca la diferenciación hacia este estadio celular, por ejemplo en infecciones crónicas por citomegalovirus. Entre sus funciones destaca la liberación de grandes cantidades de IFN- γ , como mecanismo de respuesta rápida a re-infecciones. Además, estas células presentan un tiempo de vida media muy corto, ya que su tasa de recambio está establecida en torno a 20 días (*Macallan DC y col., 2004; Willinger T y col., 2005; Mahnke YD y col., 2013; Larbi A y Fulop T, 2014; Verma K y col., 2017; Tian Y y col., 2017; Martin MD y Badovinac VP, 2018*).

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Los estudios inmunocitoquímicos y de citometría de flujo demuestran que, aunque la proteína GSTT1 es fundamentalmente intracitoplasmática, también se expresa en la superficie de una pequeña proporción de células hepáticas, lo que la convierte en diana de los anticuerpos anti-GSTT1, pudiendo ser éste un mecanismo que contribuye al daño hepático en pacientes con hepatitis inmune *de novo*.
2. Los anticuerpos anti-GSTT1 pertenecen a las subclases IgG1 e IgG4, siendo prácticamente indetectables las subclases IgG2 e IgG3. Esta preferencia por IgG1, anticuerpo activador del complemento, sería otro elemento que apoyaría un cierto papel patogénico directo de los anticuerpos anti-GSTT1 en la génesis de la hepatitis inmune *de novo*.
3. En pacientes con la incompatibilidad donante+/recepto nulo, los linfocitos T alo-específicos frente a GSTT1 pertenecen a las categorías CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ y CD4⁻CD8⁻.
4. Hemos conseguido demostrar la presencia de linfocitos T CD8⁺ específicos frente a péptidos derivados de la proteína GSTT1 que pueden llegar a representar un 5% del total de linfocitos circulantes, lo que nos permite afirmar que el daño hepático es consecuencia de la acción de linfocitos T citotóxicos alo-específicos.
5. No hemos conseguido aislar linfocitos CD4⁺ específicos de GSTT1 en nuestros pacientes a pesar de la evidente respuesta humoral presente en ellos y que requeriría de la presencia de este tipo de linfocitos. Este dato puede ser consecuencia de una limitación técnica al haberse ensayado sólo la participación de algunas moléculas DRB1 en los estudios con tetrámeros y no, por ejemplo de moléculas DQ.
6. Existen subpoblaciones linfocitarias T de memoria que en presencia del estímulo antigénico GSTT1 se activan rápidamente. Dichas células en colaboración con linfocitos B específicos frente a GSTT1, serían las responsables del desarrollo de la patología y posterior fracaso del injerto.
7. Tras la estimulación de los linfocitos T con la proteína GSTT1, la activación se registra principalmente en la subpoblación doble negativa CD4⁻CD8⁻, destacando la vía de la IL-4.
8. Las células CD4⁻CD8⁻ se encuentran a niveles más altos que los descritos en población normal, siendo en la mayoría de los casos la subpoblación no memoria (CD45RO⁻) predominante sobre la subpoblación memoria (CD45RO⁺).

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Aguilera I, Sousa JM, Gavilan F, Bernardos A, Wichmann I and Nuñez-Roldan A. Antibodies against Glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with de novo immune hepatitis following liver transplantation. *Clin Exp Immunol* 2001; 37:3968-3969.

Aguilera I, Sousa JM, Gavilan F, Bernardos A, Wichmann I and Nuñez-Roldan A. Glutathione-S-transferase T1 mismatch constitutes a risk factor for de novo immune hepatitis after liver transplantation. *Liver Transpl* 2004; 10:1166-1172.

Aguilera I, Wichmann I, Gentil MA, Gonzalez-Escribano MF and Nuñez-Roldan A. Alloimmune response against donor Glutathione-S-transferase T1 antigen in renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2005; 46:345-350.

Aguilera I, Alvarez-Marquez A, Gentil MA, Fernandez-Alonso J, Fijo J, Saez C, Wichmann I and Nuñez-Roldan A. Anti-Glutathione-S-transferase T1 antibody-mediated rejection in C4d-positive renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transpl* 2008; 23:2393-2398.

Aguilera I, Sousa JM, Gavilan F, Gomez L, Alvarez-Marquez A and Nuñez-Roldan A. Complement Component 4d Immunostaining in Liver Allografts of Patients With De Novo Immune Hepatitis. *Liver Transpl* 2011; 17:779-788.

Aguilera I, Sousa JM, Praena JM, Gómez-Bravo MA and Nuñez-Roldan A. Choice of calcineurin inhibitor may influence the development of de novo Immune Hepatitis associated with anti-GSTT1 antibodies after liver transplantation. *Clin Transplant* 2011; 25(2):207-212.

Aguilera I, Martinez-Bravo MJ, Sousa JM, Pozo-Borrego AJ, Núñez-Roldán A. IgG subclass profile among anti-Glutathione S-transferase T1 antibodies in post-transplant *de novo* immune hepatitis. *Clin Transplant* 2016; 30(3):210-217.

Balaha M, Al-Otaibi T, Gheith OA, Halim MA, Shaker M, Fayyad Z, Nair P, Zakaria Z, Abo-Atya H, Makkeyia Y. Thymoglobulin-Resistant T-Cell-Mediated Acute Rejection in a Pregnant Renal Transplant Recipient: Case Report and Review of the Literature. *Exp Clin Transplant* 2019; 17(Suppl 1):159-163.

Brickner AG, Warren EH, Caldwell JA, Akatsuka Y, Golovina TN, Zarling AL, Shabanowitz J, Eisenlohr LC, Hunt DF, Engelhard VH and Riddell SR. The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results from differential antigen processing. *J Exp Med* 2001; 193(2):195-206.

Calne RY, White HJ, Yoffa DE, Binns RM, Maginn RR, Herbertson RM, Millard PR, Molina VP, Davis DR. Prolonged survival of liver transplants in the pig. *Br Med J* 1967; 4(5580):645-648.

Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, Gripon P, Kremsdorf D, Guguen-Guillouzo c, Corlu A. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* 2007; 45(4):957-967.

Cheng EY, Terasaki PI. Tolerogenic Mechanisms in Liver Transplantation. *SOJ Immunol* 2015; 3(4):1-13.

Cheng EY. The Role of Humoral Alloreactivity in Liver Transplantation: Lessons Learned and New Perspectives. *J Immunol Res* 2017; 2017:3234906.

Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Mauiyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D, Farrell ML, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB and Saidman SL. Chronic humoral rejection in renal allograft recipients. I. Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation* 2001; 71:652-658.

D'Acquisto F, Crompton T. CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? *Biochem Pharmacol* 2011; 82(4):333-340.

Davies HS, Pollard SG, Calne RY. Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients. *Transplantation* 1989; 47(3):524-527.

Demetris AJ, Bellamy C, Hübscher SG, O'Leary J, Randhawa PS, Feng S, Neil D, Colvin RB, McCaughan G, Fung JJ, Del Bello A, Reinholt FP, Haga H, Adeyi O, Czaja AJ, Schiano T, Fiel MI, Smith ML, Sebagh M, Tanigawa RY, Yilmaz F, Alexander G, Baiocchi L, Balasubramanian M, Batal I, Bhan AK, Bucuvalas J, Cerski CTS, Charlotte F, de Vera ME, ElMonayeri M, Fontes P, Furth EE, Gouw ASH, Hafezi-Bakhtiari S, Hart J, Honsova E, Ismail W, Itoh T, Jhala NC, Khettry U, Klintmalm GB, Knechtle S, Koshiba T, Kozlowski T, Lassman CR, Lerut J, Levitsky J, Licini L, Liotta R, Mazariegos G, Minervini MI, Misdraji J, Mohanakumar T, Mölne J, Nasser I, Neuberger J, O'Neil M, Pappo O, Petrovic L, Ruiz P, Sağol Ö, Sanchez Fueyo A, Sasatomi E, Shaked A, Shiller M, Shimizu T, Sis B, Sonzogni A, Stevenson HL, Thung SN, Tisone G, Tsamandas AC, Wernerson A, Wu T, Zeevi A, Zen Y. 2016 Comprehensive Update of the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology: Introduction of Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant* 2016; 16(10):2816-2835.

den Haan JM, Sherman NE, Blokland E, Huczko E, Koning F, Drijfhout JW, Skipper J, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 1995; 268(5216):1476-1480.

den Haan JM, Meadows LM, Wang W, Pool J, Blokland E, Bishop TL, Reinhardus C, Shabanowitz J, Offringa R, Hunt DF, Engelhard VH and Goulmy E. The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science* 1998; 279(5353):1054-1057.

