

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Inmunología, Oftalmología y
Otorrinolaringología



TESIS DOCTORAL

**Análisis de la respuesta inmune local y periférica en el
trasplante intestinal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Paloma Talayero Giménez de Azcárate

Directores

Estela Paz Artal
Esther Mancebo Sierra
Jorge Calvo Pulido

Madrid 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DPTO. DE INMUNOLOGÍA, OFTALMOLOGÍA Y ORL



TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE
LOCAL Y PERIFÉRICA EN EL
TRASPLANTE INTESTINAL**

Paloma Talayero Giménez de Azcárate
Madrid, 2018



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL

Doctorado en Investigación Biomédica (RD 99/2011)

Título de la Tesis

**Análisis de la respuesta inmune local
y periférica en el trasplante intestinal**

Tesis doctoral presentada por Paloma Talayero Giménez de Azcárate
para optar al grado de Doctora

Dirigida por Doctora Estela Paz Artal,
Doctora Esther Mancebo Sierra y Doctor Jorge Calvo Pulido

Doña **ESTELA PAZ ARTAL**, jefa del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario 12 de Octubre y profesora asociada en Ciencias de la Salud para el Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Doña **ESTHER MANCEBO SIERRA**, facultativo del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario 12 de Octubre y profesora asociada en Ciencias de la Salud para el Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Don **JORGE CALVO PULIDO**, facultativo del Servicio de Cirugía abdominal y trasplante de órganos abdominales del Hospital Universitario 12 de Octubre y profesor asociado en Ciencias de la Salud para el Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

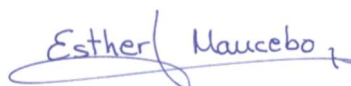
CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado **“Análisis de la respuesta inmune local y periférica en el trasplante intestinal”**, ha sido realizado por Doña Paloma Talayero Giménez de Azcárate, bajo nuestra dirección y asesoramiento, considerando que es apto para su defensa ante tribunal y reúne las condiciones exigibles para optar al grado de Doctora.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Madrid, 3 de septiembre 2018.



Dra. Estela Paz Artal



Dra. Esther Mancebo Sierra



Dr. Jorge Calvo Pulido

A los pacientes, verdadero motor y razón.

*“Todos tenemos un deber de amor que cumplir,
una historia que hacer,
una meta que alcanzar.”- Gioconda Belli*

AGRADECIMIENTOS

Que casi lo primero que se lea en una Tesis sean los agradecimientos (por el orden en el que aparecen y por el interés que suscitan) no es sino un símbolo del verdadero trabajo compartido que supone. Quizá es también donde, más allá del lenguaje científico, los doctorandos dejamos algo de esos “otros conocimientos” adquiridos durante este periodo: las vivencias, las luchas, las alegrías, la superación... Y es que, si algo he sacado en claro, es que esta Paloma no sería la misma a nivel profesional y personal sin las personas que la han acompañado a lo largo de estos años.

En primer lugar, quiero agradecer a los tres directores que han dirigido con tanto cariño y esfuerzo este trabajo. Gracias a Estela por la confianza depositada en mí al asignarme ese tema que tenías pendiente desde hacía tiempo. Gracias por decirme aquello de “si fuera fácil, lo haría todo el mundo”. Esa frase ha sido mi mantra cada vez que las cosas se han puesto complicadas. Gracias también por ser un ejemplo de trabajo y dedicación incansable, porque no exiges nada que no hayas dado primero. Gracias por supuesto a Esther. Mi hermana mayor. Porque después de 10 años sigo aprendiendo de ti cada día. Gracias por hacer que todo fluya y por entenderme casi sin palabras (la de tiempo que ahorra eso). Y gracias a Jorge por acogerme tan bien desde el primer día que fui en tu ayuda. Gracias por tu paciencia para explicarme todos esos términos quirúrgicos y médicos que como bióloga a veces se hacen bola y por aguantar mis persecuciones en busca de los datos clínicos. Pero gracias sobre todo por querer también aprender a cada segundo de lo que yo podía ofrecerte. Por tu esfuerzo para comprender todo el jaleo inmunológico y tu confianza para llevar lo aprendido a la práctica.

Gracias Eduardo por tu tutela durante estos años y por ayuda para entender los miles de documentos a presentar. Gracias también por sembrar en mí durante la carrera el amor por la inmunología (quién me iba a decir que acabaría trabajando también en inmunología de mucosas).

Gracias a los facultativos que me formasteis y con los que ahora trabajo codo con codo. A Pablo, por ser el primero en recibirme y por compartir con tanto cariño lo que sabes. A Mari Jose, por descubrirme el apasionante mundo del HLA y por ser siempre compañía en las tardes de experimentos. A Luis, por los líos de los LIEs y por confiarme el Canto (qué sería de esta Tesis sin él). Y a Antonio, por las aportaciones estadísticas y metodológicas que a veces se nos pasan por alto pero que son imprescindibles.

Gracias a mis compañeros de residencia. A Iván, por enseñarme tanto en tan poco tiempo y dejarme en herencia el negocio este de las tripitas. A Diana, por caminar a mi lado aun a día de hoy. A Sara, que siendo mi R pequeña me enseñaste como la mejor de las R mayores. A Ana, la ursulina jefa, por afrontar todo con tan buen humor. Y gracias especialmente a Elena y Raquel, que me adelantasteis por la derecha en esto de la Tesis. Sois un ejemplo increíble de trabajo duro, de humor del bueno y sin vosotras no sé cómo habría llegado a presentar todos los papeles.

Gracias también a los que habéis llegado más tarde y compartís conmigo el día a día. A Rocío, compañera de pelota, de quien aprendo en lo profesional y lo personal. A Alberto, por irte abriendo hueco (y no solo en la 7ª). A Mou, por ser genuinamente tú. A Óscar, por estar siempre y compartir tus cicatrices. A Elenita, mi joven discípula. Gracias por tu ilusión y tu

cariño. Gracias a las Lauras, por ser torrente de vitalidad (tan necesaria a veces). A Marcos, por enseñarme que hay que reírse de uno mismo. A Dani por tanta dulzura incluso en el dolor. A Ángel porque haces que ir a trabajar sea más sencillo. Y a los recién llegados, Javi y Alex, por contagiar vuestras ganas de aprender.

Gracias sin duda a los técnicos de Inmuno, base de nuestra formación. Gracias especialmente a los técnicos de HLA Elena, Juli, Jose Antonio y Pilar, por hacer posible una parte importante de este trabajo. Y a Isa y Ángeles por esa relación tan única que tenemos. Sabéis que os quiero mucho. Gracias también a Rosa y Paco. Sin vosotros el Servicio se caería.

No podían faltar en los agradecimientos Maribel y Manu. Gracias por preocuparos tanto por mí cada día. Porque son los pequeños detalles los que hacen grandes a las personas, y vosotros sois enormes.

Gracias a todo el personal de otros servicios que formáis también parte de todo esto. A los que os conozco mejor, a los que sois caras conocidas y a los que no conozco pero estáis ahí. Gracias a cirujanos, endoscopistas, gastroenterólogos, patólogos, enfermeras, auxiliares... Es bello que este trabajo implique a tantas personas dedicadas a otros. Gracias de manera especial a todos los coautores de los artículos y a la unidad de Bioinformática del CIB, que me acogió durante 4 meses y me descubrió un mundo increíble de pantallas en negro y letras blancas.

Gracias por supuesto a los pacientes. Como dice la dedicatoria sois la razón y el motor. Gracias por vuestra lucha y vuestra disponibilidad. Por confiar en nosotros para seguir avanzando

juntos.

Gracias también a todos los revisores que me lo habéis puesto difícil. Con cada negativa no solo habéis conseguido pulir y mejorar cada artículo, sino que me habéis enseñado el valor de la constancia y la perseverancia.

Gracias a quienes recorréis conmigo el camino paralelo de la Tesis. A los amigos croleros, que sois incondicionales en el tiempo y la distancia. A mis hermanos de AACCM, equilibrio y soporte. Y a Luismi y Joaquín, grandes compañeros durante y más allá de la carrera. Gracias también a los que hacéis crecer mi lado impar, compartiendo la pasión por el baile, el trapecio, los portés, el arte y la vida. Vosotros sois la locura que necesito para mantenerme cuerda. Gracias de manera especial a Bulent, por las correcciones finales del inglés. Y gracias infinitas a Carol, por apretarme, apoyarme, quererme y liberarme. Eres roca.

Gracias a mis pichones, porque nunca me habéis preguntado “¿y la tesis pa cuándo?” Gracias por vuestro apoyo silencioso y por sentir como propios mis logros. Gracias papá, por ser modelo de trabajo duro y por el orgullo con el que siempre me miras. Gracias Carlitos por compartir conmigo las dificultades de una Tesis. Gracias Marta por tu ejemplo profesional y las ayuditas en la UVI ;). Gracias mamá por inculcarme el valor de la auto-exigencia y sentar las bases de quien soy ahora.

Y gracias, gracias, gracias a Josito. Mi compañero de vida. Gracias por el tiempo robado (especialmente estas últimas vacaciones), por ser mi descanso y no presionarme, por la

admiración con la que hablas de mi trabajo. Gracias por tu amor incondicional que me sostiene y me alienta.

Seguro que me olvido de alguien, eso es bueno porque quiere decir que sois muchos los que tocáis mi vida. También a vosotros, gracias.

¡Ah! Y gracias a mi compañía telefónica por los 50 GB extras que me dio este verano y que me permitió acabar la Tesis entre Cambrils y Formentera ;)

ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| ABMR | rechazo agudo mediado por anticuerpos |
| ADH1C | subunidad gamma de la alcohol deshidrogenasa de clase I |
| AHR | receptor de aril hidrocarburos |
| APC | células presentadoras de antígeno |
| AT1R | receptor tipo 1 de angiotensina II |
| CMV | citomegalovirus |
| CRTH2 | receptor de prostaglandinas D ₂ |
| CYP4F2 | citocromo P450, familia 4, subfamilia F, polipéptido 2 |
| DC | células dendríticas |
| DEGs | genes diferencialmente expresados |
| DSA | anticuerpos donante-específicos |
| DSAdn | anticuerpos donante-específicos <i>de novo</i> |
| EICH | enfermedad de injerto contra huésped |
| FI | fracaso intestinal |
| GALT | tejido linfoide asociado al aparato digestivo |
| HLA | antígeno leucocitario humano |
| IBD | enfermedad inflamatoria intestinal |
| ICOS | ligando inducible co-estimulador |
| ID | intestino delgado |
| IEC | células epiteliales intestinales |
| ieILC1 | células linfoides innatas tipo 1 intraepiteliales |
| IEL | linfocitos intraepiteliales |
| IFN γ | interferón gamma |

| | |
|-------------------|---|
| Ig | inmunoglobulina |
| IG | intestino grueso |
| IL | interleuquina |
| ILC | células linfoides innatas |
| iNKT | linfocitos T naturales asesinos invariantes |
| IVIG | Inmunoglobulina G intravenosa |
| LB | linfocitos B |
| LP | lámina propia |
| LT | linfocitos T |
| LT $\alpha\beta$ | linfocitos T con TCR $\alpha\beta$ |
| LT $\gamma\delta$ | linfocitos T con TCR $\gamma\delta$ |
| MAdCAM-1 | molécula de adhesión celular adresina de mucosas 1 |
| MAIT | linfocitos T invariantes asociados a mucosas |
| MFI | intensidad media de fluorescencia |
| MICA | cadena A relacionada con MHC de clase I |
| MLN | nódulos linfáticos mesentéricos |
| MMF | micofenolato de mofetil |
| mTOR | diana de mamíferos de la rapamicina |
| NK | natural killer |
| NLR | receptores tipo NOD |
| NOD | dominio de oligomerización de unión a nucleótidos |
| OPTN | optineurina |
| PD1-L | ligando de muerte programada 1 |
| PDZK1 | factor 3 regulador del intercambiador sodio-hidrógeno |

| | |
|-----------------|--|
| postTx | post-trasplante |
| PP | placas de Peyer |
| preTx | pre-trasplante |
| PTLD | enfermedad linfoproliferativa post-trasplante |
| qPCR | reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa |
| REGIII γ | proteína regeneradora derivada de islotes III gamma |
| RNA-Seq | secuenciación masiva de RNA |
| ROR | receptor de ácido retinoico |
| SI | sistema inmune |
| SIC | síndrome de intestino corto |
| SIRP α | proteína reguladora de señal alfa |
| SLC39A4 | transportador de solutos de la familia 39, miembro 4 |
| STAT3 | transductor de señal y activador de la transcripción 3 |
| TCR | receptor de linfocitos T |
| TGF β 1 | factor de crecimiento transformante beta 1 |
| Th | linfocitos T cooperadores |
| THI | trasplante hepato-intestinal |
| TIA | trasplante intestinal aislado |
| TLR | receptores tipo Toll |
| TMV | trasplante multivisceral |
| TMVM | trasplante multivisceral modificado |
| TNF | factor de necrosis tumoral |
| TOS | trasplante de órgano sólido |
| Tregs | linfocitos T reguladores |

| | |
|------|--------------------------------------|
| TSLP | linfopoyetina tímica estromal |
| Txi | trasplante intestinal |
| VEB | virus de Epstein-Barr |
| VIH | virus de la inmunodeficiencia humana |

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| RESUMEN | 3 |
| SUMMARY | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| 1. EL TRASPLANTE INTESTINAL | 13 |
| 1.1. Fracaso intestinal e indicaciones del TxI | 13 |
| 1.2. Tipos de injerto en el TxI | 16 |
| 1.3. Complicaciones | 18 |
| 1.3.1. Rechazo | 18 |
| 1.3.2. Enfermedad de injerto contra huésped | 25 |
| 1.3.3. Enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (PTLD) | 26 |
| 1.3.4. Infecciones | 27 |
| 1.4. Inmunosupresión | 29 |
| 1.4.1. Terapias de inducción | 29 |
| 1.4.2. Terapias de mantenimiento | 30 |
| 1.4.3. Tratamiento del rechazo | 31 |
| 2. EL SISTEMA INMUNE INTESTINAL | 33 |
| 2.1. Células epiteliales | 34 |
| 2.2. Sitios inductores | 36 |
| 2.3. Sitios efectores | 37 |
| 2.3.1. Epitelio intestinal | 37 |
| 2.3.2. Lámina propia | 40 |
| 2.4. Alteraciones de las poblaciones linfoides en la mucosa intestinal | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 3. BIOMARCADORES EN EL TxI | 49 |
| 3.1. Citrulina plasmática | 51 |
| 3.2. Calprotectina fecal | 51 |
| 3.3. Anticuerpos anti-HLA | 52 |
| 3.4. Anticuerpos no anti-HLA | 56 |
| 3.5. Poblaciones linfocitarias | 56 |
| 3.6. Producción linfocitaria de ATP (Immuknow®) | 57 |
| 3.7. Marcadores moleculares | 57 |
| JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 61 |
| JUSTIFICACIÓN | 63 |
| HIPÓTESIS | 64 |
| OBJETIVOS GENERALES | 64 |
| CAPÍTULOS | 67 |
| Donor-specific antibodies in pediatric intestinal and multivisceral transplantation: the role of liver and HLA mismatching. | 69 |
| OBJETIVOS | 70 |
| CONCLUSIONES | 72 |
| PUBLICACIÓN | 73 |
| Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts. | 101 |
| OBJETIVOS | 102 |
| CONCLUSIONES | 103 |
| PUBLICACIÓN | 105 |
| 5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts. | 123 |

| | |
|---------------------|------------|
| OBJETIVOS | 124 |
| CONCLUSIONES | 126 |
| PUBLICACIÓN | 127 |
| DISCUSIÓN | 143 |
| CONCLUSIONES | 163 |
| BIBLIOGRAFÍA | 167 |
| ANEXOS | 197 |

RESUMEN

RESUMEN

Introducción. La monitorización de la integridad tisular y funcional del trasplante intestinal (TxI) se basa principalmente en el examen endoscópico e histológico del injerto; sin embargo, estos procedimientos no siempre son suficientes para identificar de forma precisa y temprana acontecimientos que ponen en riesgo su supervivencia. Por ello, resulta necesaria la búsqueda de biomarcadores, preferiblemente predictivos, así como la profundización en los mecanismos celulares y moleculares de los procesos de adaptación, tolerancia y rechazo.

El rechazo es uno de los mayores inconvenientes para la supervivencia del injerto. Muchos de los episodios son refractarios a los tratamientos que se centran en los mecanismos celulares del rechazo, lo que sugiere la existencia de un componente inmune humoral responsable también del daño del injerto. La identificación de esta respuesta humoral en el TxI resulta compleja, ya que no existe un consenso en los criterios histológicos diagnósticos al respecto. La presencia de anticuerpos anti-HLA donante específicos (DSA) en el receptor, que es otro de los criterios diagnósticos de rechazo humoral en muchos trasplantes de órgano sólido, viene siendo analizada en los últimos años en el TxI, si bien la experiencia en este campo sigue siendo limitada y muchos de los resultados son todavía controvertidos.

El estudio de la mucosa intestinal, y especialmente de las poblaciones de linfocitos intraepiteliales (IEL), constituye una herramienta para el diagnóstico y seguimiento de diversas patologías como la enfermedad celiaca. En el ámbito del TxI, la composición, función y evolución de las poblaciones de IEL resulta aún bastante desconocida, por lo que su estudio va a permitir entender la dinámica de repoblación celular y el equilibrio inmunológico del intestino trasplantado. También la identificación de cambios en estas células y su relación con eventos en el post-trasplante, puede convertirse en el desarrollo de biomarcadores diagnósticos o predictivos.

Las herramientas “-ómicas” moleculares se vienen empleando cada vez con más frecuencia para la identificación de patrones de expresión relacionados con rechazo, tolerancia o toxicidad farmacológica. Estos estudios persiguen la traslación al entorno clínico proponiendo la medición de un número reducido de genes para anticipar el evento y guiar la terapia.

Objetivo. El objetivo del presente trabajo es profundizar en la respuesta inmune humoral (análisis en la periferia) y celular (análisis local) subyacente al TxI y buscar nuevos biomarcadores que permitan una mejor monitorización del injerto.

Resultados. El análisis de la respuesta inmune humoral en una cohorte pediátrica de 43 trasplantes reveló importantes hallazgos respecto al papel y el impacto de los DSA en TxI. La presencia de DSA preformados se observó en el 11.6% de los receptores, siendo el retrasplante el principal factor de sensibilización (OR=44.9; p=0.001). Estos anticuerpos no correlacionaron sin embargo con una mayor tasa de rechazo o peor supervivencia del injerto, probablemente debido al uso de terapias de desensibilización peri-trasplante. El 16.3 % de los receptores desarrolló DSA *de novo* (DSAdn) que, mayoritariamente, resultaron dirigidos frente a antígenos HLA de clase II, poliespecíficos y con capacidad fijadora de complemento. Al contrario que los DSA preformados, los DSAdn sí mostraron tener un efecto deletéreo sobre la supervivencia del injerto (HR=66.5; p<0.001) y relación con el rechazo (HR=10.4; p=0.013) en un período observacional de 5 años. La inclusión del hígado constituyó el principal factor de protección frente a la aparición de DSAdn (OR= 0.07; p = 0.007), correlacionando también con una mejor supervivencia del injerto a los 5 años (HR = 0.21, p = 0.024). El análisis de la compatibilidad de HLA a nivel serológico y de epítomos con las herramientas computacionales HLAMatchmaker y PIRCHE no reveló ninguna asociación entre la incompatibilidad HLA y el desarrollo de DSAdn.

Para el estudio de la respuesta celular local se analizaron las diferentes poblaciones de IEL en 213 biopsias de 16 injertos intestinales de receptores adultos y de 32 biopsias de intestinos nativos sanos. Durante el primer año post-trasplante, los injertos mostraron una disminución de IEL totales ($p= 0.0014$) debida principalmente a la reducción de células $CD3^+ CD8^+$ en comparación con intestinos nativos. Por el contrario, los IEL $CD3^-$ aumentaron significativamente ($p<0.001$). La recuperación de IEL $CD3^+$ en los injertos fue paulatina y se equiparó a intestinos nativos al final del segundo año postrasplante. Los cambios en las subpoblaciones de IEL no correlacionaron con el diagnóstico histológico de rechazo ni con el tipo de trasplante (aislado vs multivisceral); sin embargo, los IEL $CD3^-$ fueron significativamente más elevados en los pacientes que recibieron corticosteroides en la terapia inmunosupresora. Esta población de IEL $CD3^-$ presentó unos rasgos fenotípicos y funcionales característicos de las células NK y de las células linfoides innatas (ILC) tipo 1 ($CD56^+$, $NKp44^+$, $CCR6^+$, $CD127^-$, capacidad citotóxica y secreción de $IFN\gamma$) así como de las ILC3 ($CD56^+$, $NKp44^+$, $CCR6^+$, $IL23R^+$, $ROR\gamma t$ y producción de $IL22$), y del fenotipo intermedio ILC1-ILC3 (síntesis simultánea de $IFN\gamma$ e $IL22$). Se concluyó por tanto que ILC1 e ILC3 son poblaciones celulares relativamente estables y resistentes a la terapia inmunosupresora, y compatibles, si no necesarias, con la supervivencia e integridad funcional del injerto intestinal a largo plazo.

Por último, se realizó un estudio de expresión génica en 60 biopsias obtenidas de 12 receptores adultos, de las cuales 50 correspondieron a una histología de “cambios mínimos”, y se clasificaron en estables (STA) o no estables (NSTA) según su proximidad a los eventos de rechazo. Mediante secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq), se hallaron 816 genes diferencialmente expresados entre biopsias STA ($n=11$) y NSTA ($n=7$), de los cuales un grupo de 5 genes ($ADH1C$, $SLC39A4$, $CYP4F2$, $OPTN$ and $PDZK1$) clasificaron correctamente todas las biopsias NSTA y 6 nuevas biopsias STA. La expresión de estos 5 genes obtenida mediante PCR

cuantitativa en un grupo de validación independiente de 26 biopsias permitió construir un modelo matemático de predicción que validó los resultados obtenidos con RNA-Seq. Dicho modelo resultó aplicable también a muestras con diagnósticos histológicos de indeterminado para rechazo y rechazo agudo, clasificando las biopsias como NSTA con un 85% de sensibilidad y un 69% de especificidad.