Deshpande V, Gupta R, Sainani N, Sahani DV, Virk R, Ferrone C, Khosroshahi A, Stone JH, Lauwers GY. Subclassification of autoimmune pancreatitis: a histologic classification with clinical significance. *Am J Surg Pathol* 2011; 35(1):26-35.

Economopoulos KP and Sergentanis TN. GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis. *Eur J Cancer* 2010; 46(9):1617-1631.

Eljaafari A, Yuruker O, Ferrand C, Farre A, Addey C, Tartelin ML, Thomas X, Tiberghien P, Simpson E, Rigal D, Scott D. Isolation of human CD4/CD8 double-positive, graft-versus-host disease-protective, minor histocompatibility antigen-specific regulatory T cells and of a novel HLA-DR7-restricted HY-specific CD4 clone. *J Immunol* 2013; 190(1):184-94.

Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, Miyamura K, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y and Nakao S. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One*; 6(10):e262229.

Feutch HE, Lederer SR and Kluth B. Humoral alloreactivity in recipients of renal allografts as a risk factor for the development of delayed graft function. *Transplantation* 1998; 65:757-758.

Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, Kunz-Schughart L, Schmidt CA, Andreesen R, Mackensen A. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* 2005; 105(7):2828-2835.

Ford McIntyre MS, Gao JF, Li X, Naeini BM, Zhang L. Consequences of double negative regulatory T cell and antigen presenting cell interaction on immune response suppression. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11(5):597-603.

Freed BM, Schuyler RP, Aubrey MT. Association of the HLA-DRB1 epitope LA (67, 74) with rheumatoid arthritis and citrullinated vimentin binding. *Arthritis Rheum* 2011; 63(12):3733-3739.

Frost AE, Jammal CT and Cagle PT. Hyperacute rejection following lung transplantation. *Chest* 1996; 110:559-562.

Gao JF, McIntyre MS, Juvet SC, Diao J, Li X, Vanama RB, Mak TW, Cattral MS, Zhang L. Regulation of antigen-expressing dendritic cells by double negative regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2011; 41(9):2699-2708.

Gao Y, Pan X, Su T, Mo Z, Cao Y and Gao F. Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism and colorectal cancer risk: A meta-analysis and HuGE review. *Eur J Cancer* 2009; 45(18):3303-3314.

Giuliani L, Mele R, Di Giovine M, Altieri L, Crinò A, Ravà L, Fierabracci A. Detection of GAD65 autoreactive T-cells by HLA class I tetramers in type 1 diabetic patients. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009:576219.

Gorer PA. Some recent work on tumor immunity. *Adv in Cancer Res* 1956; 4:149-186.

Groh V, Fabbi M, Hochstenbach F, Maziarz RT, Strominger JL. Double-negative (CD4-CD8-) lymphocytes bearing T-cell receptor alpha and beta chains in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(13):5059-5063.

Gugenheim J, Amorosa L, Gigou M, Fabiani B, Rouger P, Gane P, Reynes M, Bismuth H. Specific absorption of lymphocytotoxic alloantibodies by the liver in inbred rats. *Transplantation* 1990; 50(2):309-13.

Halloran PF. T cell-mediated rejection of kidney transplants: a personal viewpoint. *Am J Transplant* 2010; 10(5):1126-1134.

He KM, Ma Y, Wang S, Min WP, Zhong R, Jevnikar A, Zhang ZX. Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance. *Eur J Immunol* 2007; 37(12):3455-3466.

Heneghan MA, Portmann BC, Norris SM, Williams R, Muiesan P, Rela M, Heaton ND, O'Grady JG. Graft dysfunction mimicking autoimmune hepatitis following liver transplantation in adults. *Hepatology* 2001; 34:464-470.

Hernández-Albújar A, Alvarez E, Salcedo M, Piqueras B, Durán FG, Bañares R, Rodríguez-Mahou R, Cos E, Clemente G. Autoimmune mediated liver disease after liver transplantation. *J Hepatol* 1997; 26(Suppl 1):152A.

Higuchi ML, Bocchi E, Fiorelli A, Aiello VD, Saldanha LB, Stolf N, Kalil J, Bellotti G and Jatene A. Histopathologic aspects of hyperacute graft rejection in human cardiac transplantation. A case report. *Arq Bras Cardiol* 1989; 52:39-41.

Hillhouse EE, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Dugas V, Lesage S. Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4⁺CD8⁻ T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol Cell Biol* 2010; 88(8):771-780.

Hillhouse EE, Lesage S. A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells. *J Autoimmun* 2013; 40:58-65.

Hillhouse EE, Thiant S, Moutuou MM, Lombard-Vadnais F, Parat R, Delisle JS, Ahmad I, Roy DC, Guimond M, Roy J, Lesage S. Double-Negative T Cell Levels Correlate with Chronic Graft-versus-Host Disease Severity. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019; 25(1):19-25.

Hu D, Weiner HL, Ritz J. Identification of Cytolytic CD161⁺CD56⁺ Regulatory CD8⁺ T Cells in Human Peripheral Blood. *PLoS One* 2013; 8(3):e59545.

Immunología celular y molecular. 8ª Edición. Abul K. Abbas, Andrew Lichtman y Shiv Pillai. Editorial Elsevier Saunders.

Jones DE, James OF, Portmann B, Burt AD, Williams R, Hudson M. Development of autoimmune hepatitis following liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999; 30:53-57.

Lu X, Su B, Xia H, Zhang X, Liu Z, Ji Y, Yang Z, Dai L, Mayr LM, Moog C, Wu H, Huang X, Zhang T. Low Double-Negative CD3⁺CD4⁻CD8⁻ T Cells Are Associated with Incomplete Restoration of CD4⁺ T Cells and Higher Immune Activation in HIV-1 Immunological Non-Responders. *Front Immunol* 2016; 7:579.

Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O and Nielsen M. NetMHC-3.0: Accurate web accessible predictions of Human, Mouse and Monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *NAR* 2008; 36:W509-512.

Kalache S, Dinavahi R, Pinney S, Mehrotra A, Cunningham MW and Heeger PS. Anticardiac myosin immunity and chronic allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *J Immunol* 2011; 187(2):1023-1030.

Kerkar N, Hadzic N, Davies ET, Portmann B, Donaldson PT, Rela M, Heaton ND, Vergani D, Mieli-Vergani G. De-novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Lancet* 1998; 351:409-413.

Kern F, Faulhaber N, Frömmel C, Khatamzas E, Prösch S, Schönemann C, Kretzschmar I, Volkmer-Engert R, Volk HD and Reinke P. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol* 2000; 30(6):1676-1682.

Kim Y, Ponomarenko J, Zhu Z, Tamang D, Wang P, Greenbaum J, Lundegaard C, Sette A, Lund O, Bourne PE, Nielsen M and Peters B. Immune epitope database analysis resource. *NAR* 2012; 40:W525-530.

Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, Hegland J, Kamani N, Kernan NA, King R, Ratanatharathorn V, Weisdorf D and Confer DL. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 2001; 98(7):2043-2051.

Larbi A, Fulop T. From "truly naïve" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A* 2014; 85(1):25-35.

Ma Y, Bogdanos DP, Hussain MJ, Underhill J, Bansal S, Longhi MS, Cheeseman P, Mieli-Vergani G and Vergani D. Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Gastroenterology* 2006; 130(3):868-882.