Conclusiones. En la búsqueda de nuevos biomarcadores para el seguimiento del TxI, la monitorización de los DSA pre y post-trasplante resulta fundamental, ya que sus efectos deletéreos pueden ser evitados mediante las terapias de desensibilización o la inclusión del hígado en los injertos. Los cambios en las diferentes poblaciones de IEL resultan indicativos de los procesos de acomodación y tolerancia de los injertos, si bien es necesaria una mayor profundización, especialmente en el papel de las ILC como reguladoras de la inflamación y la homeostasis intestinal. Finalmente, el conjunto de 5 genes identificados mediante herramientas moleculares y bioinformáticas emerge como un posible biomarcador pronóstico del daño del injerto, capaz de discriminar con antelación biopsias histológicamente indistinguibles.

SUMMARY

Background. The monitoring of tissular and functional integrity of intestinal transplantation (ITx) is mainly based on endoscopic and histological examination of the graft. However, these procedures are not always sufficient for an accurate and early identification of events that put their survival at risk. For this reason, it is necessary the search of biomarkers preferably predictive, as well as the deepening in the cellular and molecular mechanisms of adaptation, tolerance and rejection.

Rejection is one of the biggest drawbacks to graft survival. Many of the episodes are refractory to the treatments that focus on the cellular mechanisms of rejection, suggesting the existence of a humoral immune component also responsible for graft damage. The identification of this humoral response in the ITx is challenging, since there is no consensus on the histological diagnostic criteria in this regard. The presence of donor- specific anti-HLA antibodies (DSA) in the receptor, which is a diagnostic criterion for humoral rejection in many solid organ transplants, has been analyzed in the recent years in ITx, although the experience remains limited and some results are still controversial.

The study of intestinal mucosa, and especially the populations of intraepithelial lymphocytes (IEL), constitutes a tool for the diagnosis and follow-up of pathologies such as celiac disease. In the field of TxI, the composition, function and evolution of IEL populations are still quite unknown, so their study will allow understanding the dynamics of cellular repopulation and immunological balance of the transplanted intestinal mucosa. It will also allow the identification of changes in these cells and their relation with events in the post-transplant, with capability to become diagnostic or predictive biomarkers.

Molecular “-omics” tools are being used more and more frequently to identify expression patterns related to rejection, tolerance or pharmacological toxicity. These studies aim to be

translated to the clinical setting by proposing the measurement of a reduced number of genes to anticipate the event and guide the therapy.

Objective. The aim of the present work is to deepen in the humoral (analysis in periphery) and cellular (local analysis) immune response underlying the ITx and to search new biomarkers for improving graft monitoring.

Results. The analysis of the humoral immune response in a pediatric cohort of 43 transplants revealed important findings regarding the role and impact of DSA in ITx. The presence of preformed DSA was recorded in 11.6% of the recipients, with retransplantation being the main sensitization factor (OR=44.9, $p=0.001$). However, these antibodies did not correlate with a higher rejection rate or worse graft survival, probably due to the use of peri-transplant desensitization therapies. 16.3% of recipients developed *de novo* DSA (DSAdn), mostly directed against HLA class II, polyspecific and complement fixing. In contrast to preformed DSA, DSAdn showed deleterious effect on graft survival (HR=66.5; $p<0.001$) and rejection (HR=10.4; $p=0.013$) in an observational period of 5 years. The inclusion of the liver emerged as the main protective factor against DSAdn development (OR=0.07; $p=0.007$), correlating also with a better 5-years graft survival (HR=0.21; $p=0.024$). The analysis of HLA compatibility at serological and epitope level with the computational tools HLAMatchmaker and PIRCHE revealed no association between HLA mismatching and DSAdn development.

For the study of the cellular immune response, the different IEL populations were analyzed in 213 biopsies from 16 intestinal grafts in adult recipients and in 32 biopsies from healthy native intestines. During the first year post-transplantation, grafts exhibited a total IEL decrease ($p=0.0014$), due primarily to the reduction of CD3⁺ CD8⁺ cells, compared with native bowels. In contrast, the CD3⁻ IEL increased significantly ($p<0.001$). The recovery of CD3⁺ IEL in the grafts was gradual and was compared to native intestines at the end of the second year after

transplantation. Changes in IEL subsets did not correlate with histological diagnosis of rejection or graft type (isolated versus multivisceral). However, CD3⁻ IEL were significantly higher in patients receiving corticosteroids in their immunosuppressive therapy. This CD3⁻ IEL population showed phenotypic and functional features characteristic of NK cells and innate lymphoid cells (ILC) type 1 (CD56⁺, NKp44⁺, CCR6⁺, CD127⁻, cytotoxicity and IFN γ secretion), ILC3 (CD56⁺, NKp44⁺, CCR6⁺, IL23R⁺, ROR γ t and IL22 production), and intermediate ILC1-ILC3 phenotype (simultaneous synthesis of IFN γ and IL22). It was therefore concluded that ILC1 and ILC3 are relatively stable, resistant to immunosuppression cells, and compatible, if not necessary, with long-term survival and functional integrity of the intestinal graft.

Finally, a gene expression study was performed in 60 biopsies obtained from 12 adult recipients. Among these biopsies, 50 corresponded to "minimal changes" histology, and were classified as stable (STA) or unstable (NSTA) according to their proximity to rejection events. In a discovery set analyzed by massive RNA sequencing (RNA-Seq), 816 genes were differentially expressed in STA (n=11) vs NSTA (n=7) biopsies. A group of 5 genes (ADH1C, SLC39A4, CYP4F2, OPTN and PDZK1) correctly classified all NSTA biopsies from the discovery set and all STA biopsies from an independent set. The expression of these 5 genes obtained by quantitative PCR in an independent validation group of 26 biopsies, allowed to build a mathematical prediction model that validated the results obtained with RNA-Seq. This model was also applicable to samples with histological diagnoses of indeterminate for rejection and acute rejection, classifying the biopsies as NSTA with 85% sensitivity and 69% specificity.

Conclusions. In the search for new biomarkers for the follow-up of in ITx, the monitoring of preformed and DSAdn is essential, since their deleterious effects can be avoided by desensitization therapies or with liver-inclusive grafts. Changes in the different IEL populations are indicative of graft accommodation and tolerance processes, although further studies are

needed, especially to assess the role of ILCs as regulators of inflammation and intestinal homeostasis. Finally, the 5 genes set identified by molecular and bioinformatic tools emerges as a possible prognostic biomarker of graft damage, able to discriminate in advance biopsies histologically indistinguishable.

INTRODUCCIÓN

1. EL TRASPLANTE INTESTINAL

El trasplante intestinal (TxI) es el tratamiento de elección para pacientes con insuficiencia intestinal irreversible que presentan además complicaciones al tratamiento con nutrición parenteral. Los primeros trasplantes en humanos con éxito se realizaron a finales de 1980 (1), aunque no fue hasta la aparición del tacrolimus en la década de los 90 cuando se terminó por consolidar. A fecha de hoy y según los datos del Registro de Trasplante Intestinal (ITR) más de 3000 procedimientos se han llevado a cabo en el mundo desde 1985 (2, 3).

1.1. Fracaso intestinal e indicaciones del TxI

El fracaso intestinal (FI) se define como el estado de incapacidad para mantener el balance energético, de electrolitos, fluidos y micronutrientes que resulta tras una resección masiva por defectos congénitos, alteraciones de la motilidad o pérdida de la capacidad de absorción como consecuencia de otra enfermedad. EL FI se divide en tres tipos según la gravedad del mismo (4):

- Tipo 1: estado transitorio que se da habitualmente tras cirugía abdominal en el que se requiere un periodo breve de soporte nutricional de fácil manejo y revierte de manera completa sin secuelas.
- Tipo 2: sucede en el contexto de enfermedades graves y cirugías mayores en las que complicaciones como la sepsis, desequilibrios metabólicos o malnutrición requieren una nutrición especializada parenteral. Puede darse una recuperación completa o una progresión al tipo 3.
- Tipo 3: se considera un estado crónico de FI que requiere un soporte nutricional a largo plazo, habitualmente en forma de nutrición parenteral domiciliaria. Suele derivarse de

un FI de tipo 2, aunque también puede originarse por trastornos de la motilidad intestinal.

La causa más frecuente de FI en niños y adultos es el síndrome de intestino corto (SIC), que se define como la presencia de menos de 200 cm de intestino delgado, si bien en la práctica clínica son otros factores como la calidad del intestino remanente, la conservación y continuidad con el intestino grueso o la edad del paciente, los que van a determinar la funcionalidad (5, 6). Las principales causas de SIC en niños se deben a defectos congénitos como gastrosquisis, vólvulo, atresia intestinal y enterocolitis necrotizante, mientras que en los adultos predominan las causas quirúrgicas derivadas de isquemias mesentéricas, traumatismos, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y tumores desmoides. Otras causas de FI incluyen trastornos de la motilidad (principalmente enfermedad de Hirschsprung y pseudo-obstrucción intestinal) y síndromes de malabsorción (figura 1) (7-9).

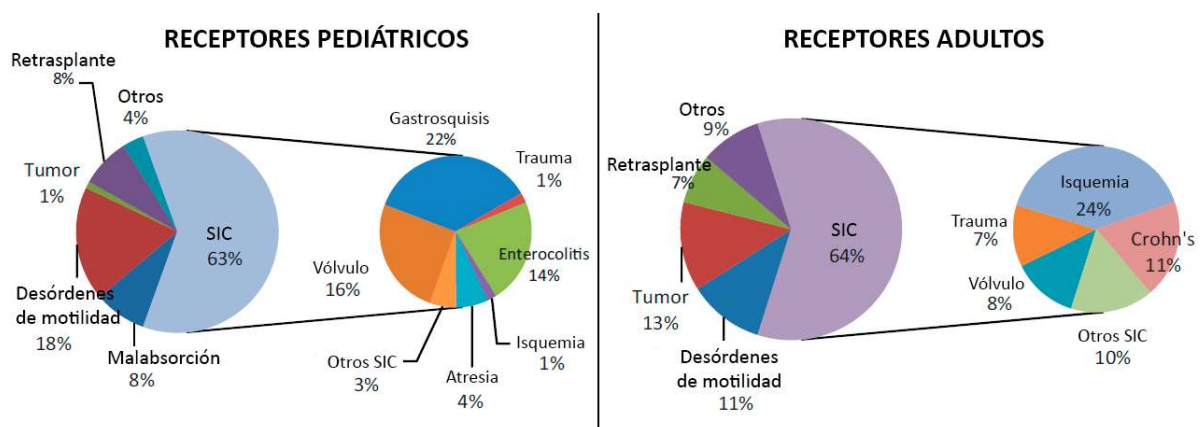


Figura 1. Causas de fracaso intestinal en receptores de TxI según datos del Registro Internacional (ITR). *Adaptada de Am J Transplant. 2015 Jan;15(1):210-9. (2)*

Tabla 1. Indicaciones del Txl. (9, 10)

Elevado riesgo de mortalidad por la enfermedad de base

- Tumores desmoides asociados a poliposis adenomatosa familiar
- Trombosis porto-mesentérica completa
- Defectos congénitos de la mucosa (atrofia microvellositaria y displasia intestinal)
- SIC con < 10 cm en niños y < 20 cm en adultos (SIC ultracorto).

FI con elevada morbilidad

- Hospitalización frecuente
- Dependencia de narcóticos
- Incapacidad funcional (ej: pseudo-obstrucción, elevado débito del estoma)

Complicaciones de la nutrición parenteral

- Baja aceptación de la nutrición parenteral a largo plazo (ej: pacientes jóvenes)
- Enfermedad hepática asociada (hiperbilirrubinemia, trombocitopenia, hipertensión portal, hepatoesplenomegalia, fibrosis hepática, cirrosis, esteatohepatitis, colestasis...)
- Pérdida de más del 50% de los accesos venosos centrales
- Episodios recurrentes de sepsis relacionadas con el catéter
- Episodios frecuentes de deshidratación grave
- Osteopenia

El manejo de los pacientes con FI, especialmente de aquellos con SIC, requiere una aproximación multimodal que incluye terapia nutricional, farmacológica y quirúrgica. La terapia nutricional abarca desde restricciones dietéticas y suplementación de micronutrientes a la nutrición parenteral en los casos más graves de FI. Este tipo de terapia se combina con la administración de fármacos antidiarreicos que eviten pérdidas masivas de líquidos y nutrientes. En cuanto a las opciones quirúrgicas, la reconstrucción autóloga mediante diversas técnicas posee unas indicaciones muy restrictivas, debe ser aplicada de manera

individualizada en cada paciente y tiene una discreta y relativa eficacia funcional, asociándose además a una morbilidad elevada. Por ello, el TxI es considerado en la actualidad la opción quirúrgica más o menos definitiva para el manejo y tratamiento de los pacientes con FI irreversible (4). Debido, sin embargo, a que es un procedimiento no exento de riesgos, existen criterios consensuados para la indicación del TxI (tabla 1) y solo el 10-15% de los casos con FI crónico asociados a complicaciones de la nutrición parenteral se benefician de esta opción (5, 9-12).

1.2. Tipos de injerto en el TxI

El término TxI abarca un grupo de opciones de trasplante que incluyen el intestino delgado pero que pueden implicar también otros órganos abdominales. De este modo se distinguen cuatro tipos de injerto (7, 13, 14) (figura 2):

- Trasplante intestinal aislado (TIA): abarca yeyuno e íleon del donante y requiere la preservación del hígado, el páncreas, el estómago y el duodeno nativos. Este tipo de injerto es el que se emplea con más frecuencia en adultos, ya que, por la enfermedad de base y el menor tiempo con nutrición parenteral y en lista de espera, poseen menor daño hepático siendo además reversible en muchos casos.
- Trasplante hepato-intestinal (THI): comprende hígado e intestino y se presenta en dos variantes: la clásica, que incluye hígado y yeyuno-íleon de manera independiente, o la variante de Omaha, en la que se trasplantan en bloque hígado, páncreas, duodeno, yeyuno e íleon. Esta última viene siendo la más utilizada por la disminución de las complicaciones vasculo-biliares. El THI está indicado en pacientes con fallo hepático, habitualmente causado como consecuencia de tiempo prolongado con nutrición parenteral u otras enfermedades concomitantes. Por esta razón es el injerto más

frecuentemente empleado en niños, quienes por escasez de donantes adecuados permanecen más tiempo en lista de espera aumentando las probabilidades de afectación hepática (15).

- Trasplante multivisceral (TMV): incluye el complejo pancreático-duodenal junto con el hígado, el estómago y el intestino delgado. Los pacientes con patología abdominal compleja, con cirrosis hepática y trombosis portomesentérica completa no revascularizada, o con tumores desmoides de crecimiento lento son los que se benefician de este tipo de injerto.
- Trasplante multivisceral modificado (TMVM): similar al TMV pero excluye el hígado. Está indicado en pacientes con función hepática preservada pero con insuficiencia pancreática, como en los casos de diabetes mellitus tipo I, fibrosis quística, o dismotilidad intestinal con gastroparesia concomitante.

Estos cuatro tipos de injerto pueden incluir o no parte del colon. Si bien en un inicio se pensó que podía incrementar el riesgo de infección se ha demostrado que esto no es así, y que de hecho favorece la absorción, facilita la independencia de la nutrición parenteral, disminuye el tiempo de estancia en el hospital y mejora los resultados a largo plazo sin suponer una mayor complejidad quirúrgica ni mayores tasas de rechazo (2). La inclusión del bazo del donante en los TMV y TMVM resulta también controvertida. En los inicios estos tipos de injertos no incluían el bazo, dejando a los receptores asplénicos. Posteriormente se hipotetizó que la inclusión del bazo podría tener un papel protector frente a infecciones, aunque también podría aumentar la incidencia de desórdenes hematológicos. Si bien los estudios han descartado que la inclusión del bazo afecte a la tasa de infección o a otros parámetros hematológicos, sí que se ha descrito como factor protector frente al rechazo (16) y la

enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (17). Existe además una tercera variante que consiste en la preservación del bazo nativo del receptor. Esta opción presenta quirúrgicamente más dificultades, aunque también mayores beneficios en lo que a incidencia de EICH y otros desórdenes hematológicos se refiere (18).

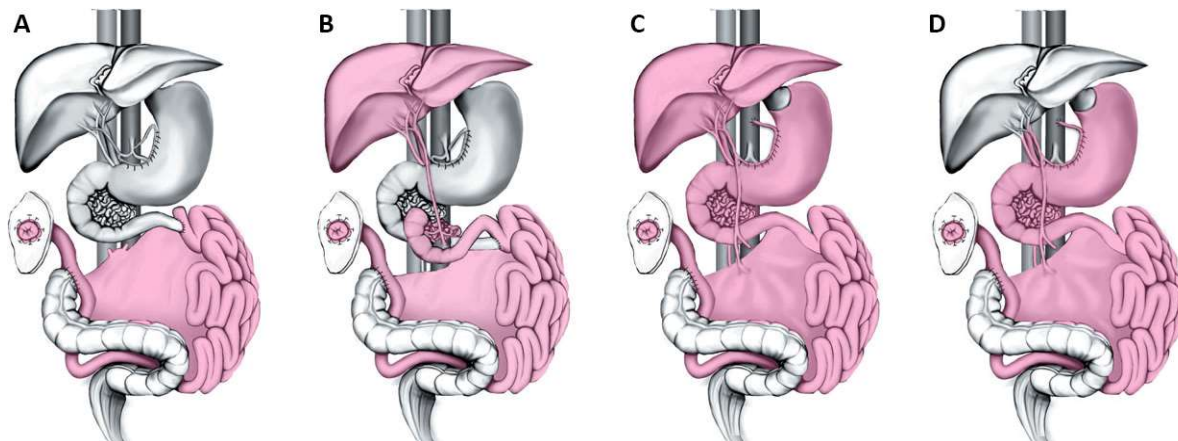


Figura 2. Tipos de injertos intestinales. En rosa se indican los órganos trasplantados. **(A)** Trasplante intestinal aislado. **(B)** Trasplante hepato-intestinal. **(C)** Trasplante multivisceral. **(D)** Trasplante multivisceral modificado. *Adaptada de J Gastroenterol Hepatol. 2011 Aug;26(8):1221-8. (19)*

1.3. Complicaciones

El injerto intestinal resulta único dentro del trasplante de órgano sólido (TOS) por la gran cantidad de sistema inmune (SI) del donante que lleva consigo, así como la carga bacteriana que porta. Aproximadamente el 80 % de las células del SI residen en el tracto gastrointestinal, el cual es repoblado por células del receptor tras el trasplante, resultando un órgano altamente inmunogénico y quimérico con un elevado potencial para el desarrollo de rechazo, EICH y otras alteraciones hematológicas. El balance entre rechazo, infección y EICH resulta por tanto delicado y fundamental para la funcionalidad del injerto.

1.3.1. Rechazo

La principal función del SI es distinguir lo propio de lo ajeno. Tras la identificación de estructuras que se consideran propias, el SI se comporta de una forma tolerante, mientras que, si las considera extrañas, desarrolla una potente respuesta efectora de ataque. Los antígenos presentes en el órgano trasplantado que son distintos a los del receptor (aloantígenos) son considerados como una situación de peligro convirtiéndose en diana de una fuerte respuesta inmune que puede desembocar en el rechazo del órgano.

Los antígenos de los grupos sanguíneos son el primer factor a considerar antes de realizar un trasplante, debido a la expresión de estos antígenos en todas las células y a la presencia de anticuerpos preformados frente a los grupos sanguíneos no compatibles en los sujetos sanos. Excluyendo a los grupos sanguíneos, las moléculas que por su alta tasa de variabilidad dentro de la especie humana tienen mayor probabilidad de desencadenar respuestas de rechazo son las moléculas HLA (antígeno leucocitario humano) del complejo principal de histocompatibilidad. Estas moléculas se subdividen en dos tipos:

- HLA de clase I (A, B y C): están presentes en todas las células nucleadas del cuerpo y tienen como función presentar antígenos de origen intracelular, como los originados en infecciones virales o los que provienen de proteínas propias.
- HLA de clase II (DR, DP y DQ): se expresan en las células presentadoras de antígenos (APC) como linfocitos B (LB), monocitos, macrófagos y células dendríticas (DC), y también en algunas células activadas (linfocitos T (LT), endotelios, células epiteliales intestinales...). Su función es la de presentar antígenos extraños de origen extracelular que las células capturan por fagocitosis o endocitosis y luego procesan (20).

En el TOS se desarrollan dos tipos de reconocimiento de los aloantígenos: alorreconocimiento directo e indirecto (figura 3). El primer tipo se da por la interacción entre los LT del receptor y

las moléculas HLA de las APC del donante. Este tipo de reconocimiento sucede en las etapas más tempranas del trasplante e induce respuestas más potentes, siendo el responsable del rechazo agudo del injerto. En el reconocimiento indirecto la interacción se da entre los linfocitos y las APC del receptor, con la diferencia de que estas últimas presentan péptidos del donante. Los antígenos que más comúnmente son reconocidos como extraños en esta presentación son los procedentes del procesamiento de las moléculas de HLA alogénicas. Este mecanismo es especialmente importante en la activación de los macrófagos y en el inicio de las respuestas de anticuerpos frente al injerto, y juega un papel relevante en la respuesta a largo plazo (21, 22).

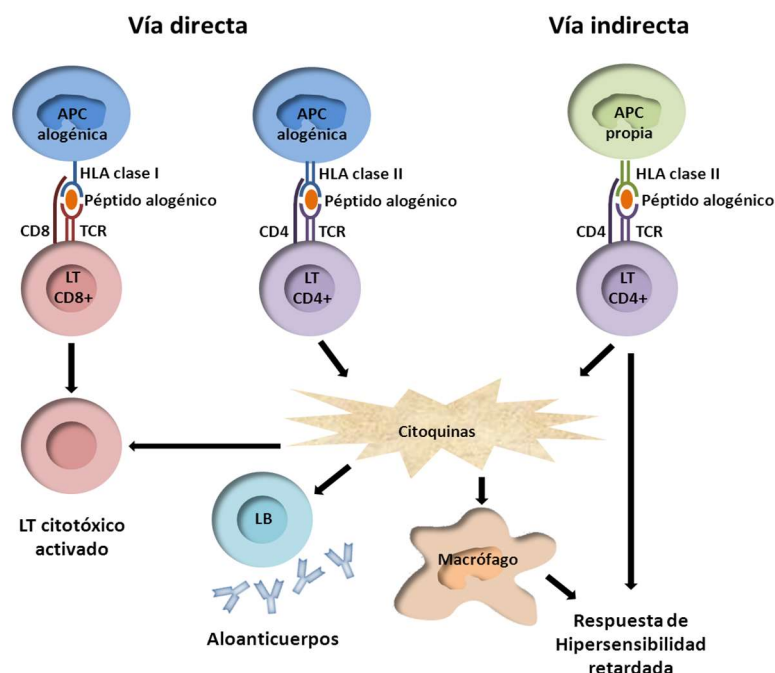


Figura 3. Reconocimiento directo e indirecto de aloantígenos en el trasplante.

La activación de los LT mediante estos mecanismos de reconocimientos, da lugar al **rechazo celular**. Por un lado, los LT CD8⁺ del receptor reaccionan frente a las células endoteliales y parenquimatosas del injerto, desarrollando una respuesta de citotoxicidad directa que

destruye estas células. Por otro lado, LT CD4⁺ y CD8⁺ generan una respuesta inflamatoria mediada por citoquinas que inducen el reclutamiento y activación de otras células de la inmunidad innata y adaptativa (figura 3).

Según el daño tisular que se produzca y el tiempo de aparición, el rechazo celular puede ser agudo o crónico (23):

- Rechazo agudo: desde el punto de vista histológico se caracteriza por infiltración de células mononucleares, daño de las criptas (manifestado por basofilia citoplasmática, aumento del tamaño e hipercromasia del núcleo, acortamiento de las células epiteliales y pérdida de células de Paneth), aumento de cuerpos apoptóticos en las criptas y distorsión de la arquitectura de las criptas y las vellosidades (figura 4). Según estos criterios, el rechazo celular agudo puede clasificarse en indeterminado, leve, moderado o grave (tabla 2). Los síntomas clínicos incluyen náuseas, fiebre, vómitos, aumento del débito de la ileostomía y dolor y distensión abdominal. En las formas graves, puede manifestarse como un shock séptico con acidosis metabólica e hipotensión, probablemente debidos a la translocación de bacterias por la pérdida de la integridad de la barrera epitelial. Edema, fragilidad de la pared intestinal con hemorragia y acortamiento de las vellosidades son signos sugestivos de rechazo agudo que pueden observarse mediante endoscopia. De acuerdo a la literatura disponible, el rechazo agudo es una de las principales causas de pérdida del injerto intestinal y se da con más frecuencia ($\approx 50\%$ durante el primer año) y mayor gravedad que en otros órganos abdominales debido a la elevada inmunogenicidad del intestino (2, 14).

Tabla 2. Criterios histológicos para la graduación del rechazo agudo en el trasplante intestinal. (23)

| Grado | Criterios |
|--------------------------------|---|
| Indeterminado | <ul style="list-style-type: none"> • Infiltrado inflamatorio mínimo localizado • Daño mínimo de las criptas • Apoptosis en las criptas (6 cuerpos apoptóticos/10 criptas) • Mínima distorsión de la arquitectura • Criterios insuficientes de rechazo agudo |
| Leve (grado I) | <ul style="list-style-type: none"> • Infiltrado inflamatorio leve con linfocitos activados • Daño leve de las criptas • Apoptosis en las criptas (>6 cuerpos apoptóticos/10 criptas) • Leve distorsión de la arquitectura |
| Moderado (grado II) | <ul style="list-style-type: none"> • Infiltrado inflamatorio ampliamente extendido en la lámina propia • Daño difuso de las criptas • Apoptosis en las criptas con confluencia de apoptosis focales • Distorsión pronunciada de la arquitectura • Inflamación leve o moderada de la íntima arterial |
| Grave (Grado III) | <ul style="list-style-type: none"> • Infiltrado inflamatorio ampliamente extendido en la lámina propia • Daño difuso de las criptas • Apoptosis en las criptas con confluencia de apoptosis focales • Distorsión pronunciada de la arquitectura • Ulceración de la mucosa • Inflamación grave de la íntima arterial ± afectación transmural |

- Rechazo crónico: desde el punto de vista histopatológico se define por arteriopatía caracterizada por hiperplasia miointimal con estrechamiento de la luz de la vasculatura mesentérica, serosa y submucosa, observándose además pérdida de mucinas y fibrosis

de la submucosa (24). Debido a que estos cambios tienen lugar en las capas más profundas, son difícilmente observables en las biopsias tomadas de rutina por endoscopia, dificultándose su diagnóstico. La tasa de rechazo crónico es de aproximadamente el 15% de los receptores, constituyendo la causa principal de fallo tardío del injerto y enterectomía (8, 14).

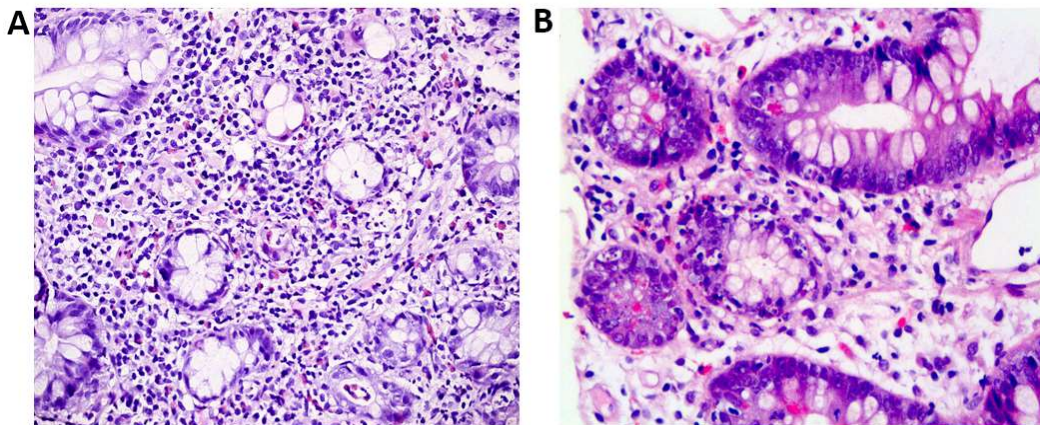


Figura 4. Rechazo agudo de injerto intestinal. **(A)** Infiltrado inflamatorio difuso con eosinófilos y deterioro de las criptas. (H-E 20X). **(B)** Rechazo agudo grave. Múltiples cariorrexis y apoptosis en el epitelio de las criptas, acompañadas de infiltrado inflamatorio mixto con eosinófilos. (H-E 40X).

A diferencia del rechazo celular, el **rechazo humoral** o **mediado por anticuerpos** (ABMR) es una reacción de hipersensibilidad de tipo II mediada por inmunoglobulinas (Ig) de tipo G específicas dirigidas contra las células endoteliales del órgano trasplantado. La unión de los anticuerpos a las células endoteliales desencadena la activación de las cascadas del complemento y coagulación, produciéndose por un lado el reclutamiento de células de la inmunidad innata (polimorfonucleares y macrófagos) que generan una respuesta inflamatoria y por otro lado la agregación plaquetaria que conlleva la necrosis de las células endoteliales. Existen diferentes aloantígenos reconocidos, siendo los más relevantes las moléculas HLA (25). Estos anticuerpos pueden existir previos al trasplante (generados por inmunización previa por

transfusiones, embarazos o trasplantes anteriores) o desarrollarse *de novo*, lo que va a determinar también el tipo de rechazo humoral (26):

- Rechazo hiperagudo: se da en las primeras 24h tras el trasplante y es resultado de la presencia de isohemaglutininas o de títulos altos de anticuerpos anti-HLA donante específicos (DSA) preformados. La respuesta inmunológica es rápida y agresiva, produciéndose una trombosis masiva de los grandes vasos que conlleva generalmente la necrosis y pérdida del injerto. El trasplante ABO compatible y la realización de las pruebas cruzadas previas al trasplante evitan este tipo de rechazo, siendo hoy en día infrecuente.
- Rechazo acelerado: sucede en la primera semana tras el trasplante y es consecuencia de la presencia de DSA preformados a títulos bajos o de baja afinidad. Puesto que estos anticuerpos pueden dar una prueba cruzada negativa, la determinación pre-trasplante (preTx) de las especificidades y los niveles de DSA resulta crucial para prevenir el rechazo acelerado. La respuesta es menos grave que en el rechazo hiperagudo y puede ser reversible con inmunosupresión específica.
- Rechazo agudo: aparece desde semanas hasta meses tras el trasplante como resultado de la aparición de DSA *de novo* (DSA_{dn}) generados en el contexto de una activación de LT. Además del daño producido mediante la citotoxicidad dependiente de complemento, los anticuerpos producen la lesión del injerto a través de otros mecanismos como la inflamación dependiente de complemento (que produce la activación de monocitos y LB) o la citotoxicidad mediada por la señalización del receptor FcγR en polimorfonucleares, monocitos y células NK (*natural killer*) (27).
- Rechazo crónico: emerge años después del trasplante y habitualmente asociado a la reducción gradual de la inmunosupresión. Se caracteriza por un daño progresivo de la

vascularización del injerto con engrosamiento y fibrosis de la íntima que produce la oclusión de los vasos. Se asocia más frecuentemente a anticuerpos anti-HLA de clase II (28).

El ABMR es un fenómeno reconocido especialmente en el trasplante renal y cardiaco, sin embargo, el papel de la respuesta inmune humoral en el TxI aún no es claro. El rechazo hiperagudo es poco frecuente, incluso en los pacientes que presentan DSA preformados y dan como resultado una prueba cruzada positiva. El único caso descrito en la literatura (29) refiere a un paciente con múltiples DSA preformados que presentó acidosis, hipotensión e hipoxia tras la reperusión del injerto, el cual oscureció mostrando congestión vascular, trombos, hemorragia, infiltración leucocitaria y depósitos de IgG, IgM, C3 y C4d en la biopsia. Hasta la fecha, tampoco existe un consenso en los criterios diagnósticos del ABMR agudo. Los hallazgos histológicos característicos del daño vascular se han descrito en biopsias de pacientes con prueba cruzada positiva a los pocos días del trasplante o en resecciones de injertos (30-32), pero no resultan frecuentes. Sin embargo, el hecho de que muchos episodios de rechazo sean refractarios a los tratamientos inmunosupresores (generalmente dirigidos frente al rechazo de tipo celular) hace pensar que efectivamente existe un componente humoral importante en el rechazo del injerto intestinal responsable del ABMR. Además, en los últimos años han ido aumentando las evidencias sobre el papel deletéreo de los DSA en la evolución del TxI (33-37), si bien la experiencia es aún limitada (ver apartado 3.3. de la introducción).

1.3.2. Enfermedad de injerto contra huésped

La interacción entre los linfocitos del donante y del receptor en el TxI resulta única. En el resto de TOS el intercambio linfoide sucede principalmente desde el receptor hacia el donante,

mientras que en el trasplante de médula ósea (donde la EICH es frecuente) el intercambio se realiza en sentido opuesto. Sin embargo, en el injerto intestinal este flujo de células inmunes sucede bidireccionalmente, generando complejas interacciones que pueden dar lugar a rechazo o EICH si no están compensadas, o bien a tolerancia y quimerismo.

La incidencia de EICH en el TxI es del 4 al 13%, aunque el tratamiento no suele ser efectivo originando altas tasas de mortalidad (hasta el 77%). La EICH en este contexto afecta principalmente a la piel, el tracto digestivo nativo del receptor, la médula ósea y en ocasiones los pulmones y el hígado. El diagnóstico es histológico, incluyendo necrosis de los queratinocitos y apoptosis en el epitelio gastrointestinal. Factores como la menor edad de los receptores, la esplenectomía y el TMV-TMVM se han asociado a una mayor incidencia (17, 38).

1.3.3. Enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (PTLD)

El estado de inmunosupresión farmacológica inducido tras el trasplante implica una situación de riesgo para el desarrollo de tumores. La PTLD supone la neoplasia más frecuente en niños con TOS y la segunda en adultos, resultando una complicación importante en el TxI con una incidencia del 10-30%, siendo más elevada en los receptores pediátricos (39-42). Bajo el término PTLD se incluye un grupo heterogéneo de desórdenes linfoproliferativos con un amplio espectro de manifestaciones clínicas y hematológicas (43) , siendo la mayoría de estirpe linfocito B y relacionados en más del 90% de los casos con infección por virus de Epstein-Barr (VEB) (44).

El diagnóstico de la PTLD se basa principalmente en los hallazgos histológicos. A diferencia de

otros TOS donde la PTLD se desarrolla en un órgano diferente al trasplantado, en el TxI el injerto es la misma diana, dificultando en muchas ocasiones el diagnóstico diferencial entre la infiltración causada por células propia de los episodios de rechazo y la linfoproliferación característica de la PTLD. Sin embargo, debido a su elevada asociación con el VEB, la detección de éste en las biopsias mediante técnicas de hibridación *in-situ* junto con técnicas de inmunohistoquímica facilitan el diagnóstico final (45).

Las opciones terapéuticas de la PTLD se basan inicialmente en una profilaxis frente al VEB con ganciclovir, seguida de la reducción de la inmunosupresión basal en caso de evidencia de infección activa y del tratamiento con rituximab (anticuerpo monoclonal frente a CD20, deplecionante de LB). Si bien el tratamiento con este último suele ser efectivo, en ocasiones es necesaria la combinación con quimioterapia (45).

1.3.4. Infecciones

Tabla 3. Factores de riesgo de infección en el TxI. (46)

| PreTx | PostTx |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Anomalías anatómicas intra-abdominales • Múltiples episodios de cirugía • Hospitalizaciones múltiples y prolongadas • Nutrición parenteral • Inmunosupresión secundaria a desnutrición | <ul style="list-style-type: none"> • Injerto con elevada carga de microorganismos. • Procedimientos quirúrgicos complicados • Hospitalizaciones múltiples y prolongadas • Elevada inmunosupresión • Lesión de la mucosa con translocación bacteriana • Altas tasas de rechazo del injerto |

Las infecciones suponen el 50% de las pérdidas del injerto en el TxI (2), dándose con una frecuencia de más del 90% (47). La alteración de la permeabilidad de la barrera epitelial intestinal que produce la translocación bacteriana junto con otros factores de riesgo pre y post-trasplante (posTx) (tabla 3), hacen que el TxI presente las tasas de infección más elevadas dentro del TOS (46, 48, 49).

Tabla 4. Infecciones en el TxI.

| PosTx temprano (< 6 semanas) | PosTx tardío (> 6 semanas) |
|---|--|
| <p>Infecciones bacterianas y fúngicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Relacionadas con el catéter central • Intra-abdominales (abscesos, peritonitis) • En las heridas quirúrgicas • Neumonía de ámbito hospitalario • Infecciones del tracto urinario | <p>Infecciones bacterianas y fúngicas</p> <p>Infecciones virales del injerto</p> <p>Infecciones oportunistas</p> <p>Sepsis</p> |
| <p>Microorganismos causantes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bacterias: enterobacterias gram negativas, <i>Enterococcus</i>, <i>Staphylococcus</i>. • Hongos: <i>Candida</i>, <i>Aspergillus</i>. | <p>Microorganismos causantes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Virus: CMV, VEB, adenovirus, rotavirus y norovirus. • Oportunistas: <i>Cryptosporidium</i>, <i>Pneumocystis</i>, <i>Toxoplasma</i>, <i>Nocardia</i>, <i>Isospora</i>, <i>Giardia</i>. |

Durante las primeras semanas posTx, las infecciones más frecuentes se dan por bacterias (especialmente relacionadas con el ámbito hospitalarios) y por hongos oportunistas como *Candida* o *Aspergillus*. Las infecciones virales se desarrollan por el contrario a partir de las 4

semanas postTX con una incidencia máxima entre los meses 1 y 6, siendo las más frecuentes por citomegalovirus (CMV), VEB, adenovirus, rotavirus y norovirus (tabla 4) (46).

1.4. Inmunosupresión

1.4.1. Terapias de inducción

Las terapias de inducción están destinadas a producir una depleción o bloqueo importante del SI en el momento del trasplante con el fin de facilitar la aceptación del injerto durante las primeras semanas. Existen diferentes fármacos que producen este efecto y que actualmente se emplean en el TxI (tabla 5) (50).

Tabla 5. Inmunosupresores empleados en la terapia de inducción en el TxI.

| Fármaco | Tipo | Efecto |
|------------------------|--|---|
| Timoglobulina | Anticuerpo policlonal frente a LT | Depleción de LT |
| Alemtuzumab | Anticuerpo monoclonal humanizado frente a CD52 | Depleción de LT, LB y algunas poblaciones de NK |
| Basiliximab | Anticuerpo monoclonal quimérico frente a CD25 | Bloqueo del receptor de la IL2 (evita la activación linfocitaria) |
| Rituximab | Anticuerpo monoclonal quimérico frente a CD20 | Depleción de LB |
| IgG intravenosa (IVIG) | Preparado policlonal de IgG humana | Inmunomodulador de la respuesta inmune |

IL: interleuquina

El empleo de terapias de inducción en el TxI ha ido aumentando a lo largo de los años debido al incremento de la supervivencia del paciente que producen. De hecho, según los datos del

registro internacional de trasplante intestinal, desde el 2009 un 72% de los receptores recibieron algún tipo de inducción (2). Los protocolos de inducción varían entre los distintos centros, prevaleciendo el uso de timoglobulina y alemtuzumab frente al resto. El uso del rituximab es cada vez más extendido, tanto en combinación con timoglobulina (demostrando el mejor equilibrio entre tasas de rechazo e infección) como en combinación con IVIG y plasmaféresis en aquellos pacientes sensibilizados con DSA preformados. Respecto a los agonistas del receptor de la IL2, el daclizumab fue el primero en introducirse, sin embargo actualmente se encuentra en desuso en muchos países debido a las altas tasas de infección asociadas, empleándose el basiliximab en su lugar (50).

1.4.2. Terapias de mantenimiento

Las terapias de inducción arriba mencionadas han de ir seguidas de una inmunosupresión continuada. Los fármacos empleados en el mantenimiento buscan la prevención de la activación y la proliferación linfocitaria mediante diferentes mecanismos (tabla 6) (51). El mantenimiento con tacrolimus es la opción más extendida, sin embargo, debido a su elevada nefrotoxicidad se combina en muchos casos con otros fármacos (especialmente con dosis bajas de corticosteroides o con inhibidores de mTOR) con el fin de reducir la dosis. Los inhibidores de mTOR, aunque de baja nefrotoxicidad, presentan otros efectos secundarios adversos como neutropenia, retraso en la cicatrización y ulceración de la mucosa oral, aunque por otro lado poseen efecto anti-tumoral. El MMF suele administrarse también en combinación con tacrolimus, sin embargo, debido a sus efectos adversos gastrointestinales y la dificultad para alcanzar niveles (mayor que en otros TOS), es menos empleado que el resto de fármacos (14).

Tabla 6. Inmunosupresores empleados en la terapia de mantenimiento en el TxI.

| Fármaco | Mecanismo de acción |
|-------------------------------|--|
| Tacrolimus / Ciclosporina A | Inhibidores de la calcineurina: impiden la activación de los LT bloqueando la vía de señalización del TCR. |
| Everolimus / Sirolimus | Inhibidores de mTOR: bloquean la proliferación de LT desencadenada por la activación vía IL2. |
| Micofenolato de mofetil (MMF) | Inhibidor de la síntesis de nucleótidos: bloquea la proliferación de LT y LB. |
| Corticosteroides | Inhibición de la síntesis de citoquinas y otros mediadores inflamatorios. |

mTOR: diana de mamíferos de la rapamicina; TCR: receptor de células T.

1.4.3. Tratamiento del rechazo

La primera línea de acción en el tratamiento del rechazo en el TxI consiste en la administración de 2-3 bolos de metilprednisolona intravenosa. Este tratamiento suele ser efectivo en los rechazos leves, complementándose con fármacos deplecionantes (timoglobulina o alemtuzumab) en los rechazos graves o resistentes al tratamiento con corticosteroides (52). En una última línea de acción se encuentran otras alternativas como el basiliximab y el infliximab (anticuerpo quimérico monoclonal frente al factor de necrosis tumoral alfa o TNF α), siendo este último especialmente eficaz en los rechazos tardíos resistentes al resto de tratamientos (50).

Todas estas terapias están dirigidas principalmente frente a los mecanismos celulares que causan el rechazo, pero no resultan efectivas en el tratamiento del ABMR. El ABMR requiere

de una aproximación multimodal que interviene sobre las distintas etapas del daño mediado por anticuerpos (figura 5). El primer tratamiento de elección suele ir destinado a la eliminación de los anticuerpos circulantes mediante la combinación de IVIG y plasmaféresis, si bien esta terapia puede tener un efecto rebote si no se realiza de manera continuada. La depleción de LB con rituximab es la siguiente opción para los episodios que resisten al tratamiento de primera línea, aunque en muchos casos se emplea la combinación de los tres desde el inicio. El bortezomib, que actúa eliminando las células plasmáticas, queda como última elección para los rechazos refractarios junto al eculizumab (anticuerpo monoclonal frente a C5), el cual, aunque ha demostrado una alta efectividad, posee un coste muy elevado y no impide el daño no dependiente de complemento causado por los anticuerpos (26, 50, 53).

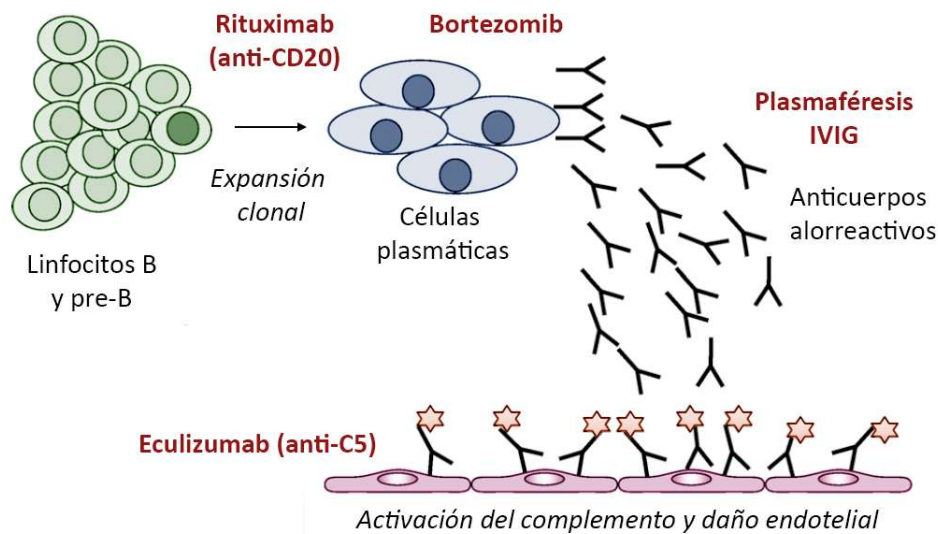


Figura 5. Aproximaciones terapéuticas para prevenir o frenar el daño mediado por anticuerpos en el trasplante de órgano sólido. *Adaptada de Semin Immunol. 2011 Aug;23(4):224-34. (26)*

2. EL SISTEMA INMUNE INTESTINAL

Con más de 200 m² de superficie y aproximadamente 50 x 10⁹ linfocitos, el intestino representa el mayor órgano linfoide y el más complejo, ya que cuenta con diversas estructuras especializadas y una gran variedad de poblaciones celulares (figura 6). Además de la constante exposición a antígenos ambientales y de la dieta, el intestino alberga unas 10¹⁴ bacterias comensales, lo que hace de este SI algo excepcional. Su función resulta en un delicado balance entre la tolerancia a estos antígenos habituales a antígenos ambientales, de la dieta y bacterias comensales, y la prevención de la invasión de patógenos, evitando una respuesta excesiva y manteniendo la homeostasis intestinal (54, 55).