Ma Y, He KM, Garcia B, Min W, Jevnikar A, Zhang ZX. Adoptive transfer of double negative T regulatory cells induces B-cell death in vivo and alters rejection pattern of rat-to-mouse heart transplantation. *Xenotransplantation* 2008; 15(1):56-63.

Macallan DC, Wallace D, Zhang Y, De Lara C, Worth AT, Ghattas H, Griffin GE, Beverley PC, Tough DF. Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans. *J Exp Med* 2004; 200(2):255-260.

Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 2013; 43(11):2797-2809.

Martin MD, Badovinac VP. Defining Memory CD8 T Cell. *Front Immunol* 2018; 9:2692.

McCarroll SA, Bradner JE, Turpeinen H, Volin L, Martin PJ, Chilewski SD, Antin JH, Lee SJ, Ruutu T, Storer B, Warren EH, Zhang B, Zhao LP, Ginsburg D, Soiffer RJ, Partanen J, Hansen JA, Ritz J, Palotie A and Altshuler D. Donor-recipient mismatch for common gene deletion polymorphisms in graft-versus-host disease. *Nat Genet* 2009; 41:1341-1344.

Mclver Z, Serio B, Dunbar A, O'Keefe CL, Powers J, Wlodarski M, Jin T, Sobecks R, Bolwell B, Maciejewski JP. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2008; 141(2):170-178.

Miklos DB, Kim HT, Zorn E, Hochberg EP, Guo L, Mattes-Ritz A, Viatte S, Soiffer RJ, Antin JH and Ritz J. Antibody response to DBY minor histocompatibility antigen is induced after allogeneic stem cell transplantation and in healthy female donors. *Blood* 2004; 103:353-359.

Miklos DB, Kim HT, Miller KH, Guo L, Zorn E, Lee SJ, Hochberg EP, Wu CJ, Alyea EP, Cutler C, Ho V, Soiffer RJ, Antin JH and Ritz J. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigen correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood* 2005; 105:2973-2978.

Monti P, Scirpoli M, Maffi P, Ghidoli N, De Taddeo F, Bertuzzi F, Piemonti L, Falcone M, Secchi A, Bonifacio E. Islet transplantation in patients with autoimmune diabetes induces homeostatic cytokines that expand autoreactive memory T cells. *J Clin Invest* 2008; 118(5):1806-1814.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt1:263-273.

Murata M, Warren EH and Riddell SR. A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion. *J Exp Med* 2003; 197(10):1279-1289.

Nadeau G, Bellemare J, Audet-Walsh E, Flageole C, Huang SP, Bao BY, Douville P, Caron P, Fradet Y, Lacombe L, Guillemette C and Levesque E. Deletions of the androgen-metabolizing UGT2B genes have an effect on circulating steroid levels and biochemical recurrence after radical prostatectomy in localized prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(9):E1550-1557.

Naito M, Goto Y, Ishida Y, Nishio K, Kawai S and Hamajima N. Alternative genotyping method of GSTT1 null/present polymorphism. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6:873-877.

Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemøller SL, Lamberth K, Buus S, Brunak S and Lund O. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci* 2003; 12:1007-1017.

Okazaki K, Uchida K, Koyabu M, Miyoshi H, Takaoka M. Recent advances in the concept and diagnosis of autoimmune pancreatitis and IgG4-related disease. *J Gastroenterol* 2011; 46(3):277-288.

Patel R and Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Eng J Med* 1969; 280:735-739.

Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B and Taylor JB. Human Glutathione-S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994; 300:271-276.

Peters B and Sette A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC Bioinformatics* 2005; 6:132.

Pita-López ML, Pera A, Solana R. Adaptive Memory of Human NK-like CD8⁺ T-Cells to Aging, and Viral and Tumor Antigens. *Front Immunol* 2016; 7:616.

Potter MR, Moore M. Human mixed lymphocyte culture using separated lymphocyte populations. *Immunology* 1997; 32(3):359-365.

Randhawa P. T-cell-mediated rejection of the kidney in the era of donor-specific antibodies: diagnostic challenges and clinical significance. *Curr Opin Organ Transplant* 2015; 20(3):325-332.

Randolph SS, Gooley TA, Warren EH, Appelbaum FR and Riddell SR. Female donors contribute to a selective graft-versus leukemia in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 2004; 103:347-352.

Rodríguez-Mahou M, Salcedo M, Fernández-Cruz E, Tiscar JL, Bañares R, Clemente G, Vicario JL, Alvarez E, Rodríguez-Sainz C. Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with GSTT1 null genotype as prognostic marker: long-term follow-up after liver transplantation. *Transplantation* 2007; 83:1126-1129.

Roque-Cuellar MC, Sánchez B, García-Lozano JR, Praena-Fernández JM, Núñez-Roldán A, Aguilar-Reina J. Cellular immune responses and occult infection in seronegative heterosexual partners of chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat* 2011; 18(10):e541-e549.

Salcedo M, Vaquero J, Bañares R, Rodríguez-Mahou M, Alvarez E, Vicario JL, Hernández-Albújar A, Tiscar JL, Rincón D, Alonso S, De Diego A, Clemente G. Response to steroids in de novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35:349-356.

Scornik JV, Zander DS, Baz MA, Donnelly WH and Staples ED. Susceptibility of lung transplants to preformed donor-specific HLA antibodies as detected by flow cytometry. *Transplantation* 1999; 68:1542-1546.

Sidney J, Assarsson E, Moore C, Ngo S, Pinilla C, Sette A and Peters B. Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. *Immunome* 2008; Res 4:2.

Simpson E, Scott D, James E, Lombardi G, Cwynarski K, Dazzi F, Millrain M and Dyson PJ. Minor H antigens: genes and peptides. *Transpl Immunol* 2002; 10(2-3):115-123.

Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlfing T, Scott K, Schultz B, Strong C, TinWollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S and Page DC. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003; 423:825-837.

Spierings E, Brickner AG, Caldwell JA, Zegveld S, Tatsis N, Blokland E, Pool J, Pierce RA, Mollah S, Shabanowitz J, Eisenlohr LC, van Veelen P, Ossendorp F, Hunt DF, Goulmy E, Engelhard VH. The minor histocompatibility antigen HA-3 arises from differential proteasome-mediated cleavage of the lymphoid blast crisis (Lbc) oncoprotein. *Blood* 2003; 102(2):621-629.

Stoeger Z, Asher I, Rosenberg-Bezalel S and Mahlab-Guri K. Immunoglobulin G4 and related diseases. *Isr Med Assoc J* 2012; 14(10):642-645.

Steers NJ, Li Y, Drace Z, D'Addario JA, Fischman C, Liu L, Xu K, Na YJ, Neugut YD, Zhang JY, Sterken R, Balderes O, Bradbury D, Ozturk N, Ozay F, Goswami S, Mehl K, Wold J, Jelloul FZ, Rohanizadegan M, Gillies CE, Vasilescu EM, Vlad G, Ko YA, Mohan S, Radhakrishnan J, Cohen DJ, Ratner LE, Scolari F, Susztak K, Sampson MG, Deaglio S, Caliskan Y, Barasch J, Courtney AE, Maxwell AP, McKnight AJ, Ionita-Laza I, Bakker SJL, Snieder H, de Borst MH, D'Agati V, Amoroso A, Gharavi AG, Kiryluk K. Genomic Mismatch at *LIMS1* Locus and Kidney Allograft Rejection. *N Engl J Med* 2019; 380(20):1918-1928.

Stiers NJ, Li Y, Drace Z, et al. Genomic mismatch at LIMS1 locus and kidney allograft rejection. *N Engl J Med*; 380:1918-28.

Strober S, Dejbachsh-Jones S, Van Vlasselaer P, Duwe G, Salimi S, and Allison JP. Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8- surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor. *J Immunol* 1989; 143(4):1118-1122.

Su Y, Huang X, Wang S, Min WP, Yin Z, Jevnikar AM, Zhang ZX. Double negative Treg cells promote nonmyeloablative bone marrow chimerism by inducing T-cell clonal deletion and suppressing NK cell function. *Eur J Immunol* 2012; 42(5):1216-1225.