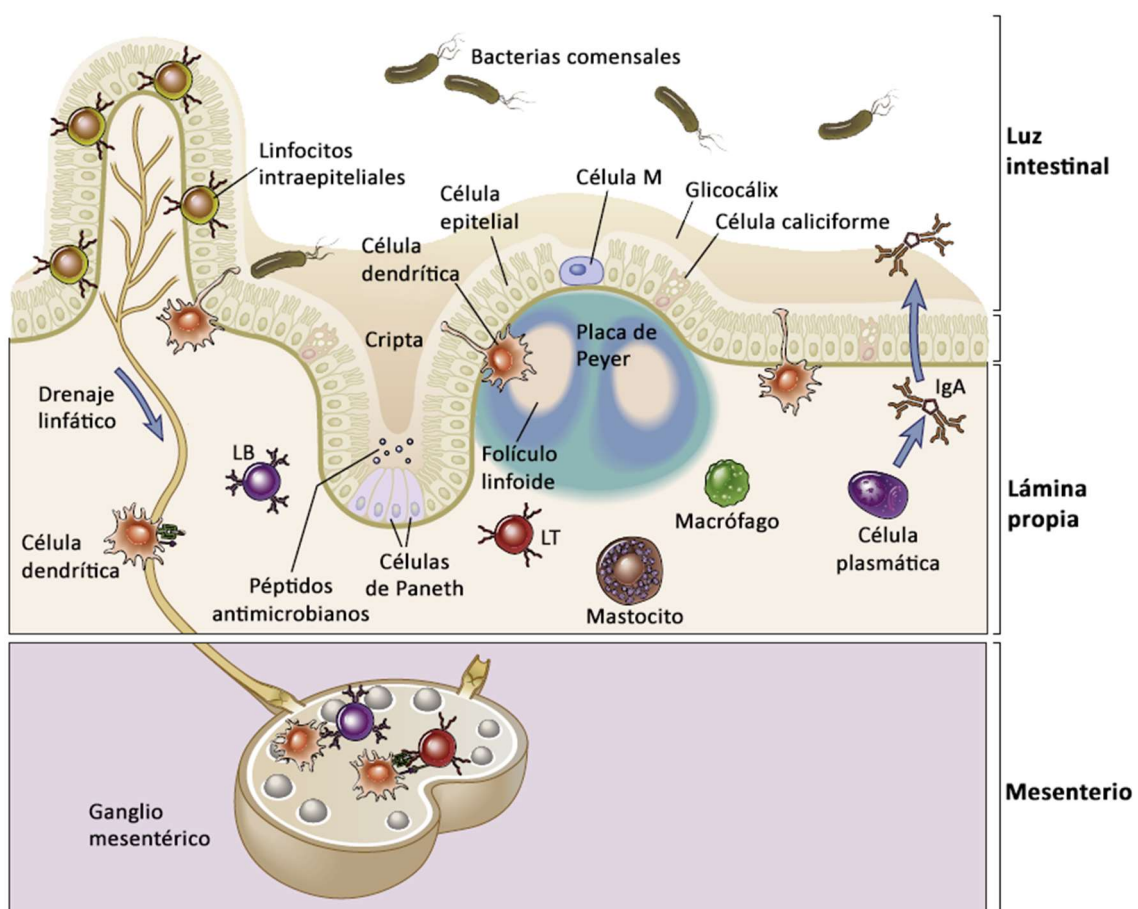


Figura 6. Representación esquemática de los componentes del sistema inmune intestinal. *Adaptada de Abbas et al, Cellular and Molecular Immunology, 8th ed2015. (54)*

2.1. Células epiteliales

El epitelio intestinal (de tipo prismático monoestratificado) constituye la primera línea de defensa frente a los antígenos luminales. Las uniones estrechas entre las células epiteliales intestinales (IEC) y el borde en cepillo forman una barrera física que impide la adhesión de microorganismos. Además, Las IEC participan de manera activa en el reconocimiento y la respuesta frente a los patógenos externos gracias a una gran variedad de receptores de patrones moleculares que reconocen motivos conservados de bacterias y virus. Entre estos receptores se incluyen lectinas y adhesinas, los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores intracelulares de dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (receptores tipo NOD o NLR). Su activación desencadena la producción de péptidos microbianos, quimiocinas y diversas citoquinas que actúan sobre las células del SI intestinal (55).

Las IEC actúan también como APC no profesionales, internalizando y procesando antígenos luminales que luego presentan en la cara basolateral mediante las moléculas HLA de clase I y II. Estas moléculas se expresan de manera constitutiva en las IEC, aunque su expresión se ve aumentada en respuesta a señales proinflamatorias. Adicionalmente, expresan un gran número de moléculas HLA de clase I no clásicas entre las que se encuentran CD1d, HLA-E, MICA/B (cadena A/B relacionada con MHC de clase I) y las proteínas de unión UL16, que permiten la interacción con diversos tipos de células linfoides (56).

Esta capacidad de presentación antigénica se desarrolla de manera característica en las **células M**, que suponen el 10% de las IEC asociadas a folículos linfoides. Morfológicamente presentan características peculiares (reducido glicocálix, borde en cepillo irregular y microvilli

acortados) y están especializadas en la fagocitosis y transcitosis de macromoléculas lumbales al espacio subepitelial (57, 58).

Existen además otras IEC diferenciadas que participan de manera específica en la defensa frente a patógenos. Las **células caliciformes** son productoras del glicocálix, el cual posee una función antimicrobiana que viene dada por sus características físicas (gel altamente cargado que actúa de barrera) y su composición química (presenta glicoproteínas que son tóxicas para muchas bacterias). Además, proporciona una matriz para los anticuerpos y los péptidos antimicrobianos que se secretan al lumen. Su producción está controlada por mediadores inmunes como los leucotrienos, el interferón gamma (IFN γ), la IL9 y la IL13 (59).

Las **células de Paneth** son IEC exclusivas del ID (particularmente concentradas en el íleon) y están especializadas en la síntesis de péptidos antimicrobianos. Producen lisozima, defensinas y la lectina REGIII γ (proteína regeneradora derivada de islotes III gamma) en respuesta a IL22, tras la activación de los TLR y NLR o por estimulación colinérgica. Además, mantienen la actividad de las células madre de las criptas y son cruciales en la homeostasis intestinal (59).

Finalmente, se encuentran las **células penacho**. Estas células relativamente desconocidas se identificaron morfológicamente hace más de seis décadas, aunque su función ha permanecido siendo un misterio hasta hace apenas dos años, en los que se describió su papel fundamental como desencadenante de las respuestas inmunes de tipo 2. Las células penacho son la principal fuente de IL25 a nivel epitelial, una citoquina que promueve la activación y reclutamiento de los LT cooperadores (Th) tipo 2 y de las células linfoides innatas (ILC) tipo 2, encargadas de la respuesta frente a parásitos y helmintos (60).

2.2. Sitios inductores

Se conocen como sitios inductores a las estructuras linfoides organizadas que comprenden el tejido linfoide asociado o GALT (que incluyen las placas de Peyer, los agregados linfoides aislados y el apéndice) junto con los ganglios mesentéricos (MLN) (61).

Las estructuras mejor caracterizadas del GALT son las **placas de Peyer (PP)**, formadas por cientos de folículos linfoides de LB rodeados de pequeñas áreas de LT, que resultan visibles macroscópicamente. A diferencia de los nódulos linfoides, las PP no se encuentran encapsuladas y contienen siempre centros germinales, lo que es indicativo de una estimulación inmune continuada. Además, la ratio de LB:LT es mayor (de 4 a 6 veces) y, si bien poseen vasos linfáticos eferentes, carecen de vasos aferentes. Las PP se localizan en la mucosa intestinal bajo un epitelio especializado rico en células M. Su tamaño y densidad aumentan desde el yeyuno hasta el íleon, siendo muy numerosas en el íleon distal y escasas en el duodeno. Participan principalmente en la producción de IgA, gracias a un ambiente rico en TGF β 1 (factor de crecimiento transformante beta 1) que favorece el cambio de clase de las inmunoglobulinas (59, 62).

El GALT también se compone de pequeños **agregados linfoides aislados** solo detectables microscópicamente, cuyo desarrollo está directamente relacionado con la respuesta a los antígenos de la dieta y la flora intestinal. Estructuralmente incluyen las criptoplasmas (áreas reducidas ricas en DC y células inductoras de tejido linfoide) y los folículos linfoides aislados. Estos últimos, considerados el estadio maduro, se componen principalmente de LB, ILC y DC. Están cubiertos de un epitelio especializado rico en células M y contienen un centro germinal,

aunque carecen de una zona T clara, relacionándose con la producción de IgA independiente de LT (59, 63).

Los **MLN**, responsables del drenaje intestinal, son los más grandes del cuerpo, reflejando así la constante exposición del intestino a antígenos ambientales. A diferencia de los ganglios periféricos, expresan MAdCAM-1 (molécula de adhesión celular adresina de mucosas 1) y otras moléculas que permiten una migración dirigida de las células linfoides. Así, los LT migran de manera específica a los MLN gracias a la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ (ligando de MadCAM-1) y al receptor de quimiocinas CCR9 (cuyo ligando CCL25 se expresa en las IEC). La activación de los LT en los MLN favorece la inducción de respuestas Th2 (T cooperadoras tipo 2) y la diferenciación a linfocitos T reguladores (Tregs) mediada por el ácido retinoico, el cual es un factor clave para la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 y por tanto para la migración linfocitaria al intestino (64, 65).

2.3. Sitios efectores

La lámina propia (LP) y el epitelio intestinal comprenden los sitios efectores del SI intestinal, y contienen la mayor población de LT, células plasmáticas y células fagocíticas del cuerpo. Aunque ambos compartimentos están en estrecho contacto, presentan diferencias en la distribución, composición y función de las poblaciones celulares.

2.3.1. Epitelio intestinal

Entre las IEC, en su cara basolateral, se localizan los linfocitos intraepiteliales (IEL) gracias a la expresión constitutiva de la integrina αE (CD103) que interacciona con la E-cadherina de las IEC. Los IEL representan entre el 5-10% del total de células aisladas del epitelio, presentándose

con mayor frecuencia en el intestino delgado (1 por cada 5-10 IEC) que en el intestino grueso (1 por cada 40 IEC).

La población mayoritaria de IEL la constituyen los LT CD3⁺ (80-90%), de los cuales el 85-95% expresan el TCR $\alpha\beta$ (LT $\alpha\beta$) y los correceptores CD8 $\alpha\beta$ o CD4. A este grupo de IEL se le conoce como **IEL tipo a o convencionales** (tabla 7), y derivan de LT circulantes activados que expresan marcadores de migración intestinal (integrina $\alpha 4\beta 7$ y CCR9). En el ID la mayoría de estos IEL (aproximadamente el 85%) son LT CD8 $\alpha\beta$ ⁺ con función citolítica. Poseen un fenotipo de memoria efectora y, aunque mantienen rasgos de activación (como la expresión de CD69), presentan una reducida capacidad de proliferación y de producción de citoquinas inflamatorias. Estos rasgos únicos les permiten mantener el balance entre la protección inmunológica y la integridad del epitelio. Los IEL convencionales CD4⁺ están presentes en menor proporción en el ID (\approx 10% de los IEL tipo a), siendo más abundantes en el IG, (\approx 30% del total de IEL). Estos linfocitos presentan una elevada plasticidad, pasando de fenotipos efectores (Th1, Th2 y Th17) a fenotipos reguladores (Tregs).

El 5-15% restante de los LT constituye el grupo de **IEL tipo b o no convencionales** (tabla 7), que derivan directamente del timo, donde adquieren las moléculas de tropismo intestinal. En este grupo se incluyen los LT con TCR $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) y una población única de LT $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺, que ha sido ampliamente estudiada en ratones pero cuya existencia y función en humanos permanece sin dilucidar. Los LT $\gamma\delta$ producen factor de crecimiento de queratinocitos y TGF β 1, lo que les otorga un papel fundamental en el mantenimiento y reparación del epitelio intestinal. Además, son capaces de reconocer vía el receptor de activación NKG2D las moléculas de MICA y MICB que se expresan en las IEC en situaciones de estrés celular,

produciendo su rápida citolisis e impidiendo así la diseminación de posibles células infectadas o cancerosas. También están implicados en otros procesos como la regulación del número y citotoxicidad de los IEL TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8 $\alpha\beta$ ⁺, la producción de IgA o la tolerancia oral dependiente de IL10 (66-69) .

Tabla 7. Poblaciones de IEL.

| Población | % del total de IEL | Características |
|---|--------------------|---|
| IEL CD3 ⁺ Tipo a o convencionales | 70 - 85% | · TCR $\alpha\beta$ · CD8 $\alpha\beta$ (85%): fenotipo activado y de memoria efectora con función citolítica. · CD4 (15%): elevada plasticidad entre fenotipo efector (Th1, Th2 y Th17) y regulador (Tregs). |
| IEL CD3 ⁺ Tipo b o no convencionales | 5 - 10% | · TCR $\gamma\delta$: mantenimiento y reparación del epitelio intestinal. · TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$: no bien definida en humanos. |
| IEL CD3 ⁻ | 10 – 20% | · Incluyen ILC1 y células NK · No bien definidas en función y fenotipo |

El 10-20% restante de los IEL lo constituye una población heterogénea de **linfocitos CD3⁻** (tabla 7), que carecen de los marcadores específicos de LT y LB (70, 71). Inicialmente se las denominó células NK-*like* por compartir algunos rasgos fenotípicos y funcionales con los linfocitos NK de sangre periférica (72, 73), si bien no se corresponden en la totalidad a esta población. Posteriormente, con la caracterización de los diferentes tipos de ILC (74, 75), se determinó que parte de esta población poseía características de las ILC1, con un fenotipo determinado por la expresión de CD103⁺ NKp44⁺ CD56⁺ y CD127⁻, la producción de IFN γ y la independencia de la IL15 para su desarrollo y diferenciación (76, 77). Otros autores han propuesto una

clasificación de los IEL CD3⁻ en base a la expresión de CD56 y CD127, distinguiendo cuatro poblaciones: células NK convencionales (CD56⁺ CD127⁻), células NK CD127⁺ (CD56⁺ CD127⁺), IEL CD56⁻ CD127⁻ e IEL CD56⁻ CD127⁺ (78). Debido en parte esta heterogeneidad en la nomenclatura y definición de las subpoblaciones de IEL CD3⁻, su función tampoco resulta clara, si bien se ha descrito un incremento de las ILC1 intraepiteliales en la mucosa inflamada de pacientes con enfermedad de Crohn (76) y su disminución en la enfermedad celiaca ha sido ampliamente estudiada y apoya de forma importante su diagnóstico, sobre todo en las formas atípicas (78-80).

2.3.2. Lámina propia

La LP cuenta con una gran variedad de poblaciones linfoides (LT, LB, ILC, células NK), células fagocíticas y polimorfonucleares que interactúan de manera compleja entre sí.

A diferencia del epitelio, los LT de la LP corresponden en su gran mayoría a LT $\alpha\beta$ CD4⁺ o CD8 $\alpha\beta$ ⁺ en proporción 2:1. Al igual que los IEL tipo a, poseen en su mayoría un fenotipo de memoria efectora y provienen de LT convencionales que han sido activados en órganos linfoides secundarios (sitios inductores), donde adquieren las moléculas de migración específicas del intestino (integrina $\alpha 4\beta 7$ y CCR9). El compartimento de LT CD4⁺ es altamente diverso, encontrándose las subpoblaciones Th1, Th2, Th17, Th22 y Treg entre otras. La frecuencia de estas poblaciones varía a lo largo del intestino, siendo las células Th17 más abundantes en duodeno y las Treg en colon (59, 65, 68).

Existen además otras poblaciones minoritarias de LT que expresan un TCR invariante y poseen funciones más de tipo innato que adaptativo. Estas poblaciones son las células T invariantes

asociadas a mucosas (**MAIT**) y las células T naturales asesinas invariantes (**iNKT**). Las células MAIT suponen el 2-3% de los linfocitos de la LP y se encuentran exclusivamente en el yeyuno. Expresan el TCR V7.2-J33 (en ausencia de los correceptores CD4 y CD8 o junto a CD8 $\alpha\alpha$) y reconocen metabolitos derivados de la vitamina B que son presentados por las proteínas relacionadas con el complejo de histocompatibilidad de clase I (MR1). Se activan selectivamente por células infectadas por bacterias, sintetizando diversas citoquinas y ejerciendo actividad citolítica. Por su parte, las iNKT también se localizan preferencialmente en el yeyuno y suponen el 0.5% de los linfocitos de la LP. Presentan un fenotipo de memoria efectora y producen grandes cantidades de IL4 e IFN γ en respuesta a citoquinas (TCR independiente) o al reconocimiento de glucolípidos presentados por CD1d (TCR dependiente). Además poseen función citolítica y contribuyen a la maduración de las DC (59, 81, 82).

Los **LB** se encuentran en la LP mayoritariamente como células plasmáticas, observándose también otros estadios madurativos. Parte de estos LB provienen de las diversas estructuras del GALT donde se han activado realizando el cambio de clase a IgA. Sin embargo, existe otra parte de los LB capaz de realizar el cambio de clase directamente en la LP de manera T independiente, mediado por la activación de los TLR y en colaboración con las DC y las IEC. En ambos casos, los LB efectores terminan de madurar en la LP diferenciándose a células plasmáticas y LB de memoria (83, 84).

En los últimos años, el estudio de las **ILC** se ha convertido en un gran foco de interés para la inmunología de las mucosas. Estas células de origen linfoide participan en el control de la flora comensal, patógenos y helmintos, así como en la reparación del daño epitelial y en la mediación de la inflamación intestinal. A diferencia de las células linfoides adaptativas (LT y

LB), carecen de receptores específicos de antígeno y actúan de manera rápida a través de la secreción de citoquinas. Son precisamente los distintos perfiles de citoquinas y los factores de transcripción reguladores de su diferenciación (similares a los de las subpoblaciones de LT) los que categorizan las ILC en tres grupos: ILC1, ILC2 e ILC3 (figura 7) (75, 85)

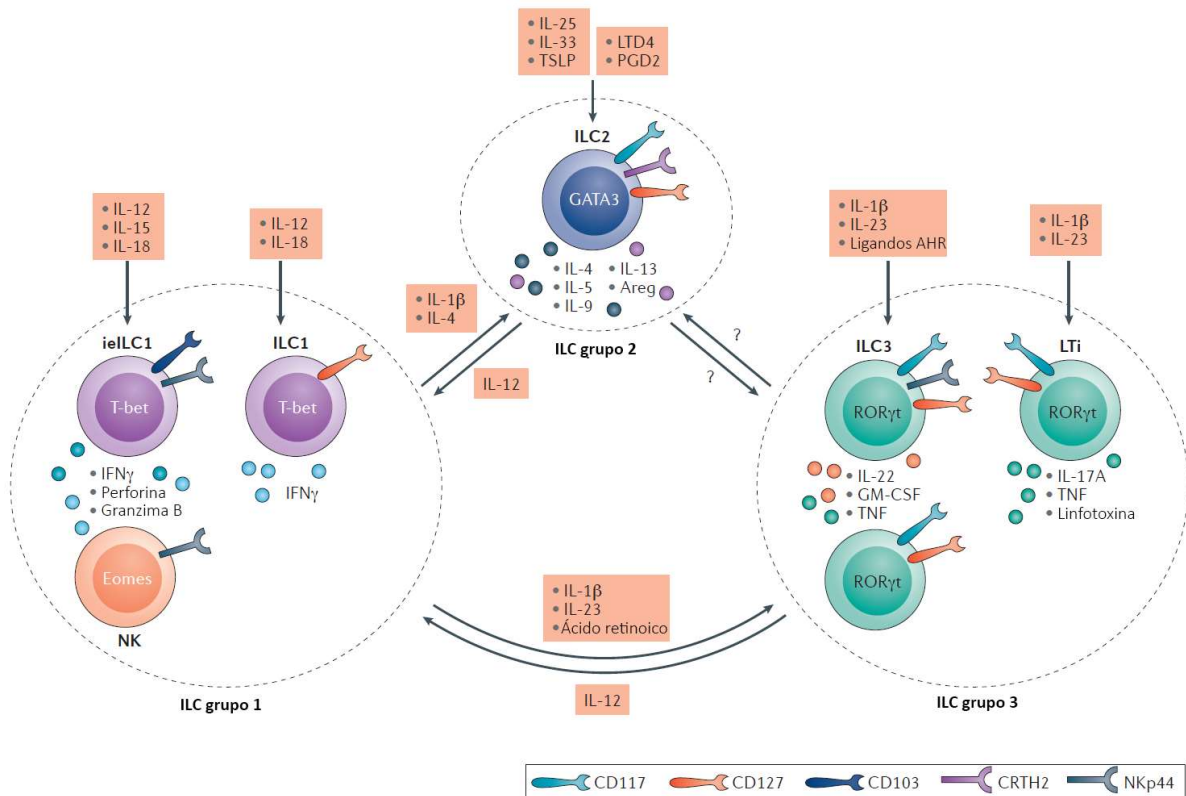


Figura 7. Clasificación actual de las ILC. *Adaptada de Nat Rev Rheumatol. 2017 Mar;13(3):164-173. (86)*

El grupo 1 de ILC, comprendido por las células NK y las ILC1, está principalmente implicado en la resistencia a patógenos intracelulares, virus y tumores. Ambos tipos celulares se caracterizan por la secreción de TNF α e IFN γ , por su capacidad citotóxica y por depender de la señalización por IL15 y de T-bet como factor de transcripción regulador para su desarrollo. Sin embargo, las células NK requieren además del factor de transcripción eomesodermina y son circulantes, mientras que las ILC1 son principalmente residentes de tejido y expresan en

su superficie la integrina CD49a y el receptor de quimiocinas CXCR6. A diferencia de las ILC1 intraepiteliales (ieILC1), las de la LP expresan la cadena α del receptor de la IL7 (CD127), si bien no dependen de esta interleuquina para su desarrollo. En situaciones de inflamación, las ILC1 son estimuladas por la IL15 secretada por las IEC y las DC, lo que produce un aumento de la producción de IFN γ que, entre otras funciones, ha demostrado ser esencial para la protección frente a patógenos entéricos. Además, el IFN γ actúa sobre las propias IEC aumentando su producción de IL7 y favoreciendo de esta manera la homeostasis de las otras poblaciones de ILC (87-89).

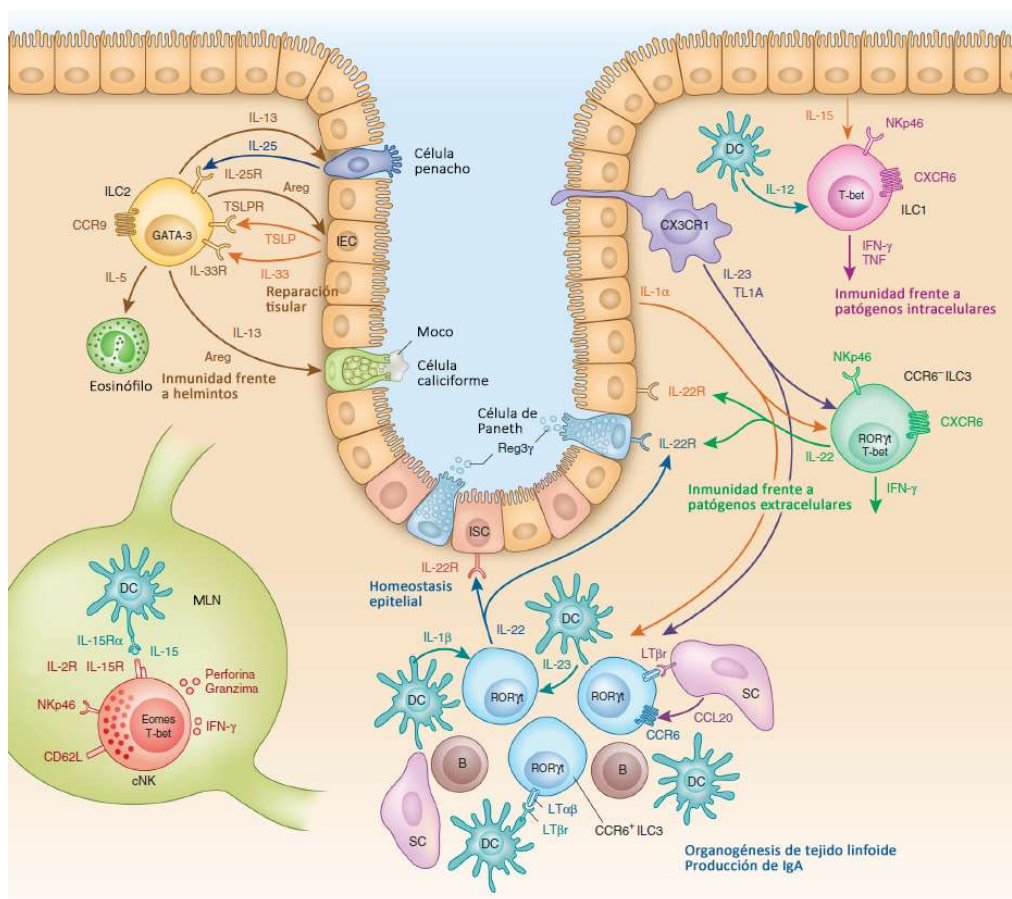


Figura 8. Distribución y funciones de las ILC en la mucosa intestinal. SC: célula estromal, ISC: célula madre intestinal. Adaptada de *Nat Immunol.* 2016 Jun 21;17(7):765-74. (90)

Las ILC2 se caracterizan por la expresión de CD161, CD127, ST2 (subunidad del receptor de la IL33) y CRTH2 (receptor de prostaglandinas D₂). De manera similar a los linfocitos Th2 dependen de GATA3 como factor de transcripción clave, aunque también requieren del receptor de ácido retinoico ROR α para su desarrollo. Participan en la protección frente a helmintos, en la reparación tisular y en los procesos alérgicos gracias a la síntesis de IL4, IL5, IL9, IL13 y anfiregulina en respuesta a IL33, IL25 y linfopoyetina tímica estromal (TSLP) que producen las IEC y otras células mieloides en estas situaciones (88, 90, 91) (figura 8).

El grupo 3 de ILC lo constituye una población heterogénea de células implicadas en la resistencia a infecciones bacterianas y fúngicas, en el control de la flora comensal y en el desarrollo y reparación de los tejidos linfoides. Todas ellas coinciden en su dependencia del receptor gamma-t de ácido retinoico (ROR γ t) y del de aril hidrocarburos (AHR) como factores de transcripción claves y en la síntesis de IL22 e IL17A entre otras citoquinas. La IL22 juega un papel fundamental en la homeostasis de las IEC y en la reparación del daño epitelial a través de la señalización por STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3), que induce la producción de péptidos antimicrobianos y la proliferación celular (figura 2). Sin embargo, esta citoquina juega un papel dual desencadenando también la síntesis de la IL18 en las IEC y amplificando de este modo las señales pro-inflamatorias. De manera similar la IL17A limita la permeabilidad de la barrera epitelial a través de la regulación de la expresión de las ocludinas, aunque participa también en el reclutamiento de neutrófilos en zonas de inflamación. Según la expresión del receptor de quimiocinas CCR6, el grupo 3 de ILC se divide en células inductoras de tejido linfoide (LTi, CCR6⁺) que a su vez pueden expresar o no el correceptor CD4, y en ILC3 (CCR6⁻), que se separan en ILC3 NCR⁻ (carecen del receptor de citotoxicidad NKp44) e ILC3 NCR⁺ (NKp44⁺) (88, 91, 92).

Los distintos grupos de ILC poseen una elevada plasticidad entre sí, que viene determinada por las señales de citoquinas que reciben y otros estímulos del medio como la microbiota. Las ILC3 son las que mayor plasticidad muestran, siendo capaces de cambiar de NCR⁻ a NCR⁺ y viceversa (figura 9A), pero también de convertirse a ILC1 dando lugar a estadios intermedios que expresan tanto ROR γ t como T-bet. También se ha observado recientemente que las ILC2 pueden adquirir capacidad pro-inflamatoria con la expresión de T-bet y la consecuente secreción de IFN γ (figura 9B) (93, 94).

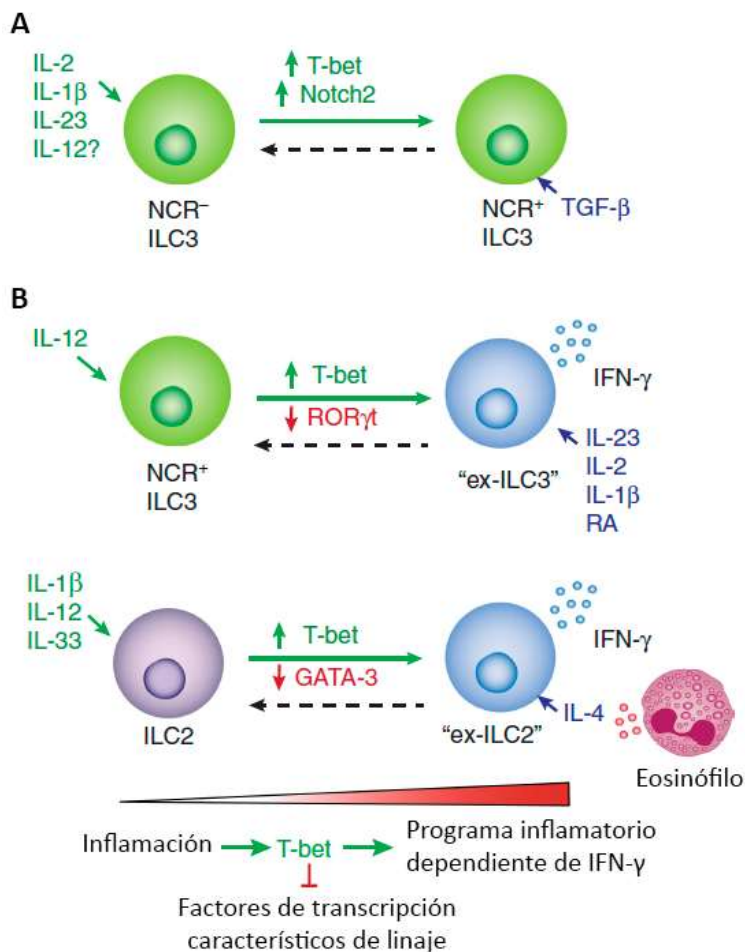


Figura 9. Modelos de plasticidad de las ILC. **(A)** Las ILC3 NCR⁻ pueden diferenciarse en ILC3 NCR⁺ bajo la influencia de los factores de transcripción T-bet y Notch 2. Esta vía está potenciada por el efecto de IL2, IL1 β IL23 e IL12, mientras que el TGF β limita la diferenciación a ILC3 NCR⁺ y revierte el fenotipo a ILC3 NCR⁻. **(B)** ILC2 e ILC3 pueden adoptar un fenotipo ILC1 secretor de IFN γ tras la activación mediada por IL12. Esta diferenciación es reversible bajo la acción de diversas citoquinas (en azul) características de cada linaje. *Adaptada de Mucosal Immunol. 2016 Sep;9(5):1103-12. (94)*

Además de las poblaciones linfoides, la LP cuenta con una gran diversidad de células de la inmunidad innata entre las que destaca el grupo de **fagocitos mononucleares** que incluye macrófagos residentes de tejido y DC. Todas estas poblaciones tienen un papel fundamental en el control de la homeostasis y la inflamación, orquestando las respuestas de las diferentes células del SI (tabla 8) (95-98).

Tabla 8. Poblaciones de fagocitos mononucleares de la LP.

| Población | Características | Funciones |
|--|--------------------------------------|---|
| DC CD103 ⁺ SIRPα ⁺ | · Captura de antígenos del lumen | · Inducción de CCR9 para migración linfocitaria |
| | · Expresión de CCR7: migración a MLN | |
| | · Producción de RA | · Inducción de Tregs y Th17 |
| | · Expresión de TLR | · Inducción de cambio de clase a IgA |
| DC CD103 ⁺ SIRPα ⁻ | · Producción de IL6, IL23 e IL22 | · Inducción de RegIIIγ |
| | | · Homeostasis ILC |
| | · Expresión de TLR3, TLR7 y TLR9 | · Inducción de respuesta Th1 y actividad linfo-citotóxica |
| Macrófagos residentes de tejido | · Producción de RA | · Reparación tisular |
| | · Producción de IL10 | · Inducción de respuesta Th2 |
| | · Baja expresión de TLR | |

SIRPα: proteína reguladora de señal alfa.

2.4. Alteraciones de las poblaciones linfoides en la mucosa intestinal

La disregulación de la barrera epitelial y de las células del SI intestinal contribuye de forma decisiva en diversas patologías como la enfermedad celiaca, la IBD o alergias alimentarias, aunque también puede resultar secundaria a afecciones de origen vírico o tumoral. Estas alteraciones originan cambios en la proporción de las poblaciones linfoides (tabla 9) que pueden ser cuantificables mediante técnicas de inmunohistoquímica o citometría de flujo, ayudando en muchos casos al diagnóstico o seguimiento de la enfermedad.

Tabla 9. Alteraciones de las poblaciones linfoides intestinales en humanos.

| Patología | Cambios en IEL | Cambios en LP | Referencias |
|--------------------------------|--|--|--|
| Enfermedad celiaca | ↑ IEL totales, ↑ LT $\gamma\delta$, ↑ LT $\alpha\beta$ CD8 ⁺ , ↓ IEL CD3 ⁻ , ↓ NKT | ↑ LT $\gamma\delta$ CD8 ⁺ , ↑ LB | Eiras 1998 (79), Calleja 2010 (99), Steenholt 2017(100) |
| Enteropatía asociada a linfoma | Tipo I: ↑ LT $\alpha\beta$ CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD56 ⁻ Tipo II: ↑ LT $\alpha\beta$ CD8 ⁺ CD56 ⁺ | NA | Swerdlow 2008 (43), León 2011 (80), Ondrejka 2017 (101) |
| Enfermedad de Crohn | ↑ ILC1 | ↑ ILC1, ↑ ILC3 NCR ⁻ , ↑ Th17, ↑ Th22, ↓ ILC3 NCR ⁺ | Fuchs 2013 (76), Jiang 2014 (102), Goldberg 2015 (103), Kmiec 2017 (104) |
| Colitis ulcerosa | ↑ LT $\alpha\beta$ CD8 ⁺ | ↑ LT CD8 ⁺ , ↑ Th17, ↓ Th22 | Vidali 2010 (105), Jiang 2014 (102), Kmiec 2017 (104) |
| Alergia alimentaria | ↑ IEL totales, ↑ LT $\gamma\delta$ | ↑ Th2 | Kokkonen 2000 (106), Brown 2006 (107), Lee 2016 (108) |
| Infección por VIH | ↑ LT $\gamma\delta$, ↓ IEL CD3 ⁺ | ↑ LT CD8 ⁺ , ↓ LT CD4 ⁺ , ↓ ILC1, ↓ ILC3 NCR ⁺ , | Nilssen 2012 (109), Allers 2017 (110), Krämer 2017 (111) |
| Trasplante intestinal | ↓ IEL totales | Rx: ↓ CP, ↓ iNKT | Liu 2011(112), Ningappa 2012 (113), Tsuruyama 2012 (114) |

CP: células plasmáticas; NA: no aplicable; Rx: rechazo

3. BIOMARCADORES EN EL TxI

La monitorización del TxI se basa en el seguimiento endoscópico con biopsia del injerto, aunque en muchas ocasiones, especialmente en el trasplante pediátrico, este procedimiento se reserva para los casos de sospecha clínica debido a las complicaciones derivadas del mismo (115). Además, los hallazgos histológicos y endoscópicos no son siempre concluyentes y detectan los cambios patológicos una vez estos ocurren, siendo en ocasiones irreversibles. Todo ello, hace que sea necesaria la búsqueda de biomarcadores más sensibles y específicos que permitan la identificación temprana del daño y monitorización más completa del injerto (116).

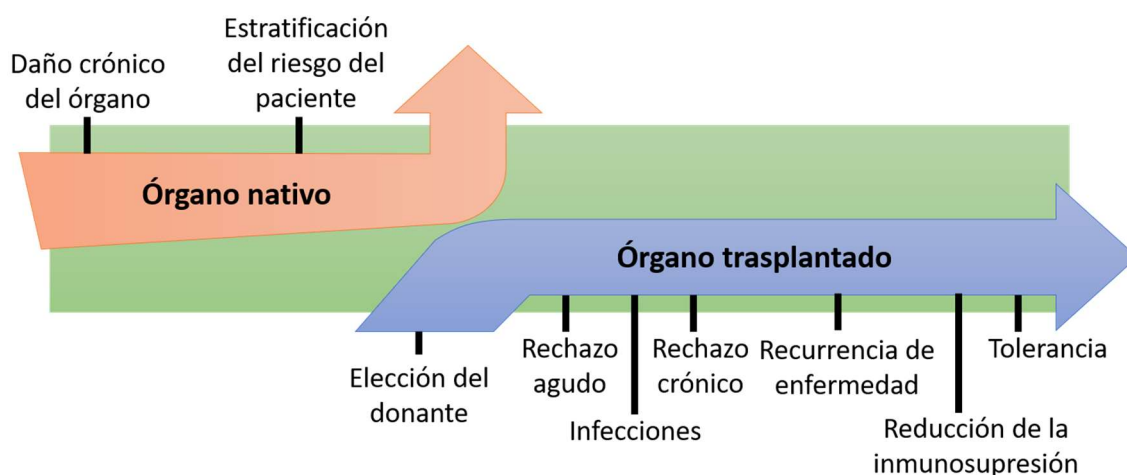


Figura 10. Áreas de investigación de nuevos biomarcadores en el TOS. *Adaptada de Front Immunol. 2015 Sep 8;6:458.* (117)

Se define biomarcador como la característica que puede medirse objetivamente y evaluarse como indicador de procesos biológicos normales o patológicos o de respuestas farmacológicas a intervenciones terapéuticas. Según esto, los biomarcadores pueden ser diagnósticos (si identifican enfermedad o una condición anormal), pronósticos (si son reflejo de un evento futuro) o predictivos (de la respuesta a una determinada intervención) (118). En

el contexto del TOS, la búsqueda de biomarcadores se extiende hacia distintas áreas que abarcan la identificación de donantes adecuados, el diagnóstico y la prevención del rechazo o el reconocimiento de tolerancia del injerto (figura 10).

La evolución explosiva del campo de la biología molecular ha resultado en el desarrollo de herramientas rápidas, precisas y asequibles que son capaces de interrogar grandes conjuntos de datos (genoma, transcriptoma, peptidoma, metaboloma, microbioma...). El campo del trasplante se está sirviendo de estas herramientas, acelerando el descubrimiento de nuevos biomarcadores y arrojando luz en el entendimiento de los procesos biológicos que subyacen a la evolución del injerto. Si bien en la última década se han triplicado las publicaciones que utilizan tecnologías “-ómicas” aplicadas al trasplante, la traslación a la práctica clínica de los biomarcadores hallados resulta aún complicada. Esto se debe principalmente a las limitaciones de los estudios, que pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Tamaños muestrales pequeños que habitualmente no tienen en cuenta factores de confusión clínicos o terapéuticos.
- Ausencia de especificaciones sobre los criterios de selección.
- Elevada variabilidad en las muestras de tejido.
- No confirmación en una cohorte independiente y representativa.
- Empleo de múltiples plataformas de medición y metodologías.
- Uso de técnicas demasiado complejas para la implementación de rutina.
- Correlación basada en la histología como referencia, la cual no resulta predictiva infradiagnosticando así el daño del injerto.

Por ello, la traslación a la clínica de los biomarcadores requiere de 3 criterios fundamentales:

definir claramente los grupos de estudio en la etapa de identificación y validación, demostrar la utilidad clínica incluyendo valores de corte y factores de confusión, y emplear plataformas técnicas accesibles, fiables y rápidas (117, 119).

3.1. Citrulina plasmática

La citrulina es un aminoácido sintetizado por los enterocitos a partir de la glutamina y la arginina. Parte de la citrulina se vierte a la circulación portal donde permanece libre, considerándose su concentración plasmática indicador de la masa enterocitaria y predictor del estado nutricional en situaciones como el síndrome del intestino corto (120). En el TxI se ha observado la disminución de citrulina plasmática en el rechazo ($< 20\text{-}13 \mu\text{mol/L}$), por lo que se ha postulado como un marcador no invasivo del mismo, aunque no permite anticiparlo (121, 122). Este hecho unido a la elevada variabilidad interindividual y su baja especificidad (no distingue entre los distintos tipos de daño de la mucosa) hacen que su utilidad como biomarcador sea limitada (123, 124).

3.2. Calprotectina fecal

La calprotectina es una proteína unidora de calcio implicada en múltiples vías y actividades intra y extracelulares. Por encontrarse en altas concentraciones en el citoplasma de neutrófilos, el nivel de calprotectina fecal se ha correlacionado con actividad en IBD (125), proponiéndose también como marcador de rechazo en el TxI. Varios estudios han correlacionado el aumento de calprotectina fecal ($> 100 \text{ ng/mg}$) en los episodios de rechazo. Sin embargo su validez es más bien de exclusión de rechazo y, al igual que sucede con la

citrulina, los rangos de normalidad no se encuentran bien definidos, posee una baja especificidad y no constituye un marcador predictivo (123, 124, 126).

3.3. Anticuerpos anti-HLA

Los anticuerpos frente a las moléculas HLA se identificaron en 1969 como causantes del rechazo hiperagudo del injerto en el trasplante renal (127). Desde entonces se ha ido profundizando en su relevancia en el rechazo y evolución de los distintos trasplantes de órgano sólido (25, 128), de manera paralela al desarrollo de nuevas tecnologías de detección. Las evidencias del papel deletéreo de los anticuerpos anti-HLA (y especialmente los DSA) en el trasplante renal, cardíaco y pulmonar hacen que su monitorización se realice de manera rutinaria. Como complemento a la prueba cruzada preTx (mediante citotoxicidad dependiente de complemento o por citometría de flujo), la técnica más extendida para la determinación de los niveles y las especificidades de los anticuerpos es la citometría de flujo en *arrays* de microesferas recubiertas de antígenos HLA (plataforma Luminex). Cada una de estas técnicas aporta información relevante para la toma de decisiones y la monitorización pre y postTx (tabla 10) (129).

Debido a la ausencia de rechazo hiperagudo y a la falta de consenso en los criterios de determinación del ABMR, la monitorización de anticuerpos anti-HLA en el TxI ha quedado relegada a un segundo plano, si bien en los últimos años han ido aumentando las evidencias del papel deletéreo de estos anticuerpos en el injerto intestinal. El trabajo de Kato y colaboradores en 2006 puso de relevancia el componente humoral en el TxI (130), aunque no fue hasta 2010 cuando aparecieron los primeros estudios que demostraron la asociación de los DSA con los episodios de rechazo (131). A pesar de que desde entonces varios grupos han

intentado proporcionar más evidencias sobre el papel de los DSA en la evolución del injerto intestinal (tabla 11), los resultados son controvertidos en algunos casos, no existiendo además un consenso definido de actuación y monitorización.

Tabla 10. Métodos de detección de anticuerpos anti-HLA.

| Técnica | PreTx ¹ | PosTx ¹ | Utilidad | Observaciones |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|--|---|
| CDC-XM | +++ | +/- | Determinación fisiológica y funcional de DSA fijadores de complemento. | <ul style="list-style-type: none"> · Requiere células vivas del donante. · ↑especificidad ↓sensibilidad. · No especificidades concretas. |
| FC-XM | ++ | +/- | Determinación fisiológica de DSA fijadores y no fijadores de complemento. | <ul style="list-style-type: none"> · Requiere células del donante. · ↑especificidad y sensibilidad. · No especificidades concretas. |
| PRA frente a panel de células | + | +/- | Determinación fisiológica y funcional de DSA fijadores de complemento. | <ul style="list-style-type: none"> · ↑especificidad ↓sensibilidad. · Antígenos desigualmente representados. |
| Luminex genérico | +++ | +++ | Determinación de niveles generales de anticuerpos anti-HLA (técnica de cribado). | <ul style="list-style-type: none"> · ↓especificidad ↑sensibilidad. |
| Luminex <i>Single Antigen</i> | +++ | +++ | Determinación de especificidades. | <ul style="list-style-type: none"> · Antígenos en configuraciones no fisiológicas que dan lugar a falsos positivos. |

¹Utilidad de la prueba para el estudio pre-trasplante o post-trasplante.