Su Y, Jevnikar AM, Huang X, Lian D, Zhang ZX. Spi6 protects alloreactive CD4(+) but not CD8 (+) memory T cell from granzyme B attack by double-negative T regulatory cell. *Am J Transplant* 2014; 14(3):580-593.

Tarazona R, De la Rosa O, Corona A, Ostos B, Espejo J, Peña J, Solana R. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector: senescent T cells. *Mech Ageing Dev* 2000; 121(1-3):77-88.

Teng D, Li C, Teng Y, Ouyang Y, Li Y and Teng W. Dynamic changes of IgG subtypes of thyroid peroxidase antibody in patients with postpartum thyroiditis. *Gynecol Obstet Invest* 2010; 69(1):24-92.

Terakura S, Murata M, Warren EH, Sette A, Sidney J, Naoe T, Riddell SR. A single minor histocompatibility antigen encoded by UGT2B17 and presented by human leukocyte antigen-A*2902 and -B*4403. *Transplantation* 2007; 83:1242-1248.

Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3:665-673.

Terasaki PI and Cai J. Humoral theory transplantation: further evidence. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:541-545.

Tian Y, Babor M, Lane J, Schulten V, Patil VS, Seumois G, Rosales SL, Fu Z, Picarda G, Burel J, Zapardiel-Gonzalo J, Tennekoon RN, De Silva AD, Premawansa S, Premawansa G, Wijewickrama A, Greenbaum JA, Vijayanand P, Weiskopf D, Sette A, Peters B. Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA. *Nat Commun* 2017; 8(1):1473.

Verma K, Ogonek J, Varanasi PR, Luther S, Bunting I, Thomay K, Behrens YL, Mischak-Weissinger E, Hambach L. Human CD8+ CD57- TEMRA cells: Too young to be called "old". *PLoS One* 2017; 12(5):e0177405.

Villani FN, Rocha MO, Nunes Mdo C, Antonelli LR, Magalhães LM, dos Santos JS, Gollob KJ, Dutra WO. Trypanosoma cruzi-induced activation of functionally distinct $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ CD4-CD8- T cells in individuals with polar forms of Chagas' disease. *Infect Immun* 2010; 78(10):4421-4430.

Vogt MH, van den Muijsenberg JW, Goulmy E, Spierings E, Kluck P, Kester MG, van Soest RA, Drijfhout JW, Willemze R, Falkenburg JH. The DBY gene codes for an HLA-DQ5-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in graft-versus-host disease. *Blood* 2002; 99:3027-3032.

Wang W, Meadows LM, den Haan JM, Sherman NE, Chen Y, Blokland E, Shabanowitz J, Agulnik AI, Hendrickson RC, Bishop TL et al. Human H-Y: a male specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein. *Science* 1995; 269:1588-1590.

Watschinger B and Pascual M. Capillary C4d deposition as a marker of humoral immunity in renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2420-2423.

Wermke M, Maiwald S, Schmelz R, Thiede C, Schetelig J, Ehninger G, Bornhäuser M and Wassmuth R. Genetic Variations of Interleukin-23R (1143A>G) and BPI (A645G), but Not of NOD2, Are Associated with Acute Graft-versus-Host Disease after Allogenic Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16(12):1718-1727.

Wichmann I, Aguilera I, Sousa JM, Bernardos A, Garcia Nuñez EJ, Vigil E, Magariño R, Magariño I, Torres A and Nuñez-Roldan A. Antibodies against Glutathione-S-transferase T1 in non solid organ transplanted patients. *Transfusion* 2006; 46:1505-1509.

Willinger T, Freeman T, Hasegawa H, McMichael AJ, Callan MF. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *J Immunol* 2005; 175(9):5895-5903.

Zhang ZJ, Hao K, Shi R, Zhao G, Jiang GX, Song Y, Xu X and Ma J. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and glutathione S-transferase T1 (GSTT1) null polymorphisms, smoking, and their interaction in oral cancer: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2011; 173(8):847-857.

Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 2000; 6(7):782-789.

Zhang ZX, Ma Y, Wang H, Arp J, Jiang J, Huang X, He KM, Garcia B, Madrenas J, Zhong R. Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway. *J Immunol* 2006; 177(10):6920-6929.

Zhao X, Sun G, Sun X, Tian D, Liu K, Liu T, Cong M, Xu H, Li X, Shi W, Tian Y, Yao J, Guo H, Zhang D. A novel differentiation pathway from CD4⁺ T cells to CD4⁻ T cells for maintaining immune system homeostasis. *Cell Death Dis* 2016; 7:e2193.

ANEXO

IgG subclass profile among anti-Glutathione S-transferase T1 antibodies in post-transplant *de novo* immune hepatitis.

Aguilera I, Martínez Bravo MJ, Sousa JM, Pozo-Borrego AJ, Núñez-Roldán A. Clinical Transplantation. 2016; 30(3):210-217.

IgG subclass profile among anti-Glutathione S-transferase T1 antibodies in post-transplant de novo immune hepatitis

Aguilera I, Martinez-Bravo MJ, Sousa JM, Pozo-Borrego AJ, Nunez--Roldan A. IgG subclass profile among anti-Glutathione S-transferase T1 antibodies in post-transplant de novo immune hepatitis.

Abstract: Although the pathogenic pathways leading to de novo immune hepatitis (IH) are not completely understood, we have shown strong evidences of an antidonor response against Glutathione S-transferase T1 (GSTT1), an antigen exclusively expressed in the donor liver. The first sign of this process is the production of GSTT1 antibodies that, in 25% of the cases, will precede de novo IH. Because the presence of the antibodies is not sufficient to trigger the disease, we aimed to study GSTT1 IgG subclasses in a group of 18 liver transplant patients, 12 that developed de novo IH and 6 that remained free of disease. Surprisingly, the predominant subclasses were IgG1-GSTT1 and IgG4-GSTT1. The presence of IgG4-expressing plasma cells was also investigated in 10 available liver biopsies. Six biopsies coinciding with diagnosis showed a mean value of 32.8 IgG4+ plasma cells/hpf vs. 5.55 in patients without the disease. We have not found a distinctive GSTT1-IgG profile in patients with de novo IH, but the ratio IgG1-GSTT1/IgG4-GSTT1 in samples from close to the time of diagnosis seemed to be important. The novel finding of abundant IgG4-GSTT1 in liver transplantation is intriguing, but their possible role in pathogenesis of de novo IH remains unknown.

Isabel Aguilera^a,
Maria Jose Martinez-Bravo^a,
Jose Manuel Sousa^b,
Antonio Jesus Pozo-Borrego^a and
Antonio Nunez--Roldan^a

^aDepartment of Immunology, and ^bDigestive Diseases Service, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)/Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

Key words: donor-specific immune response – GSTT1 mismatch – IgG4-related diseases – liver allograft rejection

Corresponding author: Isabel Aguilera, PhD, Immunology, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Avda. Manuel Siurot s/n, 41013, Seville, Spain.
Tel.: +34 955923120; fax: +34 955013221;
e-mail: iaguilera-ibis@us.es

Conflict of interest: None.

Accepted for publication 1 December 2015

De novo autoimmune hepatitis (AIH), also known as plasma cell hepatitis, is a post-transplant pathological condition that was initially called “autoimmune” or “autoimmune-like” hepatitis due to similarities with classical AIH (1). Diagnostic criteria for de novo AIH include portal lympho-cytic inflammation with predominance of plasma cells, interface hepatitis, elevated immunoglobulin G, presence of antibodies, and a good response to steroid treatment. Still, the term “autoimmune” remains controversial because the immune response is directed against the graft. Diagnosis of de novo AIH is a challenge due to the similarities of some histological features, common to different post-transplant pathologies. Our group found that all the patients diagnosed in our hospital during the past 15 yr shared IgG antibodies that were identified as anti-GSTT1, a protein expressed exclusively in the graft (2). This situation occurs only when a recipient with the GSTT1 null pheno-

type receives a liver from a donor with one or two functional copies of the gene. In 25% of the transplants carrying the donor/recipient mismatch, the presence of GSTT1 antibodies is associated with what we called de novo immune hepatitis (IH)

(3). The clinical relevance of the GSTT1 system has been firmly established but, although anti-GSTT1 antibodies always preceded progression to the disease, this condition is not sufficient to trigger de novo IH. The initial immunosuppression treatment has proved to be very important with tacrolimus plus MMF acting as protective agents when compared with CyA plus MMF, reducing the probability of both events, namely antibody production and progression to the disease (4). Besides these facts, there are still many aspects that remain to be explored. It has been much discussion about the pathogenic role of complement fixing antibodies; therefore, a major question was to clarify whether GSTT1-specific antibodies

associated with de novo IH belonged to a particular IgG subclass.