CDC: citotoxicidad dependiente de complemento; FC: citometría de flujo; PRA: panel de reactividad antigénica; XM: prueba cruzada.

Tabla 11. Estudios en la literatura sobre el papel de los DSA en el TxI.

| Estudio | N | Método | PreTx | PosTx | Rechazo (Rx) | Supervivencia injerto | Hígado | Desensibilización |
|----------------------------|---|-------------------------|-------|-------|---|--|---|---|
| González-Pinto, 2010 (131) | 110 (TIA, TMV) | PRA | NO | SÍ | · Asociación PRA-Rx · No correlación con gravedad | NA | NA | Rituximab (inducción) |
| Sindhi, 2010 (132) | 103 pediátricos (TIA) | PRA CDC | SÍ | NO | · No correlación con Rx | · ↑ PRA o CDC-XM+: ↓ supervivencia | NA | ¿? |
| Tsai, 2011 (33) | 15 (10 ped + 5 ad) (6 TIA, 9 TMV) | Luminex | SÍ | SÍ | · Asociación DSA-Rx · DSA → ↑ gravedad | NA | NA | Rituximab (inducción) |
| Abu-Elmagd, 2012 (34) | 194 adultos (97 TIA, 26 TMVM, 26 THI, 45 TMV) | PRA ELISA Luminex | SÍ | SÍ | · DSA preTx: ↑ incidencia y gravedad · CDC-XM+: ↑ riesgo a 1 año | · DSA preTx y <i>de novo</i> ↓ supervivencia a 5 años | Tendencia protectora sin asociación estadística | IVIG (inducción en DSA preTx+) |
| Gerlach, 2014 (35) | 30 adultos (18 TIA, 2 TMVM, 10 TMV) | ELISA Luminex | SÍ | SÍ | · Análisis descriptivo de los pacientes con DSA | NA | NA | IVIG y rituximab (con aparición de DSA) |

Tabla 11. Estudios en la literatura sobre el papel de los DSA en el TxI (continuación).

| Estudio | N | Método | PreTx | PosTx | Rechazo (Rx) | Supervivencia injerto | Hígado | Desensibilización |
|----------------------|---|---------|-------|-------|---|--|---|---|
| Kubal, 2015 (36) | 79 (20 ped + 59 ad) (27 TIA, 12 TMVM, 40 TMV) | Luminex | Sí | Sí | · No correlación con Rx | · No diferencias | · No diferencias | Rituximab (inducción) |
| Cheng, 2017 (37) | 109 (75 ped + 34 ad) (21 TIA, 8 TMVM, 57 THI, 23 TMV) | Luminex | Sí | Sí | · DSA persistentes ↑ riesgo a 5 años. | · DSA persistentes ↓ supervivencia a 5 años | · Efecto protector no relacionado con DSA | IVIG, plasmaféresis y rituximab (inducción en XM+) |
| Petit, 2017 (133) | 22 pediátricos (11 TIA, 1 TMVM, 7 THI, 3 TMV,) | Luminex | Sí | Sí | · DSA de clase II relacionados con Rx mediado por anticuerpos | · NA | · NA | IVIG, plasmaféresis y rituximab (tratamiento de rechazo con DSA) |

CDC: citotoxicidad dependiente de complemento; ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas; IVIG: inmunoglobulina intravenosa; NA: no analizado; PRA: panel de reactividad antigénica; TIA: trasplante de intestino aislado; THI: trasplante hepato-intestinal; TMV: trasplante multivisceral; TMVM: trasplante multivisceral modificado; XM: prueba cruzada.

3.4. Anticuerpos no anti-HLA

Existen evidencias crecientes que demuestran el papel de anticuerpos frente a antígenos distintos de HLA en el deterioro de los órganos trasplantados. Se ha observado que los anticuerpos frente al sistema polimórfico MICA se asocian con más rechazo y menor supervivencia en injertos renales (134-138). Si bien su relevancia en el injerto intestinal no ha sido aún descrita, las moléculas MICA se expresan de manera constitutiva en las células del epitelio intestinal (139, 140), por lo que el estudio de estos de anticuerpos puede resultar de gran interés y relevancia.

Respecto al papel de otros anticuerpos asociados a rechazo y/o a pérdida del injerto que se han descrito en trasplante renal y hepático, solo existe un estudio en TxI de Gerlach y colaboradores en el que se describe la relación de anticuerpos anti-receptor tipo 1 de angiotensina II (AT1R) y anti-receptor de endotelina tipo A (141).

3.5. Poblaciones linfocitarias

La determinación en sangre periférica de las poblaciones linfocitarias más frecuentes (LT CD4 y CD8, LB y NK) se realiza de manera rutinaria en la mayoría de los laboratorios de inmunología y resulta de gran utilidad para la evaluación del estatus inmunológico del receptor, así como del efecto de diversos fármacos inmunosupresores deplecionantes que se usan en la inducción o en el tratamiento del rechazo en el TxI. Algunos estudios en TxI pediátrico han demostrado que factores como un mayor número de linfocitos totales, LT CD8 y células NK antes del trasplante predisponen al rechazo del injerto (142). Además, se ha observado que

el número de LT citotóxicos CD154+ donante-específicos identifica a los receptores en riesgo de rechazo con una sensibilidad y especificidad del 93 y 88% respectivamente (143).

3.6. Producción linfocitaria de ATP (Immuknow®)

El test Immuknow® aprobado por la FDA mide la producción de ATP de las células T CD4+ estimuladas por mitógenos considerándose una estimación funcional del nivel de inmunosupresión del paciente. Algunos estudios tempranos mostraron que los niveles altos de ATP (indicativos de inmunosupresión insuficiente) se asocian a riesgo de rechazo agudo y niveles bajos (indicativos de inmunosupresión excesiva) se asocian a mayor riesgo de infección. Mientras que la relación entre niveles bajos de ATP y riesgo infeccioso parece más sólidamente establecida en la literatura, la relación entre exceso de ATP y rechazo no se ha podido confirmar en todos los estudios realizados. El trabajo realizado en 20 receptores adultos de TxI valida la utilidad de este test, especialmente para la identificación de pacientes en riesgo inmunológico bajo (144). Sin embargo, aunque la medición de ATP evalúa el estatus inmunológico general del paciente no refleja la reactividad T específicamente dirigida contra el aloinjerto.

3.7. Marcadores moleculares

Desde la genética clásica a la identificación de especies bacterianas gracias a la secuenciación masiva, son varios los marcadores moleculares que se han identificado en relación al rechazo del injerto.

Los primeros en describirse fueron los **polimorfismos en NOD2**, un receptor intracelular de

macrófagos, DC y algunas IEC que regula la síntesis de péptidos antimicrobianos. Los cambios en este gen se reportaron inicialmente asociados a enfermedad de Crohn (145-147), lo que indujo a Fishbein y colaboradores a estudiar este gen en el contexto del TxI. No solo hallaron una mayor proporción de estos polimorfismos entre los receptores de TxI, sino que además la probabilidad de fallo del injerto era hasta 100 veces mayor en aquellos que presentaban las variantes genéticas (148, 149).

La disponibilidad de medir expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real desde hace algo más de una década y en los últimos años también el desarrollo de la secuenciación masiva ha permitido la identificación de **mRNA** y **miRNA** (pequeños RNA no codificantes que regulan procesos celulares) significativos en la evolución del trasplante. Un estudio de la expresión génica en biopsias intestinales con rechazo demostró en ellas el aumento en la expresión de IL1R2, ICAM1, granzima B (GRZB) y CCL3, moléculas implicadas en inflamación, migración celular, citotoxicidad y activación linfocitaria (150). Otro trabajo puso de manifiesto la diferencia de expresión en sangre periférica de los genes TBX21, CCL5, GNLY, SLAMF7, TGFBR3, NKG7, SYNE1, y GK5, que se encontraron sobre-expresados en los pacientes que rechazaron (151). Un tercer estudio reveló la correlación positiva entre el rechazo y la expresión en el injerto de los miRNAs miR-142-3p, miR-886-3p and miR-132, que tienen un papel crítico en la activación de las células infiltrantes en el injerto durante el rechazo (152). Si bien es necesaria la validación y estandarización de estos mRNA y miRNA, estos trabajos muestran su potencial utilidad como biomarcadores sensibles y fáciles de cuantificar de forma rápida en un laboratorio clínico.

Además de los marcadores genéticos, el estudio de los metabolitos o **metaboloma** ha servido

también para identificar marcadores diferenciales de rechazo en TxI. En su estudio del fluido de la ileostomía, Girlanda y colaboradores hallan un total de 477 metabolitos diferencialmente expresados entre los fluidos de pacientes con rechazo y los de pacientes sin rechazo. El leucotrieno E4, las vitaminas B2, B5 y B6 y el taurocolato (una sal resultante de los ácidos biliares) fueron los que se encontraron en más abundancia en los episodios de rechazo (153).

Queda por último mencionar en este apartado el estudio del **microbioma**. Este término hace referencia a la comunidad global de microorganismos, incluyendo bacterias, parásitos, hongos y virus, que pueblan nuestro organismo, y que probablemente constituyen la fuente principal de exposición microbiana para nuestro sistema inmune. El interés del análisis del microbioma en relación con el trasplante radica en los conceptos de que la inmunosupresión necesaria para evitar el rechazo va a alterar profundamente el microbioma del paciente. Y por su parte, el microbioma, a través de su influencia en la activación del sistema inmune, tiene capacidad de impactar de forma importante en el resultado del trasplante (154, 155). Un estudio de la Universidad de Nebraska, pionero en este campo describió que, de forma muy diferente a lo que se observa en intestinos de individuos sanos, las comunidades microbianas del intestino de los pacientes trasplantados están dominadas por lactobacilos y enterobacterias, demostrando además que los episodios de rechazo eran coincidentes con una notable alteración (disbiosis) en las comunidades que habitan el injerto intestinal en ausencia de rechazo (156).

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

El TxI es el tratamiento del fallo crónico intestinal en pacientes que experimentan complicaciones graves de la nutrición parenteral. El intestino es un órgano complejo y fascinante desde el punto de vista inmunológico, ya que contiene el 80% de la totalidad de las células del sistema inmune. Tras el TxI, las células linfoides procedentes del sistema inmune del donante deben ser sustituidas por las del receptor, pudiendo éstas desarrollar una respuesta aloinmune en el tejido linfoide secundario del propio injerto. En paralelo, para una inmunidad intestinal correcta se requiere el desarrollo de tolerancia frente a antígenos de la dieta y microbios comensales.

El rechazo agudo es la principal causa de fallo del injerto intestinal y se da con más frecuencia y mayor severidad que en otros TOS debido a la elevada inmunogenicidad que presenta. Infecciones, EICH, PTLD o reacciones autoinmunes son otras complicaciones importantes, que resultan de un complejo balance del sistema inmune.

En la actualidad, la valoración del estado del injerto se realiza mediante control endoscópico y análisis histológico de biopsias intestinales, pero los hallazgos no siempre son suficientes para dar un diagnóstico preciso y a tiempo. Por ello, resulta necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan una mejor monitorización del injerto intestinal, así como la profundización en los mecanismos celulares y moleculares de los procesos de adaptación, tolerancia y rechazo del injerto que sienten las bases para el desarrollo de terapias nuevas y específicas de este órgano.

Nuestro grupo clínico y de investigación en Inmunología colabora de forma estrecha con los dos únicos programas de TxI activos en nuestro país: el infantil, en el Hospital Universitario La Paz, y el de adultos en el Hospital Universitario 12 de Octubre (157, 158). La vinculación con esta actividad clínica tan exclusiva y especializada nos ha brindado la oportunidad de realizar los estudios cuyos resultados se reúnen en esta tesis, con los que queremos comprender mejor los problemas que aún persisten, ofrecer herramientas que mejoren los resultados en los pacientes y, en definitiva, contribuir en lo posible al avance del área del TxI.

HIPÓTESIS

El análisis de subpoblaciones linfocitarias y de expresión génica en biopsias intestinales, así como de la alorrespuesta humoral en los receptores de TxI, va a proporcionar:

- Conocimiento sobre moléculas y mecanismos que intervienen en la adaptación y tolerancia del injerto sobre los que poder actuar para atenuar la alorrespuesta.
- Biomarcadores asociados a rechazo, supervivencia del injerto y otros parámetros de la evolución del trasplante.

OBJETIVOS GENERALES

1. Analizar el papel de los anticuerpos anti-HLA donante específicos, preformados y de aparición posterior al trasplante, en el rechazo y la supervivencia de los injertos.
2. Evaluar los factores que afectan a la generación y evolución de los alo-anticuerpos.
3. Entender la dinámica de repoblación linfoide de los injertos intestinales mediante el estudio longitudinal en el tiempo de las poblaciones linfocitarias del epitelio intestinal, comparando con muestras obtenidas de controles sanos.

4. Profundizar en la caracterización fenotípica y funcional de las poblaciones de IEL más alteradas y analizar cómo contribuyen en la evolución de los injertos.
5. Identificar mediante el estudio del transcriptoma de biopsias de injertos intestinales patrones de genes que se encuentren diferencialmente expresados y asociados con rechazo.
6. Determinar una firma molecular de pocos genes y establecer un modelo matemático de predicción de rechazo que resulte aplicable en la práctica clínica.

CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1:

Donor-specific antibodies in pediatric intestinal and multivisceral transplantation: the role of liver and HLA mismatching.

Paloma Talayero, Esther Ramos Boluda, Elena Gómez Massa, María José Castro Panete, Gerardo Prieto Bozano, Jorge Calvo Pulido, Estela Paz Artal, Esther Mancebo

Liver Transplantation, 2018 Aug 16. doi: 10.1002/lt.25323

OBJETIVOS

El rechazo es uno de los mayores inconvenientes para la supervivencia del injerto y del paciente después del TxI y se maneja principalmente con terapias inmunosupresoras centradas en los mecanismos de la alorrespuesta mediada por células. Sin embargo, muchos de los episodios son refractarios a estos tratamientos, lo que sugiere la existencia de un componente inmune humoral que desempeña un papel prominente en el rechazo. La relación entre la presencia de DSA y una mayor incidencia de rechazo y pérdida del injerto está bien descrita en muchos TOS. En los últimos años algunos estudios han reportado el impacto de los DSA en la evolución del injerto intestinal, aunque la experiencia sigue siendo limitada y los resultados contradictorios. El papel de posibles factores que influyen en la generación de los DSA_{dn}, como pueden ser la inclusión del hígado en el injerto y la compatibilidad HLA, ha sido abordado por ciertos grupos, presentando también disparidad en los hallazgos obtenidos. Debido a que el diagnóstico del rechazo en el TxI se basa en el análisis histológico de las biopsias y que no distingue entre rechazo celular y humoral, es necesaria la búsqueda de biomarcadores que permitan identificar y monitorizar el componente humoral.

Considerando estos antecedentes y tomando como población de estudio una cohorte de 36 receptores pediátricos (43 trasplantes) del Hospital Universitario Infantil de La Paz, los objetivos planteados son:

1. Analizar el estado de sensibilización previa al trasplante de los receptores, así como los factores que contribuyen a la misma.
2. Evaluar el impacto de los DSA preformados sobre el rechazo y la supervivencia del injerto.
3. Determinar las características de los DSA_{dn} (especificidades, intensidad y capacidad de fijación de complemento) y su relación con el rechazo.

4. Estudiar el impacto de los DSAdn en el rechazo y la supervivencia del injerto.
5. Determinar los factores que influyen en la generación de DSAdn, con especial atención a la inclusión del hígado y la compatibilidad HLA.
6. Evaluar el papel del hígado en el rechazo y la supervivencia del injerto.

CONCLUSIONES

1. La tasa de sensibilización preTx en los receptores pediátricos es del 14% (11.6% con DSA), siendo el trasplante previo el principal factor de riesgo (*odds ratio*=44.85; $p=0.001$).
2. Los DSA preformados no constituyen un factor de riesgo ni para el rechazo ni para la supervivencia del injerto a 3 años postTx.
3. Los DSAdn son en su mayoría poliespecíficos y dirigidos frente a HLA de clase II. Además, suelen presentar una intensidad media de fluorescencia elevada (> 10000 ; se considera positivo a partir de 500) y capacidad fijadora de complemento.
4. Los DSAdn confieren un mayor riesgo de rechazo (*hazard ratio*=11.0; $p=0.01$) y peor supervivencia del injerto (*hazard ratio* =66.52; $p<0.001$) a 5 años postTx.
5. La inclusión del hígado en el injerto resulta un factor de protección para la generación de DSAdn (OR=0.07; $p=0.007$), correlacionando además por sí mismo con mayor supervivencia del injerto a 5 años postTx (*hazard ratio* =0.21; $p=0.02$).
6. La incompatibilidad HLA entre donante y receptor no supone un factor de riesgo para el desarrollo de DSAdn.

CAPÍTULO 1
PUBLICACIÓN



Article type : Original Articles

LT-18-205.R2

Clean copy

Title: Donor-specific antibodies in pediatric intestinal and multivisceral transplantation: the role of liver and HLA mismatching

Authors:

Paloma Talayero^{1,2}, Esther Ramos Boluda³, Elena Gómez Massa^{1,2}, María José Castro Panete¹, Gerardo Prieto Bozano³, Jorge Calvo Pulido⁴, Estela Paz-Artal^{1,2,5,6}, Esther Mancebo^{1,2,5}

Affiliations:

¹ Department of Immunology, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

² I+12 Research Institute, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

³ Pediatric Gastroenterology Intestinal Rehabilitation Unit, University Pediatric Hospital La Paz, Madrid, Spain

⁴ Department of General and Digestive Surgery and Abdominal Organ Transplantation, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/lt.25323

This article is protected by copyright. All rights reserved.

⁵ School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

⁶ Section of Immunology, San Pablo CEU University, Madrid, Spain

Keywords: humoral allosensitization, abdominal organ transplantation, allograft rejection, allograft survival, immunological monitoring.

Abbreviations:

AZA, azathioprine

CE, corticosteroids

CDC, complement dependent cytotoxicity

DSA, donor specific antibodies

dnDSA, *de novo* donor specific antibodies

FK, tacrolimus

GVHD, graft-versus-host disease

HR, hazard ratio

ITx, intestinal transplantation

MFI, mean fluorescence intensity

mTORi, mammalian target of rapamycin inhibitor

OR, odds ratio

posTx, post-transplantation

preTx, pre-transplantation

PTLD, post-transplant lymphoproliferative disease

SFI, standard fluorescence intensity

Tx, transplant

XM, crossmatch

Funding: Funding for this study was obtained from projects 13/00045 and 13/01407 to E. P-A (Instituto de Salud Carlos III, Spain, cofounded by the European Regional Development Fund) and project 13/0068 to J. C-P (Fundación Mutua Madrileña).

Disclosure: The authors declare no conflicts of interest.

Correspondence: Paloma Talayero. Avenida de Córdoba s/n, 28041, Madrid, Spain. paloma.talayero@salud.madrid.org.

Abstract:

Rejection is one of the most important drawbacks for graft and patient survival in intestinal and multivisceral transplantation. However, there is no consensus on the diagnostic criteria for humoral rejection and the literature about the role of donor specific antibodies (DSA) on the allograft outcome and the risk factors that contribute to their development is scant with contradictory results. The present study analyzes the role of DSA exclusively in a pediatric cohort of 43 transplants. Among our patients, 11.6% showed preformed DSA, but they did not correlate with more rejection or less allograft survival. Having previous transplants was the main sensitization factor with an odds ratio = 44.85 ($p=0.001$). 16.3% of recipients developed *de novo* DSA, mostly directed against HLA class II, polyspecific and complement fixing. Additionally, the presence of *de novo* DSA had a deleterious effect on graft rejection (hazard ratio=11.00; $p=0.01$) and survival (hazard ratio=66.52; $p<0.001$) in an observational period of 5 years post-transplantation. The inclusion of the liver emerged as the main protective factor against *de novo* DSA

development with an odds ratio = 0.07 (p=0.007). The analysis of HLA compatibility at serological and epitope level with the computational tools HLAMatchmaker and PIRCHE revealed no association between HLA mismatching and *de novo* DSA. In conclusion, this study performed in pediatric recipients shows the deleterious effect of *de novo* DSA on intestinal transplantation supported by the complement fixing activity observed. Additionally, the liver inclusion in the allografts showed to be a protective factor against *de novo* DSA generation.

Introduction

Improvement of the surgical and therapeutic techniques has increased the survival of all solid organ transplants. Also, the advances in rejection diagnosis and an accurate categorization of humoral and cellular rejection have allowed the optimization of treatment guidelines. However, in the field of intestinal transplantation (ITx) acute and chronic rejection is still an important drawback for graft and patient survival (1, 2). There is still no consensus on the diagnostic criteria for humoral rejection and, although there is growing evidence of the negative impact of donor specific antibodies (DSA), intestinal rejection continues to be managed with immunosuppressive therapies focused on the cellular mechanisms of the immune response. In recent years some studies have reported the impact of DSA in intestinal graft outcome (3-7), but the experience is still limited and some results are controversial. The relationship between the presence of DSA and an increased incidence of rejection and allograft loss is well recognized in solid organ transplantation (8), and progresses have been made in defining which antibodies are really deleterious, demonstrating worse prognosis with complement fixing DSA in

kidney, liver, heart and lung transplantation (9-12). In ITx only the recent work of Rabant and coworkers reported the C1q binding activity (13).

The liver inclusion in multivisceral and hepato-intestinal transplants has been described to have a beneficial effect on allograft outcome (7, 14-17), although some authors reported better results in isolated intestinal grafts (18, 19). Histocompatibility mismatching has also been associated with dnDSA emergence in some studies but again the results are controversial (4-7).

To date, the majority of studies about DSA in ITx have been performed in adult or combined adult and pediatric cohorts, which could explain the high heterogeneity of the results obtained. However, it is well known that findings in the field of transplantation in adults cannot be extrapolated to the pediatric population, as their immunological status and background is quite different. Only Petit and coworkers have recently reported their experience in an exclusively pediatric cohort, but their study was mostly descriptive and no long-term survival analysis was performed (20).

In the present work, we aimed to analyze the impact of preformed and dnDSA on graft rejection and survival of the unique Spanish ITx pediatric cohort. We also studied dnDSA characteristics (specificities, intensity and complement fixing ability) and the factors potentially related to their appearance, paying special attention to liver inclusion and HLA mismatching.

Materials and Methods

Patients

The cohort included 36 recipients (with 43 transplant procedures) transplanted in University Pediatric Hospital La Paz between 2002 and 2017 (follow-up mean time 3.7 years) (Table 1). From the 43 transplants, 33 were liver-inclusive grafts (5 liver-

intestine and 28 multivisceral) and 10 excluded the liver (8 isolated intestinal grafts and 2 modified multivisceral).

Standard induction protocol was based in corticosteroids plus basiliximab therapy. Alemtuzumab was used in patients over 4 years old with preformed anti-HLA antibodies. Peri-transplant desensitization against preformed DSA with plasmapheresis, gamma-globulin and rituximab was performed since 2010 onwards, when DSA started to be studied routinely. In more detail, a single dose of gamma-globulin (0.5 gr/kg) was administered just prior transplantation in patients with preformed anti-HLA antibodies, and it was repeated if the crossmatch resulted positive. When the presence of DSA was confirmed by Single Antigen study, plasmapheresis and a maximum of 4 more doses of gamma-globulin were alternated daily until DSA levels were reduced. Rituximab was also administered in boluses of 375 mg/m² once a week with a maximum of 4 weeks.

Maintenance immunosuppression protocol was based only on tacrolimus (blood concentration 10–15 ng/mL until the third month, and between 5-10 ng/mL from the third month onwards) when induction was made with alemtuzumab or thymoglobulin as previously reported (21-24). Induction with basiliximab also required a maintenance therapy with low-dose of corticosteroids (0.25 mg/kg on alternate days). Sirolimus was considered a) when tacrolimus-related side effects appeared (such as nephrotoxicity or hematological disorders), b) if the patient developed post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) or graft-versus-host disease (GVHD) refractory to the standard treatment (consisting of rituximab and decreasing tacrolimus dose for PTLD, and corticosteroids with tacrolimus reduction for GVHD) or c) with one or more rejection episodes refractory to the standard treatment. The dose of sirolimus was adjusted to achieve blood levels in the 5–10 ng/mL range.

Acute rejection episodes were initially managed with an increase of tacrolimus dosages (up to 15-20 ng/mL) and methylprednisolone boluses of 20 mg/kg/day for 3 days, followed by decreasing doses for 5 days (10, 7, 5, 2, 1 mg/kg/day). For corticosteroid-resistant episodes, thymoglobulin (1.5-2 mg/kg/day for 7-14 days), alemtuzumab (0.5 mg/kg in a single dose) or infliximab (5 mg/kg once a week for 3-4 weeks) were administered.

Graft monitoring was based on symptoms and endoscopic biopsies were taken only when rejection was clinically suspected. Rejection diagnosis was made based on both clinical and histological data. Clinical symptoms included fever, nausea and vomiting, diarrhea, abdominal pain and distension, and increased stomal effluent volume. Histological diagnosis (examined by at least two independent pathologists) was made according to previously reported criteria (25, 26).

HLA typing

Donor typing was performed by microlymphocytotoxicity assay for HLA-A and B (Lambda Monoclonal Typing Tray Set, One Lambda, USA) until October 2015 and thereafter by Sequence Specific Primers Polymerase Chain Reaction (SSP-PCR) including also HLA-C typing (Micro SSP™ Generic HLA Class I DNA Typing Tray, One Lambda, USA). HLA-DR and DQ typing was performed by SSP-PCR (Micro SSP™ Generic HLA Class II DNA Typing Tray, One Lambda, USA).

Anti-HLA antibodies and C1q binding assay

Sera collected up to 2010 were retrospectively studied. From this year on, they were prospectively screened for DSA pre-transplant (preTx), at 15 days, 3 and 6 months post-transplant (postTx) and every six months thereafter or if clinical events

appeared. Anti-HLA antibodies were tested by multiplex microsphere-based flow cytometry assay (Luminex Technology) in non-diluted serum samples. LABScreen Mixed (LSM) kit (One Lambda, USA) was first used to determine the presence of anti-HLA antibodies. The test was considered positive when anti-HLA class I standard fluorescence intensity (SFI) was >15000 and anti-HLA class II SFI >20000. HLA specificities were determined with LABScreen Single Antigen (LSA) kit (One Lambda, USA) in samples with positive anti-HLA antibodies. Mean fluorescence intensity (MFI) under 1000 was considered negative. Positive reactions were stratified in weak (MFI between 1000-2000), intermediate (MFI between 2000-5000) and strong (MFI >5000). C1q binding was tested in LSA-positive samples with the C1qScreen™ kit (One Lambda, USA). PE conjugated goat anti-human IgG (One Lambda, USA) was used as secondary antibody in LSM and LSA.

During transplantation complement-dependent cytotoxicity crossmatch was also performed to assess the presence of complement-fixing DSA.

HLA epitope analysis (HLAMatchmaker and PIRCHE)

Both donors and recipients' genotypes included A, B, DR and DQ typing. Missing typings were inferred from HLA-ABDRDQ-haplotype frequencies based on The Allele Frequency Net Database (<http://www.allelefrequencies.net/>).

HLAMatchmaker eplets were assigned based on HLAMatchmaker version 2.1. The number of mismatched eplets was determined as the number of donor eplets that were absent in the recipient's HLA-A-B-DR and -DQ loci.

The HLA-derived mismatched peptide epitopes that can be presented by the recipients' HLA-DRB1 molecules were calculated using the latest version of the PIRCHE algorithm (version 2.4). HLA genotypes were introduced as low-resolution

level (two digits) and the National Marrow Donor Program database 2007 for Europeans was used as reference.

Statistical analysis

Significance of differences was determined by Fisher's exact test or Chi-square test when comparing categorical data frequencies and by U Mann-Whitney test when comparing quantitative data. Survival analysis was performed according to the Kaplan-Meier method and compared among groups by log-rank analysis. Cox regression was used in the multivariate analysis of significant variables. P values < 0.05 were considered statistically significant. The software packages GraphPad Prism (v 5.02) and SPSS were used for statistical analysis.

Results

Effect of preformed DSA and peri-transplant desensitization

PreTx sera were screened for anti-HLA class I and II antibodies. Sensitization was observed in 14 % of the recipients (n=6), being DSA in the 11.6% (n=5). Having previous transplants was the main sensitization factor with an odds ratio (OR)=44.85 (0.95 confidence interval (CI): 2.19 to 919.22; p=0.001) (Table 1), as every patient with preformed DSA had already received a previous intestinal/multivisceral allograft. Data of graft type, causes of previous graft loss and time to retransplantation are summarized in Table S1.

Preformed DSA did not emerge as a risk factor for allograft rejection and survival in an observational period of 3 years postTx (Fig. 1). When analyzing patients in depth with preformed DSA (Table 2), we observed that none of the recipients that were desensitized suffered rejection during the first year postTx. Additionally, 2 of them

cleared their antibodies after the treatment. Regarding non-desensitized recipients, patient 4 lost the graft one month after transplantation because of a lymphoma (so the possible deleterious role of DSA could not be assessed) and in patient 5, DSA were not complement fixing, correlating with a negative crossmatch.

Interestingly, the preformed DSA group showed a significant higher frequency ($p=0.02$) of PTLD (Table 1). The stronger immunosuppression received in these patients could make them prone to suffer lymphoproliferative disorders.

Characterization and impact of dnDSA on the allograft

In the postTx period study, 7 recipients (16.3%) developed dnDSA (Table 3). In most cases dnDSA were polyspecific, being anti-HLA class II antibodies the most frequent (in 6 recipients). In 5 recipients, dnDSA had a MFI higher than 10000, which correlated also with a positive C1q binding assay. Neither a MFI>10000 nor C1q binding were statistically significant as risk factors for rejection, probably due to the low number of recipients per group (Fig. 2A). However, it is remarkable that none of patients negative in the C1q binding assay and with MFI<10000 developed rejection, whereas 4 out of the 5 patients C1q-positive and with MFI>10000 did (Table 3).

Regarding the impact of dnDSA on allograft outcome, we observed the deleterious effect on graft rejection (hazard ratio (HR)=11.00; 0.95 CI: 1.72 to 70.08; $p=0.01$) and survival (HR=66.52, 0.95 CI: 10.45 to 423.61; $p<0.001$) when compared to recipients without DSA (*de novo* or preformed) in an observational period of 5 years postTx (Fig. 2B and 2C). In the multivariate analysis (Table 4) that included factors that also affected allograft survival and rejection (as the induction and maintenance therapy, PTLD, liver inclusion or the underlying disease), only dnDSA remained as

an independent risk factor for allograft survival (HR=6.54; 0.95 CI: 1.32 to 34.35; p=0.02).

Detailed data about rejection episodes (severity, timing, treatment and outcome) in both groups are summarized in Table S2.

Effect of liver-inclusive grafts on dnDSA generation

Among the possible factors that could be associated with dnDSA development, only the inclusion of the liver in the graft emerged as a protective factor (Table 1). 50% of patients (5 out of 10) not receiving the liver in the allograft developed dnDSA compared to 7% of patients (2 out of 29) with liver-inclusive allografts (OR=0.07; 0.95 CI: 0.01 to 0.49; p=0.007) (Fig. 3A).

The liver also showed to have a protective role in the intestinal graft outcome, with higher survival of liver-inclusive allografts at 5 years postTx (HR=0.21; 0.95 CI: 0.06 to 0.82; p=0.02) (Fig. 3B). In addition, transplants including the liver showed a trend towards lower rejection episodes in comparison to transplants without liver, although the difference did not reach significance (Fig. 3C).

HLA mismatching impact on dnDSA development

We further analyzed whether the donor-recipient HLA mismatching could be related with the generation of dnDSA. Classical serological compatibility in A, B, DR and DQ loci showed to have no effect on dnDSA generation (Table 5). Number of epitope mismatches (AB, DR, DQ and total) calculated with HLAMatchmaker did not appear to be different among recipients with or without dnDSA either. Consistent with these findings, the prediction of the indirectly recognizable HLA epitopes from the donor

presented by recipient HLA DR molecules with PIRCHE tool was not associated with dnDSA development (Table 5).

Discussion

The role of DSA in ITx has been addressed by some groups with different findings about their influence on allograft rejection and survival. Results are also controversial when analyzing the risk factors that contribute to generation of dnDSA. One of the possible reasons for this disparity is the high heterogeneity of the cohorts studied, as adults and children are analyzed together in most cases. However, it is well known that the results obtained in the field of transplantation in adults cannot be extrapolated to the pediatric population, as the immunological status differ between both populations.

The impact of preformed DSA on the allograft evolution is under discussion. Whereas Abu-Elmagd (4) and Cheng (7) described their deleterious effect, Kubal and coworkers (6) reported no impact of preformed DSA on clinical outcomes. In the present work we also observed no negative effect on allograft rejection and survival, although our preformed DSA+ group is actually small (only five patients), which limits the statistical analysis. Differently also from Cheng's study (7), we found retransplantation as a powerful sensitization factor. This contradictory result could be attributed to the fact that their study comprises adult and children recipients. In adults, sensitization is mainly due to transfusions and pregnancy, whereas retransplantation is less frequent.

The frequency of dnDSA in our cohort is much less than those reported by other groups (16.3% vs \approx 30%) (3, 5-7). However, in agreement with these previous studies, dnDSA were mostly polyspecific and directed against HLA-class II among

our patients. In 5 out of the 7 recipients positive for dnDSA, the antibodies showed a very strong reaction (MFI >10000) correlating with a complement-fixing ability. The frequency of C1q-positive observed in the present study (71.4%) is higher than that observed by Rabant and coworkers (13). They recently described worst graft and patient survival in those recipients with complement fixing DSA. Although in our work there was no statistically significant association between C1q activity and rejection (probably due to the small sample size), it is remarkable that no C1q-negative patient developed rejection, whereas 4 out of 5 patients with complement-fixing antibodies did.

Consistent with the high intensity and the complement-fixing activity, we found that dnDSA had a deleterious effect on the allograft outcome, increasing the probability of graft loss more than 60 times and the probability of rejection by 10. Our findings agree with the study of Cheng (7) which showed significantly higher rejection risk and lower 5-years graft survival in patients with DSA maintained along postTx time, but differ from the study of Kubal (6), which described no effect of dnDSA on allograft rejection and survival in an observational period of 3 years.

Some authors have addressed the role of the liver in the development of dnDSA (4, 6, 7), but they failed in demonstrating its protective effect. Although Abu-Elmagd and coworkers reported the role of the liver in clearing preformed DSA and a protective trend (with no significance) in the generation of dnDSA (4), our work is the first one to provide statistical evidences that recipients with liver-inclusive grafts have 0.07 times less probability for the development of dnDSA. Regardless of DSA, liver-inclusive grafts also showed significantly better survival in the univariate analysis in an observational period of five years postTx, with some authors reporting better survival in isolated intestinal grafts (18, 19) and others in liver-containing grafts (7,

14-17). These discordant results may be due to differences in the cohorts and in the survival time studied. When analyzing its effect on allograft rejection, we also observed a protective trend but with no statistical association. Findings about this issue are scant in the literature, with one group showing protection (6) and another reporting no association with rejection (7).

Regarding the role of HLA compatibility in dnDSA emergence in intestinal and multivisceral transplant recipients, Gerlach and coworkers showed a statistical association between dnDSA appearance and the number of total HLA mismatches at serological and at eplet level in A, B, DR and DQ loci (5). Also Kubal reported that having more than 5 HLA mismatches (in A, B, DR loci) was a risk factor for the production of dnDSA (6). Contrarily, Abu-Elmagd (4) and Cheng did not find any correlation with total HLA mismatches, although the latter described 2-antigen DQ mismatch as a significant risk factor (7). In the present work we have analyzed classical serological HLA compatibility and eplet compatibility for A, B, DR and DQ loci, using the novel prediction tool PIRCHE for the first time in ITx. We did not find a correlation between HLA compatibility and dnDSA generation. In our cohort, the majority of the transplants are performed in the absence of donor HLA typing, and the level of HLA mismatching is high in all patients, with an average of 6 mismatches in ABDRDQ. Despite this elevated disparity, the rate of dnDSA in our cohort is lower than that reported by other groups, so other factors may be protecting from the antibody development (as the inclusion of the liver).

Other parameters such as the induction and maintenance immunosuppressive therapies were not associated with the dnDSA production among our recipients either. Interestingly, the induction therapy appeared to be related to allograft rejection and survival in the univariate analysis, showing the induction with

thymoglobulin the worst outcome. The double therapy maintenance showed a better graft survival compared to single or triple therapy. Although these factors lost significance in the multivariate analysis, they should be considered in the future and analyzed in depth in larger cohorts.

Literature about DSA and ITx is scarce with contradictory results about DSA role on the allograft outcome and the risk factors that contribute to their development. Although our study comprises a small cohort, which is a limitation, it provides evidences on the deleterious role of dnDSA in ITx, which are associated to rejection and worse graft survival and points out the protective effect of liver in dnDSA development. Studies in larger cohorts with robust multivariate analysis and the ongoing refinement of HLA typing and DSA detection techniques will allow to draw more solid conclusions for a better management of ITx patients.

Acknowledgments: We thank the technical staff of the laboratory for their essential collaboration in the study.

References:

1. Kubal CA, Mangus RS, Tector AJ. Intestine and multivisceral transplantation: current status and future directions. *Curr Gastroenterol Rep.* 2015;17(1):427.
2. Martinez Rivera A, Wales PW. Intestinal transplantation in children: current status. *Pediatr Surg Int.* 2016;32(6):529-40.
3. Tsai HL, Island ER, Chang JW, Gonzalez-Pinto I, Tryphonopoulos P, Nishida S, et al. Association between donor-specific antibodies and acute rejection and resolution in small bowel and multivisceral transplantation. *Transplantation.* 2011;92(6):709-15.

4. Abu-Elmagd KM, Wu G, Costa G, Lunz J, Martin L, Koritsky DA, et al. Preformed and de novo donor specific antibodies in visceral transplantation: long-term outcome with special reference to the liver. *Am J Transplant.* 2012;12(11):3047-60.
5. Gerlach UA, Lachmann N, Sawitzki B, Arsenic R, Neuhaus P, Schoenemann C, et al. Clinical relevance of the de novo production of anti-HLA antibodies following intestinal and multivisceral transplantation. *Transpl Int.* 2014;27(3):280-9.
6. Kubal C, Mangus R, Saxena R, Lobashevsky A, Higgins N, Fridell J, et al. Prospective Monitoring of Donor-specific Anti-HLA Antibodies After Intestine/Multivisceral Transplantation: Significance of De Novo Antibodies. *Transplantation.* 2015;99(8):e49-56.
7. Cheng EY, Everly MJ, Kaneku H, Banuelos N, Wozniak LJ, Venick RS, et al. Prevalence and Clinical Impact of Donor-Specific Alloantibody Among Intestinal Transplant Recipients. *Transplantation.* 2017;101(4):873-82.
8. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant.* 2003;3(6):665-73.
9. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med.* 2013;369(13):1215-26.
10. O'Leary JG, Kaneku H, Banuelos N, Jennings LW, Klintmalm GB, Terasaki PI. Impact of IgG3 subclass and C1q-fixing donor-specific HLA alloantibodies on rejection and survival in liver transplantation. *Am J Transplant.* 2015;15(4):1003-13.
11. Svobodova E, Gazdic T, Kubanek M, Vymetalova J, Voska L, Kment M, et al. Novel insights into pretransplant allosensitization in heart transplant recipients in the

contemporary era of immunosuppression and rejection surveillance. *Transpl Int.* 2016;29(1):63-72.

12. Smith JD, Ibrahim MW, Newell H, Danskine AJ, Soresi S, Burke MM, et al. Pre-transplant donor HLA-specific antibodies: characteristics causing detrimental effects on survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2014;33(10):1074-82.

13. Rabant M, Racape M, Petit LM, Taupin JL, Aubert O, Bruneau J, et al. Antibody-mediated rejection in pediatric small bowel transplantation: Capillaritis is a major determinant of C4d positivity in intestinal transplant biopsies. *Am J Transplant.* 2018.

14. Abu-Elmagd KM, Costa G, Bond GJ, Soltys K, Sindhi R, Wu T, et al. Five hundred intestinal and multivisceral transplantations at a single center: major advances with new challenges. *Ann Surg.* 2009;250(4):567-81.

15. Farmer DG, Venick RS, Colangelo J, Esmailian Y, Yersiz H, Duffy JP, et al. Pretransplant predictors of survival after intestinal transplantation: analysis of a single-center experience of more than 100 transplants. *Transplantation.* 2010;90(12):1574-80.

16. Grant D, Abu-Elmagd K, Mazariegos G, Vianna R, Langnas A, Mangus R, et al. Intestinal transplant registry report: global activity and trends. *Am J Transplant.* 2015;15(1):210-9.

17. Ueno T, Fukuzawa M. Current status of intestinal transplantation. *Surg Today.* 2010;40(12):1112-22.

18. Grant D, Abu-Elmagd K, Reyes J, Tzakis A, Langnas A, Fishbein T, et al. 2003 report of the intestine transplant registry: a new era has dawned. *Ann Surg.* 2005;241(4):607-13.

19. Sudan D. The current state of intestine transplantation: indications, techniques, outcomes and challenges. *Am J Transplant*. 2014;14(9):1976-84.

20. Petit LM, Rabant M, Canioni D, Suberbielle-Boissel C, Goulet O, Chardot C, et al. Impacts of donor-specific anti-HLA antibodies and antibody-mediated rejection on outcomes after intestinal transplantation in children. *Pediatr Transplant*. 2017;21(2).

21. Reyes J, Mazariegos GV, Abu-Elmagd K, Macedo C, Bond GJ, Murase N, et al. Intestinal transplantation under tacrolimus monotherapy after perioperative lymphoid depletion with rabbit anti-thymocyte globulin (thymoglobulin). *Am J Transplant*. 2005;5(6):1430-6.

22. Abu-Elmagd KM, Costa G, Bond GJ, Wu T, Murase N, Zeevi A, et al. Evolution of the immunosuppressive strategies for the intestinal and multivisceral recipients with special reference to allograft immunity and achievement of partial tolerance. *Transpl Int*. 2009;22(1):96-109.

23. Trevizol AP, David AI, Dias ER, Mantovani D, Pecora R, D'Albuquerque LA. Intestinal and multivisceral transplantation immunosuppression protocols--literature review. *Transplant Proc*. 2012;44(8):2445-8.

24. Kimura T, Lauro A, Cescon M, Zanfi C, Dazzi A, Ercolani G, et al. Impact of induction therapy on bacterial infections and long-term outcome in adult intestinal and multivisceral transplantation: a comparison of two different induction protocols: daclizumab vs. alemtuzumab. *Clin Transplant*. 2009;23(3):420-5.

25. Wu T, Abu-Elmagd K, Bond G, Nalesnik MA, Randhawa P, Demetris AJ. A schema for histologic grading of small intestine allograft acute rejection. *Transplantation*. 2003;75(8):1241-8.

26. Ruiz P, Bagni A, Brown R, Cortina G, Harpaz N, Magid MS, et al. Histological criteria for the identification of acute cellular rejection in human small bowel allografts: results of the pathology workshop at the VIII International Small Bowel Transplant Symposium. *Transplant Proc.* 2004;36(2):335-7.

Figure legends:

Fig. 1. Effect of preformed DSA on allograft rejection and survival. P-values were obtained at 3 years by Kaplan-Meier analysis.

Fig. 2. (A) Characteristics of dnDSA and their influence on rejection. P-values were calculated using Fisher's exact test. (B, C) Effect of dnDSA on allograft survival and rejection. P-values were obtained at 5 years by Kaplan-Meier analysis.