Patients and methods

Patients

A group of 18 LT patients of Caucasian origin with the GSTT1 mismatch (positive donor/null recipient) and long follow-up (2–18 yr) were included in the study due to their condition of anti-GSTT1 antibodies producers. Twelve of them had been diagnosed with de novo IH (patients 1–12) and 6 had been not (patients 13–18). Histological diagnosis of de novo IH was based on the following: mononuclear cell infiltrates in the portal areas with abundance of plasma cells, piecemeal necrosis, interface hepatitis, and hepa-tocyte rosette formation. In our hospital, diagno-sis also relies on the assessment of GSTT1 donor/recipient mismatch, detection of specific GSTT1 antibodies, and a good response to ster-oid treatment.

Demographic and clinical characteristics are detailed in Table 1. Informed consent in writing was obtained from each patient, and study proto-col was conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the appropriate institutional review committee.

Detection of anti-GSTT1 antibodies

To detect and quantify the titer of antibodies in serum samples, we performed a commercially available ELISA test that contains the human GSTT1 recombinant protein and uses an anti-human IgG secondary ab (Biomedal, Seville, Spain). Furthermore, to distinguish IgG isotypes we used the same ELISA assay but replacing the secondary antibody by four secondary mouse monoclonal anti-human antibodies recognizing IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 (Abcam, Cambridge, UK) at 1:200 dilutions. All the samples from each patient were processed together in the ELISA assay so that changes in ab-titers could be

Table 1. Baseline characteristics of the patients, immunosuppression and biopsy studies

Patient	Gender	Age at LT	LT Date	Original disease	Baseline IS	Biopsy dnIH diagnosis (months)	Biopsy IgG4-study (months)	Mean IgG4 + cells/hpf
1	F	67	10-04-12	HCV cirrhosis	CYA, MMF, ST	8*	8*	19
2	F	49	21-09-96	HCV cirrhosis	CYA ^N , AZA, ST. MMF for AZA	12	na	
3	M	53	10-12-96	HCV cirrhosis	CYA ^N	–	–	
4	F	29	16-05-98	Ebrotidine toxicity	CYA ^N , AZA, ST. Conversion to TAC, MMF	21	na	
5	F	60	11-11-98	HCV cirrhosis	CYA ^N , ST	12*	12*	1.6
6	M	46	06-05-99	Alcohol cirrhosis	CYA ^N , ST	–	–	
7	F	47	02-07-00	HCV cirrhosis	CYA ^N , ST, BAS	24	19 (chronic hepatitis)	27
8	M	46	02-11-01	HCV cirrhosis + alcohol	CYA ^N , ST, BAS	35*	35*	0
9	F	50	18-09-03	Alcohol cirrhosis	CYA, MMF, ST	21	10 (acute rejection)	13.3
10	F	58	02-09-04	HCV cirrhosis	CYA, MMF, ST	–	57 (late dnIH detection)	18
11	F	46	07-05-07	Cirrhosis probably autoimmune	CYA, MMF, ST	32*	32*	6.8
12	F	68	27-03-09	Primary biliary cirrhosis	CYA, MMF	12*	12*	142.5
13	M	52	08-04-01	HBV cirrhosis	CYA ^N , MMF, ST	–	–	
14	F	62	18-11-06	Secondary biliary cirrhosis	CYA ^N , MMF, ST	–	–	
15	M	52	13-12-02	Alcohol cirrhosis	CYA, ST	–	50 (non-ductopenic rejection)	8.3
16	M	38	23-11-96	HBV cirrhosis	CYA ^N , MMF, ST	–	–	
17	M	47	28-02-05	Chronic rejection (re-transplant)	TAC, MMF, ST	–	12 (chronic ductopenic rejection)	2.8
18	F	16	03-06-96	Agenesis of the bile ducts	CYA, ST	–	–	

CYA, cyclosporine A; CYA^N, Neoral; TAC, tacrolimus; ST, steroids; MMF, mycophenolate mofetil; AZA, azathioprine; BAS, basiliximab. *The same biopsy was used for de novo IH diagnosis and for the IgG4 immunohistochemistry study. na, non-available.

Table 2. IgG subclass profile of anti-GSTT1 abs in samples from patients with de novo IH (1–12) and without de novo IH (13–18). The ratio of IgG1/IgG4 at the time of diagnosis when samples were available is also shown. *Patient that developed de novo IH within the first year

Patient	Sample (Years post-Tx)	Anti-GSTT1 antibody IgG subclass (ELISA Units)				Ratio (diagnosis) IgG1/IgG4
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	
1	5 months*	0.361	0	0	0.36	
	7 months*	0.324	0	0	0.273	1.19
	12 months*	0.237	0	0	0	
2	1,5	2.369	0	0	0.978	2.42
	7,5	0.649	0	0	0.154	
	10	0.556	0	0	0	
3	7	0.133	0.082	0	0.252	
	10	0	0	0	0.249	
4	2	0.5	0	0	0.257	1.94
	6,5	1.31	0	0	1.506	
	8,5	0.072	0	0	0.222	
	9	0.456	0	0	0.643	
5	1	0.112	0.024	0.025	0	>1
	5,5	0.116	0	0	0	
	6,5	0.168	0	0	0	
6	4,5	0.236	0.456	0.242	0.593	
	6,5	0.163	0	0	0.551	
	8	0.333	0.18	0.13	0.713	
	10	0	0	0	0.924	
	12	0	0	0	0.875	
7	1,5	0.163	0	0	1.526	0.107
	4	0	0	0	1.204	
	5,5	0.254	0.298	0.147	1.235	
	8	0	0	0	1.118	
8	2,5	2.521	0	0.143	0	>1
	4	0.385	0	0	0	
	10	0.891	0	0	0	
	10,5	0.853	0	0	0	
9	1	2.387	0	0	0.605	
	2	0.575	0	0	0.28	2.05
	2,5	0.904	0.379	0	0.203	
10	4,5	0.111	0	0	0.136	
	5	0.117	0	0	0.209	
11	2,5	0.178	0	0	0.076	2.34
	4	0.208	0	0	0.083	
	5	0.223	0	0	0.171	
12	Pre-Tx	2.017	0.263	0.231	1.754	
	1	0.493	0.134	0.165	2.47	0.20
	2	0.263	0	0	1.309	
	3	1.935	0	0	3.095	
13	2	0.235	0	0	0.567	0.59
	3	0.183	0.153	0	0.524	0.35
	4	1.522	0	0	1.813	
	6	0	0	0	0.564	
	11	0.243	0	0	0.972	
	Pre-Tx	0	0	0.13	1.068	
14	1,5	0	0	0	0.897	
	2,5	0	0.067	0	0.316	
	5,5	0	0	0.1	0.553	
	2	0	0	0	0.168	
15	2,5	0	0	0	0.203	
	4	0	0.135	0	1.308	
	15	0.415	0	0	0.229	
17	3	0.124	0	0	0.28	0.44
	4	0.067	0	0	0.447	0.15
18	16	0.711	0	0	0.625	

Values of IgG1 and IgG4 subclasses have been highlighted in bold. Grey boxes indicate the predominant profile with presence of both subclasses or only one of them in the majority of the samples tested. The ratios in grey boxes correspond to samples of patients with the disease at the time of diagnosis.

compared. However, not all the patients were included in the same ELISA plate; therefore, the titers cannot be compared among them. These secondary antibodies have been used in previous studies with serum samples from hematopoietic stem-cell-transplanted patients, and they all work well in this ELISA assay.

Immunohistochemistry for IgG4-expressing plasma cell detection

Three-micrometer-thick sections of formalin-fixed, paraffin-embedded biopsy samples were deparaffinized and rehydrated. For antigen retrieval, slides were heated in a microwave for 20 min in a citrate buffer (10 mM citric acid and 0.05% Tween-20, pH 6.0), cooled, and rinsed in distilled water. Sections were processed with EnVision+System-HRP (DAB) following manufacturer's instructions (Dako North America Inc, CA, USA). Mouse monoclonal anti-human IgG4 antibodies (HP6025, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) were added at 1:500 dilution during 1 h at room temperature. Visualization of the immunoreaction was completed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as the peroxidase chromogenic substrate. The slides were then counterstained with hematoxylin and mounted with di-n-butyl phthalate in xylene (BHD Laboratories, Poole, UK).

Results

Characteristics of the patients

Eighteen patients with the GSTT1 mismatch (donor+/recipient-) were selected due to their condition of GSTT1 antibody producers. Twelve of them had been diagnosed with de novo IH (patients 1–12, Table 1) and six had been not (patients 13–18, Table 1). Initial immunosuppression consisted of cyclosporine A (Sandimmune or Neoral)—except for patient 17 that had tacrolimus instead—steroids and either azathioprine or mofetil mycophenolate. Biopsy findings were important for differential diagnosis of de novo IH, but histological signs were frequently not distinctive enough and, in our hospital, the ultimate diagnosis relied on the assessment of GSTT1 donor/recipient mismatch, detection of specific GSTT1 antibodies, and a good response to steroid treatment. Most of the 12 patients with GSTT1 antibody-associated hepatitis (de novo IH) were diagnosed between the first and the second year post-transplant; mean 19.7 months (8–35). Patients 3, 6, and 10 have been excluded from this estimate because the real time of onset was not known due to lack of medical

records or availability of earlier biopsy/serum samples (Table 1).

IgG subclass characterization of Glutathione S-transferase T1 antibodies

Distribution of the IgG-GSTT1 antibody subclasses is shown in Table 2. Fifty-six serum samples from 18 patients were retrospectively studied. The predominant subtypes were IgG1-GSTT1 and IgG4-GSTT1, although traces of other subclasses were also found. Apparently, there were not obvious differences in the subclass repertoire between the group of patients diagnosed with de novo IH and those that did not develop the disease. Serum IgG-GSTT1 antibody subclasses change over time and eventually disappear as it happened with IgG1-GSTT1 in patients 3, 6, and 7, or IgG4-GSTT1 in patients 1 and 2 (Table 2, Fig. 1). A third situation was observed in which only one subclass could be detected in all the samples of the same patient; for instance, patients 5 and 8 only had IgG1-GSTT1 or patients 14 and 15 with only IgG4-GSTT1 (Table 2, Fig. 1). The fact that patients 12 and 14 (both females) displayed high titers of antibodies in their pre-transplant serum samples can be explained by sensitizing events such as transfusions and pregnancies (5).

IgG1-GSTT1/IgG4-GSTT1 ratio at diagnosis of de novo IH

Considering that the first symptoms of de novo IH usually appear within the first 2 yr after the transplant and occasionally during the third year but never beyond that date, we aimed to analyze the IgG1-GSTT1/IgG4-GSTT1 ratio in serum samples from close to the time of diagnostic biopsies or at comparable time points in the patients without the disease. Those patients whose early post-transplant serum samples were not available (3, 6, 10, 16, and 18) were excluded from the analysis. Serum IgG1-GSTT1 was higher than IgG4-GSTT1 at the time of diagnosis in 7 of 9 patients (Fig. 2). When we looked at the ratio in the non-diagnosed group of patients, we observed that serum IgG1-GSTT1 level was never higher than IgG4-GSTT1 in comparable early post-transplant samples (Fig. 2).

IgG4-expressing plasma cells in liver biopsy

Immunohistochemistry studies were performed in 10 available biopsies, 5 of them coinciding with de novo IH diagnosis. Biopsies from patients with de novo IH showed significantly higher number of IgG4-expressing plasma cells than those without

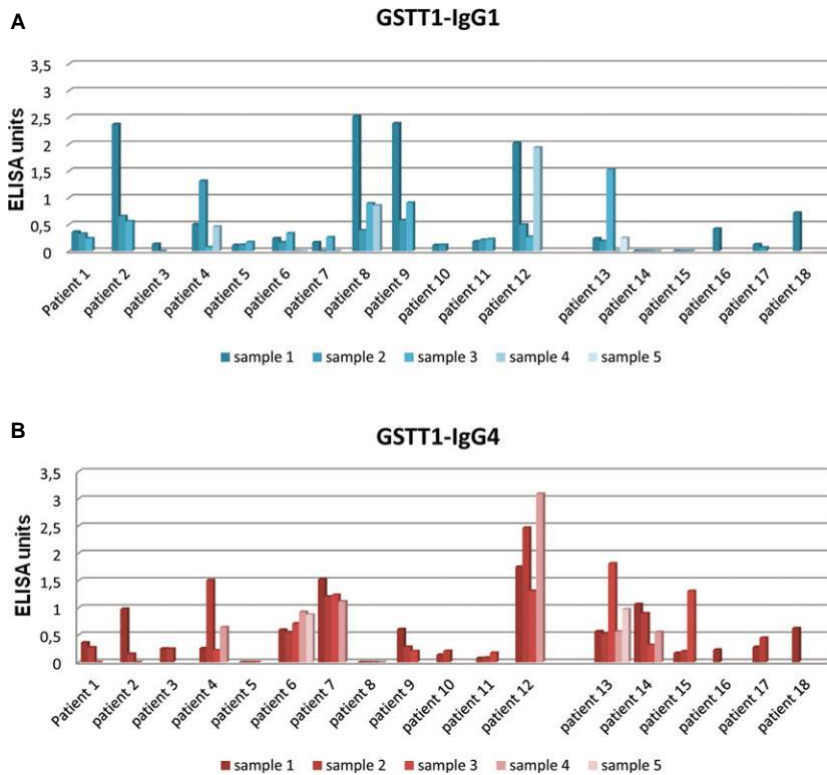


Fig. 1. Anti-GSTT1 ab levels of the IgG1 (A) and IgG4 (B) subclasses in serum samples of 18 patients included in this study: 1–12 with de novo IH and 13–18 without de novo IH. Samples of the same patient have been processed together in the same ELISA assay so that changes in ab-titers can be compared. Presence but not titer of anti-GSTT1 ab is important for diagnosis.

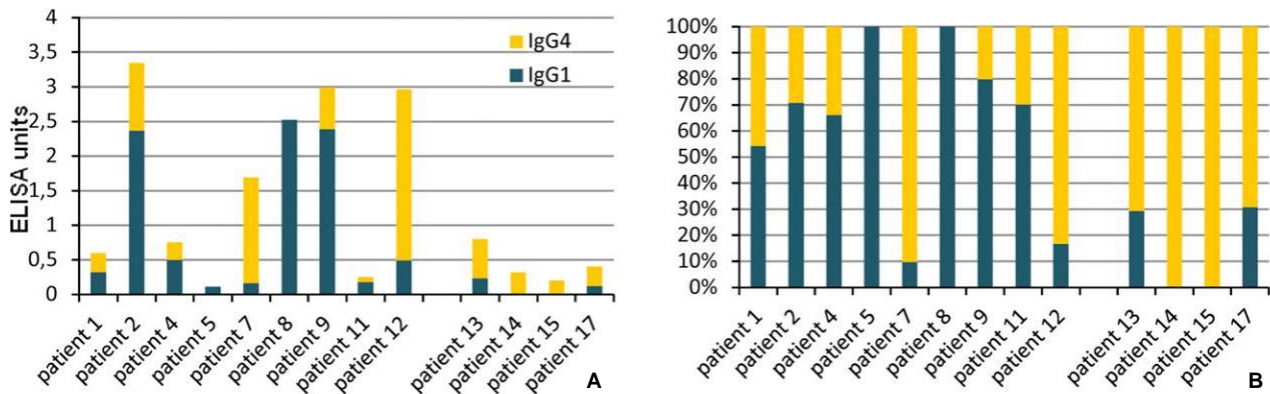


Fig. 2. (A) Anti-GSTT1 IgG subclass profile at the time of diagnosis in nine patients with de novo IH and similar time point samples in patients who did not develop the disease. (B) Percentages of IgG1 and IgG4 are shown. In general, the patients with de novo IH have IgG1 as the major subclass with the exception of patients 7 and 12 whereas among the non-diagnosed patients, IgG4 is the most abundant subclass. Note that patients 3, 6, 10, 16 and 18 are not included in this graphic due to the fact that de novo IH is diagnosed within the first 3 yr and the first samples from these patients were obtained later than 4.5 yr post-transplant.

the disease (mean 28.52 vs. 5.55 cells/hpf), although there was one IgG4 negative biopsy and one with very low number of IgG4 + cells/hpf among the patients with the disease (patients 5 and 8, respectively). This result is consistent with the absence of IgG4-GSTT1 in serum samples extracted around the same time (Table 2).

Representative immunostaining of biopsies from 4 patients with de novo IH is shown in Fig. 3. Two of them are diagnostic biopsies

(patients 1 and 12), a third one was obtained 5 months prior to de novo IH and was informed as chronic hepatitis (patient 7) and the last one corresponds to an acute rejection episode, 11 months before de novo IH diagnosis (patient 9). The results show different degrees of IgG4-positive cells, which are detailed in Table 1. The mean values vary from 1.6 to 142.5 IgG4 + cells/hpf in the portal areas. Two additional biopsies from patients with the GSTT1 mismatch and

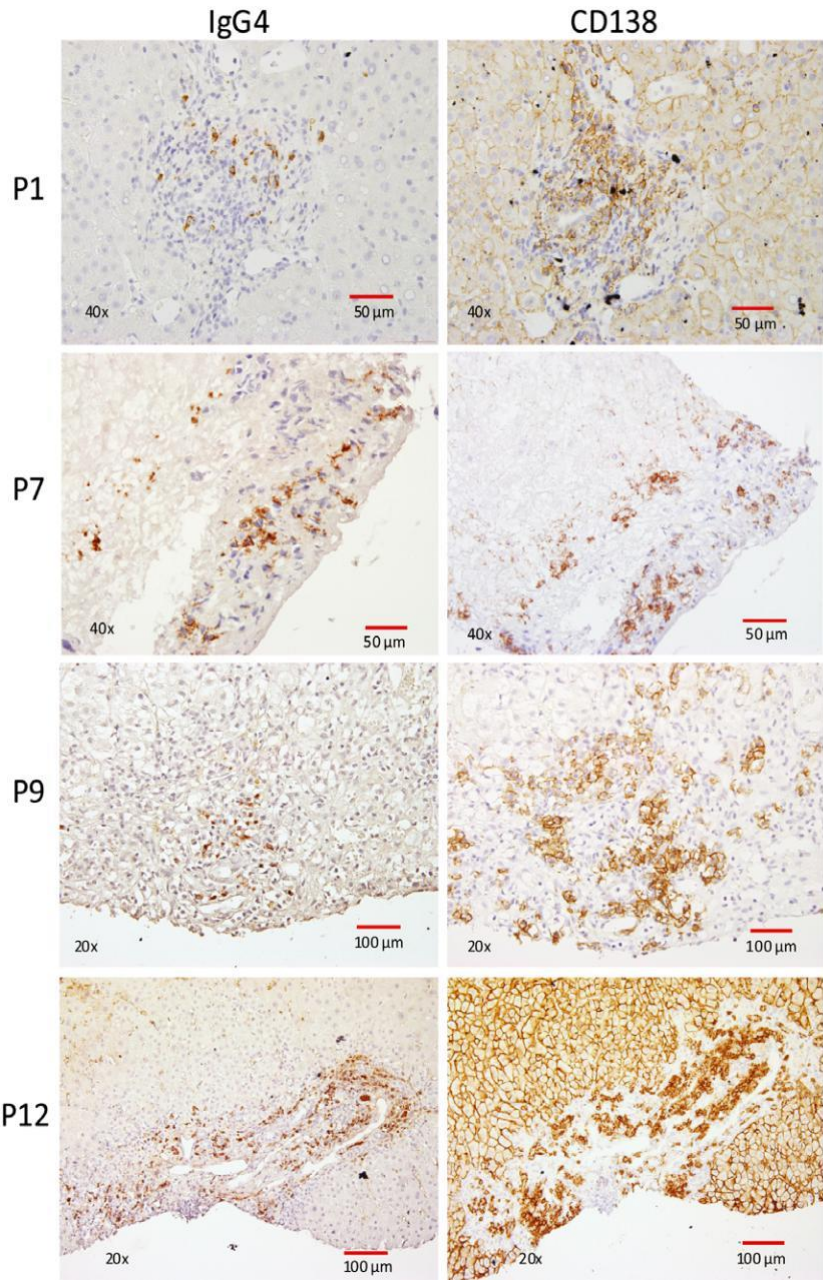


Fig. 3. On the left part of the figure IgG4-positive plasma cells in portal areas of liver biopsies in patients with de novo IH: P1 and P12 are diagnostic biopsies; P7 was informed as chronic hepatitis 5 months prior to de novo IH diagnosis; P9 corresponds to an acute rejection episode 10 months after the transplant and 11 months before de novo IH. On the right part of the figure, the same biopsies stained with CD138. In P12 the membrane of the hepatocytes (CD138 is also expressed in normal hepatocytes) is also stained. In all the cases CD138+ plasma cells were abundant in the portal areas.

GSTT1 antibodies but with a diagnosis of chronic rejection were also tested. Patients 15 and 17 had mean values of 8.3 and 2.8 IgG4 + cells/hpf in the portal areas (not shown). Immunologic staining for plasma cells with CD138 showed massive plasma cell infiltration in all the biopsies analyzed except one.

Discussion

In the present study, we have analyzed the possible role of the IgG subclasses among specific GSTT1 antibodies in de novo IH. To clarify this issue, a group of 18 patients was studied, 12 with a

diagnosis of de novo IH and 6 that did not develop the disease. We found that IgG1-GSTT1 and IgG4-GSTT1 were basically the only subclasses represented in all the patients, regardless of de novo IH status, while the other subclasses were practically absent. Contrary to our expectations, there were no obvious differences in the subclass repertoire between de novo IH and non-de novo IH patients, but there was one disparity in the proportion of IgG1-GSTT1/IgG4-GSTT1 at the time of diagnosis with higher levels of IgG1 in seven of the patients diagnosed with de novo IH as opposed to none in the non-diagnosed patients. A similar situation has been already described in patients with

antithyroid peroxidase (TPO) antibodies that developed chronic thyroiditis or hypothyroidism, both with higher levels of anti-TPO IgG1 (6, 7). IgG1 are complement fixing antibodies, and it was not surprising their possible involvement in a pathological process. However, the finding of IgG4-GSTT1 antibodies highly represented in most of the patients was completely unexpected and generated many questions about their role as donor-specific antibodies.

These results led us to investigate a possible relationship with IgG4-related diseases. Even though IgG4-GSTT1 are alloantibodies, *de novo* IH has many phenotypic similarities with an autoimmune process and, in general terms, IgG4-related diseases are considered autoimmune diseases. It was tempting to analyze similarities with other studies although the majority of them belong into the field of autoimmunity and much less is known in the context of transplantation. IgG4-related disease is a systemic inflammatory process characterized by a dense lymphoplasmacytic infiltrate with presence of IgG4-bearing plasma cells, storiform fibrosis, and frequent elevation of serum IgG4 levels. Two types of what was originally defined as “autoimmune pancreatitis” have now been recognized as two different entities, being type 1 a prototypical manifestation of IgG4-related disease (8, 9). IgG4 isotype is present in healthy human serum in 3–5% of the total IgG amount, does not fix complement, and is able to cross the placental barrier (10).

Although IgG4 has been considered during the past 15 yr a benign antibody with an anti-inflammatory role, this concept has been carefully reviewed and a large number of IgG4-related diseases have been reported in the literature (11, 12). In fact, there was a symposium held in Boston where international experts set up a consensus guideline for the diagnosis of IgG4-related diseases (13). In general, most of the publications refer to IgG4 as serum or tissue immunoglobulins with unknown antigen specificity, but there are other reports where antigen-specific IgG4 are described. In a pioneer report about endemic pemphigus foliaceus, deposition of IgG4 on skin lesions was observed and passive transfer of IgG4 against cell adhesion desmoglein from the patients to mice triggered the disease (14). ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif) antibodies are involved in thrombocytopenic purpura, with IgG4 followed by IgG1 subclasses leading the immune response (15). Perhaps, the most important evidence comes from a disorder called myasthenia gravis, in which 15% of the patients have anti-MuSK (muscle-specific kinase) antibodies mostly of the IgG4 subclass. Experiments in mice have revealed that MuSK IgG4

induce severe muscle weakness in the mice upon passive transfer of IgG4 but not IgG1-3 antibodies (16). In patients with MuSK, myasthenia gravis subclass switch from IgG4 to IgG1 was observed in a patient going into clinical remission (17).

In the transplant setting, very little is known about the role of IgG4-specific antibodies. In kidney transplantation, a recent study has shown that anti-endothelial cell antibodies of the IgG2 and IgG4 subclasses were enriched in patients with kidney rejection (18). Regarding liver transplantation, two reports have linked *de novo* AIH to serum IgG4 (19) and IgG4-positive cells in a subgroup of patients with a more aggressive form of PCH (20). The authors suggested that IgG4-positive PCH probably represents a disorder distinct from IgG4-negative PCH. We have a similar dichotomy in our group of GSTT1-associated *de novo* IH, in which the majority of patients are positive for IgG4-GSTT1, but two patients only display IgG1-GSTT1. The possibility that presence/absence of IgG4-GSTT1 antibodies might designate a clinical subgroup is intriguing, but we have not observed clear differences in disease severity or in patients' outcome. Prolonged exposure to an antigen is one of the causes leading to a persistent IgG4-restricted response. In this sense, the GSTT1 protein is constitutively expressed in the donor liver and will always be recognized as foreign by the recipient's immunological machinery. In fact, the treatment for *de novo* IH has to be maintained throughout life. This is to our knowledge the first description of antigen-specific IgG4 alloantibodies in liver transplantation, but the mechanisms leading to *de novo* IH are still unresolved. We have found that IgG1 has a strong presence among GSTT1 antibodies and might have a role in the initiation of the immune response. The finding of exceptionally high levels of IgG4 against a donor-specific antigen as the GSTT1 was completely unexpected and is very intriguing, but their possible role in *de novo* IH remains unknown.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy, Instituto de Salud Carlos III, grants 10/2332 and 11/ 857, and the Andalusian government, grants 07-CTS-02886 and PI-0332-2007 from which MJ Martinez was a predoctoral fellow. I Aguilera is a researcher from the Nicolas Monardes program.

Authors' contributions

Isabel Aguilera designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript. Maria Jose Martinez-Bravo and Antonio Jesus Pozo-Borrego performed the experiments and analyzed the data. Jose Manuel Sousa provided

samples, clinical records, and analyzed the data. Antonio Nunez~Roldan obtained funding and contributed to write the manuscript.

References

1. KERKAR N, HADZIC N, DAVIES ET et al. De-novo autoim-mune hepatitis after liver transplantation. *Lancet* 1998: 351: 409.
2. AGUILERA I, WICHMANN I, SOUSA JM et al. Antibodies against Glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with de novo immune hepatitis following liver transplantation. *Clin Exp Immunol* 2001: 126: 535.
- 3.A. GUILERA^{1,S} OUSA^{1,M,G} AVILAN^{1,F,B} ERNARDOS^{1,A,W} ICH-MANN^{1,L,N} UNEZ^{1,R} OLDAN¹
A. Choice of calcineurin inhibitor may
 mismatch constitutes a risk factor for de novo immune hepatitis after liver transplantation. *Liver Transpl* 2004: 10: 1166.
4. AGUILERA I, SOUSA JM, PRAENA JM, GOMEZ-BRAVO MA,
N UNEZ^R OLDAN^A
 influence the development of de novo immune hepatitis associated with anti-GSTT1 antibodies after liver transplantation. *Clin Transplant* 2011: 25: 207.
5. WICHMANN I, AGUILERA I, SOUSA JM et al. Antibod-ies against glutathione S-transferase T1 in non-solid organ transplanted patients. *Transfusion* 2006: 46: 1505.
6. SILVA LM, CHAVEZ J, CANALLI MH, ZANETTI CR. Determi-nation of IgG subclasses and avidity of antithyroid peroxi-dase antibodies in patients with subclinical hypothyroidism– a comparison with patients with overt hypothyroidism. *Horm Res* 2003: 59: 118.
7. TENG D, LI C, TENG Y, OUYANG Y, LI Y, TENG W. Dynamic changes of IgG subtypes of thyroid peroxidase antibody in patients with postpartum thyroiditis. *Gynecol Obstet Invest* 2010: 69: 24.
8. DESHPANDE V, GUPTA R, SAINANI N et al. Subclassification of autoimmune pancreatitis: a histologic classification with clinical significance. *Am J Surg Pathol* 2011: 35: 26.
9. OKAZAKI K, UCHIDA K, KOYABU M, MIYOSHI H, TAKAOKA M. Recent advances in the concept and diagnosis of autoimmune pancreatitis and IgG4-related disease. *J Gas-troenterol* 2011: 46: 277.

10. STHOEGER Z, ASHER I, ROSENBERG-BEZAEL S, MAHLAB-GURI K. Immunoglobulin G4 and related diseases. *Isr Med Assoc J* 2012: 14: 642.
11. STONE JH, ZEN Y, DESHPANDE V. IgG4-related disease. *N Engl J Med* 2012: 366: 539.
12. MAHAJAN VS, MATTOO H, DESHPANDE V, PILLAI SS, STONE JH. IgG4-related disease. *Annu Rev Pathol* 2014: 9: 315.
13. DESHPANDE V, ZEN Y, CHAN JKC et al. Consensus state-ment on the pathology of IgG4-related disease. *Mod Pathol* 2012: 25: 1181.
14. ROCK B, MARTINS CR, THEOFILOPOULOS AN et al. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pem-phigus foliaceus (fogo selvagem). *N Engl J Med* 1989: 320: 1463.
15. FERRARI S, MUDDÉ GC, RIEGER M, VEYRADIER A, KRE-MER-HOVINGA JA, SCHEIFLINGER F. IgG subclass distribu-tion of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2009: 7: 1703.
16. KLOOSTER R, PLOMP JJ, HUIJBERS MG et al. Muscle-speci-fic kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice. *Brain* 1081: 2012: 135.
17. PLOMP JJ, HUIJBERS MG, VAN DER MAAREL SM, VERSCHU-UREN JJ. Pathogenic IgG4 subclass autoantibodies in MuSK myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2012: 1275: 114.
18. JACKSON AM, LUCAS DP, MELANCON JK, DESAI NM. Clinical relevance and IgG subclass determination of non-HLA antibodies identified using endothelial cell precursors isolated from donor blood. *Transplantation* 2011: 92: 54.
19. ZHAO X, RAKHDA MI, WANG T, JIA J. Immunoglobulin G4-associated de novo autoimmune hepatitis after liver transplantation for chronic hepatitis B- and C-related cir-rhosis and hepatocellular carcinoma: a case report with lit-erature review. *Transplant Proc* 2013: 45: 824.
20. CASTILLO-RAMA M, SEBAGH M, SASATOMI E et al. “Plasma cell hepatitis” in liver allografts: identification and charac-terization of an IgG4-rich cohort. *Am J Transl Res* 2013: 13: 2966.