Fig. 3. Liver-inclusive grafts protect from *dn*DSA development. (A) Frequency of *dn*DSA in liver-inclusive and liver-exclusive grafts, considering only transplants without preformed DSA. P-value was calculated using Fisher's exact test. (B, C) Effect of liver inclusion on allograft survival and rejection, independently of DSA status. P-values were obtained at 5 years by Kaplan-Meier analysis.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of recipients, with stratification by DSA.

| Characteristics | No DSA (n=32)¹ | Preformed DSA (n=5)² | De novo DSA (n=7)^{2,3} |
|--|--------------------------------------|--|--|
| Recipient female sex, n (%) | 12 (37) | 2 (40) | 2 (28) |
| Recipient age at transplant, years (mean±SD) | 5.3±5.8 | 7.9±5.5 | 6±4.1 |
| Underlying disease, n (%) | | | |
| Short bowel syndrome | 18 (56) | 1 (20) | 3 (42) |
| Motility disorders | 7 (22) | 3 (60) | 2 (29) |
| Malabsorption disorders | 6 (19) | 1 (20) | 2 (29) |
| Others | 1 (3) | 0 | 0 |
| Previous transplants, n (%) | 6 (19) | 5 (100)** | 3 (43) |
| Liver-inclusive allograft, n (%) | 27 (84) | 4 (80) | 2 (29)** |
| Induction therapy, n (%) | | | |
| CE + basiliximab ± AZA | 24 (75) | 2 (40) | 2 (29) |
| Alemtuzumab | 5 (16) | 1 (20) | 3 (42) |
| Thymoglobulin | 3 (9) | 2 (40) | 2 (29) |
| Maintenance therapy, n (%) | | | |
| Single (FK or mTORi) | 8 (25) | 3 (60) | 5 (71) |
| Double (FK or mTORi + CE) | 21 (66) | 1 (20) | 2 (29) |
| Triple (FK + mTORi+ CE) | 3 (9) | 1 (20) | 0 |
| Post-transplant complications | | | |
| GVHD | 2 (6) | 1 (20) | 0 |
| PTLD | 3 (9) | 3 (60)* | 3 (43) |
| Hematological disorders | 4 (12) | 2 (40) | 1 (14) |
| Surgical complications | 4 (12) | 0 | 2 (29) |
| Stage closure with mesh | 9 (28) | 1 (20) | 1 (14) |

¹ Recipients without preformed or *de novo* DSA.

² Comparison vs “no DSA” group. * p-value<0.05; ** p-value<0.01.

³ Includes one recipient with preformed-persistent DSA who developed also *de novo* DSA.

AZA: azathioprine; CE: corticosteroids; FK: tacrolimus; GVHD: graft versus host disease; mTORi: mammalian target of rapamycin inhibitor; PTLT: post-transplant lymphoproliferative disease.

Table 2. Data from recipients with preformed DSA.

| Patient | HLA class | LSM levels* | DSA Specificities | C1q | XM | Desensitization periTx |
|---------|-----------|-------------|---------------------------|-----|----|------------------------|
| 1 | aHLA-I | High | SR: A2, B35, B40 | P | P | Yes** |
| | aHLA-II | High | SR: DR17, DR13, DR52, DQ2 | | | |
| 2 | aHLA-I | High | SR: A30, B35 / IR: B45 | P | P | Yes** |
| | aHLA-II | Medium | SR: DR1, DQ5 | | | |
| 3 | aHLA-I | Low | SR: C7 / IR: B18 | P | P | Yes** |
| | aHLA-II | Low | SR: DQ5 | | | |
| 4 | aHLA-I | Low | IR: B49 / WR: A2 | P | P | No |
| 5 | aHLA-I | High | SR: A2 | N | N | No |

*Low levels < 150000 SFI. Medium levels 150000-350000 SFI. High levels > 350000 SFI.

**Desensitization with plasmapheresis, rituximab and gamma-globulin.

WR: weak reaction (MFI 1500-2000); IR: intermediate reaction (MFI 2000-5000); SR: strong reaction (MFI >5000); Tx: transplant; X

Table 3. Data from recipients with *de novo* DSA.

| Patient | HLA class | Specificities | Max MFI | C1q+ | Rejection |
|---------|----------------|---------------|---------|------|-----------|
| 1 | Class I and II | Polyspecific | > 10000 | Yes | Yes |
| 2 | Class II | Polyspecific | > 10000 | Yes | Yes |
| 3 | Class I and II | Polyspecific | > 10000 | Yes | Yes |
| 4 | Class II | Polyspecific | > 10000 | Yes | Yes |
| 5 | Class II | Polyspecific | > 10000 | Yes | No |
| 6 | Class I | Monospecific | < 10000 | No | No |
| 7 | Class II | Polyspecific | < 10000 | No | No |

MFI: mean fluorescence intensity

Table 4. Allograft rejection and survival univariate (Kaplan-Meier) and multivariate (Cox) analysis in recipients without preformed DSA.

| | Univariate p-value | Multivariate* p- value |
|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Allograft rejection 5 years</i> | | |
| Recipient gender | 0.14 | |
| Recipient age at transplant | 0.18 | |
| Underlying disease | 0.07 | 0.07 |
| Liver-inclusive allograft | 0.32 | |
| Previous transplants | 0.60 | |
| Induction therapy | < 0.001 | 0.08 |
| CE + basiliximab ± AZA | Reference | |
| Alemtuzumab | 0.24 | |
| Thymoglobulin | <0.001 (HR=445.01) | |
| Maintenance therapy | 0.28 | |
| <i>De novo</i> DSA | 0.01 (HR=10.39) | 0.28 |
| PTLD | 0.67 | |
| GVHD | 0.47 | |
| Hematological disorders | 0.69 | |
| Surgical complications | 0.88 | |
| Stage closure with mesh | 0.08 | 0.17 |
| <i>Allograft loss 5 years</i> | | |
| Recipient gender | 0.19 | |
| Recipient age at transplant | 0.15 | |
| Underlying disease | 0.04 | 0.13 |
| Short bowel syndrome | Reference | |
| Motility disorders | 0.24 | |
| Malabsorption disorders | 0.009 (HR=9.06) | |
| Liver-inclusive allograft | 0.01 (HR=0.22) | 0.42 |
| Previous transplants | 0.20 | |
| Induction therapy | 0.003 | 0.48 |

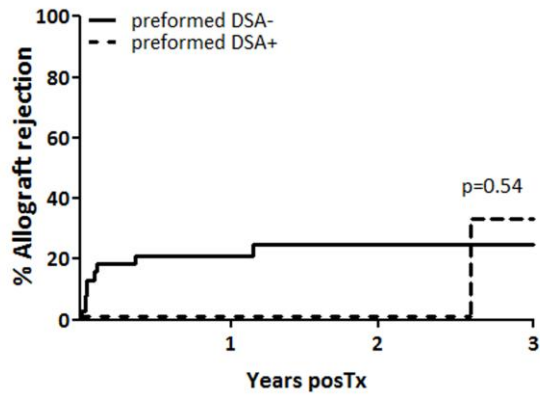
| | | |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| CE + basiliximab ± AZA | Reference | |
| Alemtuzumab | 0.15 | |
| Thymoglobulin | <0.001 (HR=43.89) | |
| Maintenance therapy | 0.03 | 0.78 |
| Single (FK or mTORi) | Reference | |
| Double (FK or mTORi + CE) | 0.02 (HR=0.21) | |
| Triple (FK + mTORi+ CE) | 0.14 | |
| <i>De novo</i> DSA | <0.001 (HR=66.52) | 0.02 (HR=6.54) |
| PTLD | 0.02 (HR=8.71) | 0.61 |
| GVHD | 0.43 | |
| Hematological disorders | 0.64 | |
| Surgical complications | 0.79 | |
| Stage closure with mesh | 0.25 | |

* Variables with a p-value < 0.10 in univariate analysis were considered in the multivariate analysis.

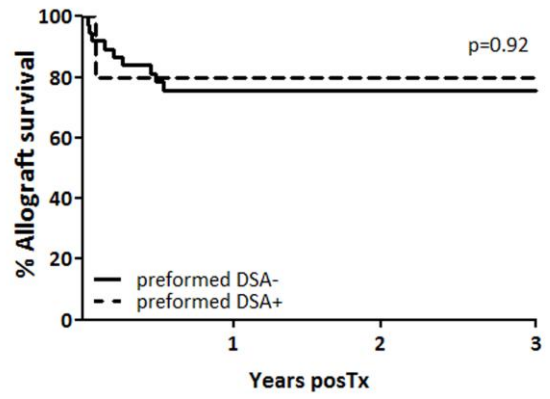
AZA: azathioprine; CE: corticosteroids; FK: tacrolimus; GVHD: graft versus host disease; HR: hazard ratio; mTORi: mammalian target of rapamycin inhibitor; PTLD: post-transplant lymphoproliferative disease.

Table 5. HLA compatibility in dnDSA generation.

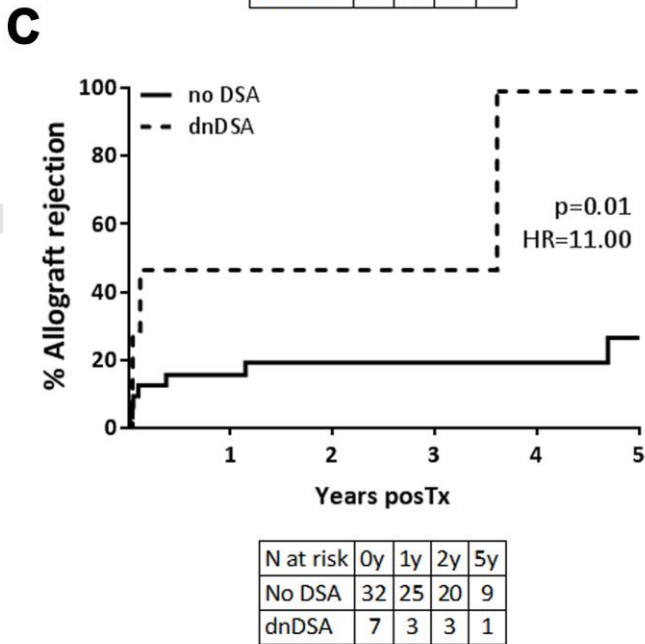
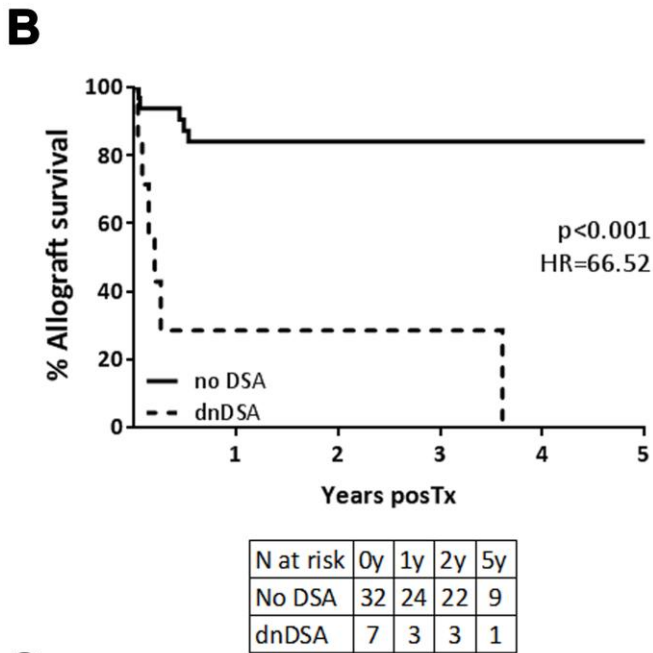
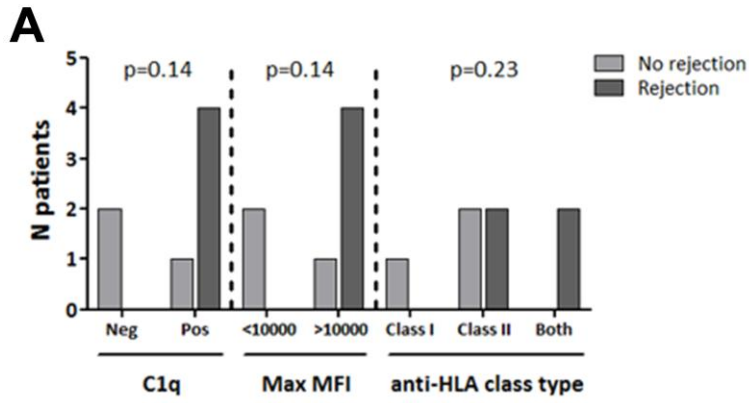
| | dnDSA- (n=36) | dnDSA+ (n=7) | p-value |
|--|------------------|-----------------|---------|
| Serological HLA compatibility: | | | |
| • HLA class I (A,B) mismatches, n (mean±SD) | 3.3±0.8 | 3.1±1.1 | 0.79 |
| • HLA class II (DR,DQ) mismatches, n (mean±SD) | 2.9±1.0 | 3.1±1.5 | 0.36 |
| • HLA ABDRDQ mismatches, n (mean±SD) | 6.2±1.5 | 6.3±2.4 | 0.43 |
| Eplets compatibility (HLAMatchmaker): | | | |
| • HLA AB eplets, n (mean±SD) | 16.0±4.8 | 14.3±6.3 | 0.57 |
| • HLA DR eplets, n (mean±SD) | 11.6±6.6 | 11.6±4.9 | 0.99 |
| • HLA DQ eplets, n (mean±SD) | 10.1±7.2 | 13.0±11.0 | 0.45 |
| • HLA ABDRDQ eplets, n (mean±SD) | 37.8±10.7 | 38.9±17.0 | 0.52 |
| PIRCHE score, mean±SD | 105.0±47.6 | 112.7±35.2 | 0.59 |

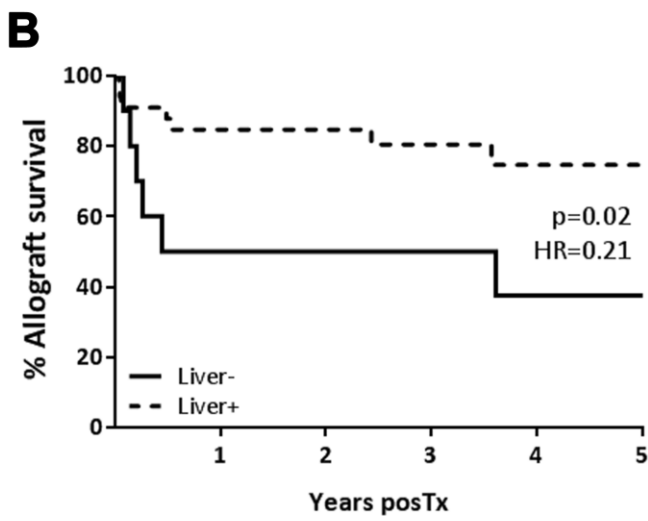
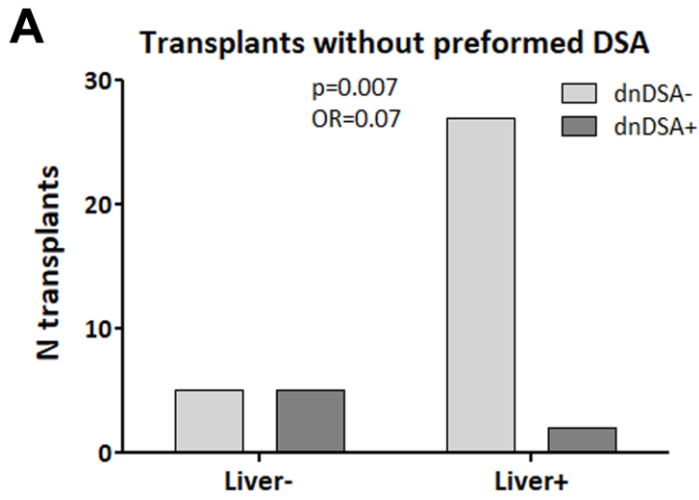


| N at risk | 0y | 1y | 2y | 3y |
|----------------|----|----|----|----|
| Preformed DSA- | 38 | 25 | 22 | 16 |
| Preformed DSA+ | 5 | 4 | 4 | 2 |

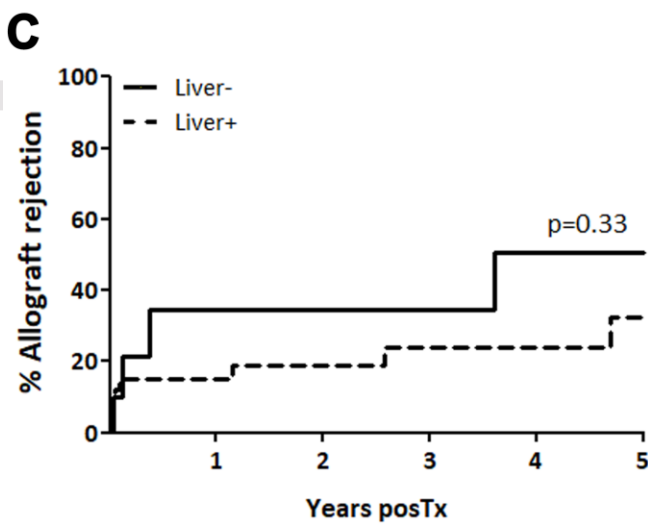


| N at risk | 0y | 1y | 2y | 3y |
|----------------|----|----|----|----|
| Preformed DSA- | 38 | 26 | 24 | 17 |
| Preformed DSA+ | 5 | 4 | 4 | 3 |





| N at risk | 0y | 1y | 2y | 5y |
|-----------|----|----|----|----|
| Liver- | 10 | 5 | 5 | 2 |
| Liver+ | 33 | 26 | 23 | 9 |



| N at risk | 0y | 1y | 2y | 5y |
|-----------|----|----|----|----|
| Liver- | 10 | 5 | 5 | 2 |
| Liver+ | 33 | 25 | 21 | 7 |

CAPÍTULO 2:

Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts.

Paloma Talayero, Esther Mancebo, Jorge Calvo Pulido, Sarbelio Rodríguez Muñoz, Iván Bernardo, Rocío Laguna Goya, Francisco Luis Cano Romero, Álvaro García-Sesma, Carmelo Loinaz, Carlos Jiménez, Iago Justo, Estela Paz Artal.

American Journal of Transplantation 2016 Jan;16(1):72-82

OBJETIVOS

El injerto intestinal resulta único en el trasplante de órgano sólido por la gran cantidad de SI del donante que lleva consigo, así como la carga bacteriana que porta. El proceso de acomodación y aceptación del injerto pasa por la repoblación del tracto gastrointestinal con las células del SI del receptor, lo que convierte al intestino en un órgano altamente inmunogénico y quimérico, con frecuentes y severas complicaciones (rechazo, infecciones, PTLD, EICH, disfunción crónica del injerto...).

El estudio de la mucosa intestinal, y especialmente de las poblaciones de IEL, constituye una herramienta para el diagnóstico y seguimiento de diversas patologías, como la enfermedad celíaca, la alergia alimentaria, la enfermedad inflamatoria intestinal o la enteropatía asociada a linfoma. Sin embargo, en el ámbito del Txl, la evolución, composición y función de las poblaciones de IEL resulta aún bastante desconocida.

Bajo estas premisas y tomando como población 16 receptores intestinales adultos trasplantados en el Hospital Universitario 12 de Octubre, los objetivos planteados son:

1. Analizar las principales poblaciones de IEL (LT totales, LT CD4⁺, LT CD8⁺ y linfocitos CD3⁻) en biopsias de receptores intestinales en un estudio longitudinal tras el trasplante.
2. Comparar las poblaciones de IEL de injertos intestinales con las de intestinos nativos, en muestras obtenidas de controles sanos.
3. Evaluar el efecto de factores clínicos (inmunosupresión recibida y diagnóstico patológico) sobre las poblaciones de IEL.
4. Profundizar en la caracterización fenotípica y funcional de las poblaciones de IEL más alteradas en los injertos intestinales.

CONCLUSIONES

1. Las poblaciones de IEL en las biopsias de íleon de los injertos intestinales varían a lo largo del tiempo postTx, difiriendo además de los intestinos nativos en los siguientes aspectos:
 - Disminución del % total de IEL durante el primer año postTx.
 - Disminución de LT totales y aumento de la población de linfocitos CD3⁻ desde el tercer mes a más de dos años postTx.
 - Disminución mantenida a más de dos años postTx de LT CD8⁺.
 - Aumento de LT CD4⁺ desde el tercer mes a los dos años postTx.
2. El aumento de LT CD3⁻ se ve potenciado en los pacientes que reciben esteroides en la terapia inmunosupresora.
3. Las poblaciones de IEL no difieren entre los distintos diagnósticos histopatológicos (cambios mínimos, inflamación activa, mucosa reparativa o rechazo).
4. La población de linfocitos CD3⁻ presenta unos rasgos fenotípicos y funcionales característicos de las células NK y las ielILC1 (CD56⁺, NKp44⁺, CCR6⁺, CD127⁻, capacidad citotóxica y secreción de IFN γ) y de las ILC3 (CD56⁺, NKp44⁺, CCR6⁺, IL23R⁺, ROR γ t y producción de IL22), mostrando también características de una población intermedia ILC1-ILC3 (síntesis simultánea de IFN γ e IL22).
5. El fenotipo observado en los IEL CD3⁻ de los injertos difiere además del observado en intestinos nativos.

CAPÍTULO 2
PUBLICACIÓN

Innate Lymphoid Cells Groups 1 and 3 in the Epithelial Compartment of Functional Human Intestinal Allografts

P. Talayero^{1,2}, E. Mancebo^{1,2}, J. Calvo-Pulido³, S. Rodríguez-Muñoz⁴, I. Bernardo¹, R. Laguna-Goya^{1,2}, F. L. Cano-Romero², A. García-Sesma³, C. Loinaz³, C. Jiménez^{2,3,5}, I. Justo³ and E. Paz-Artal^{1,2,5,6,*}

¹Department of Immunology, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

²I+12 Research Institute, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

³Department of General and Digestive Surgery and Abdominal Organ Transplantation, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

⁴Department of Gastroenterology, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

⁵School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

⁶Section of Immunology, San Pablo CEU University, Madrid, Spain

*Corresponding author: Estela Paz-Artal, epaz.hdoc@salud.madrid.org

We examined intraepithelial lymphocytes (IELs) in 213 ileal biopsies from 16 bowel grafts and compared them with 32 biopsies from native intestines. During the first year posttransplantation, grafts exhibited low levels of IELs (percentage of CD103⁺ cells) principally due to reduced CD3⁺CD8⁺ cells, while CD103⁺CD3⁻ cell numbers became significantly higher. Changes in IEL subsets did not correlate with histology results, isolated intestine, or multivisceral transplants, but CD3⁻ IELs were significantly higher in patients receiving corticosteroids. Compared with controls, more CD3⁻ IELs of the grafts expressed CD56, NKp44, interleukin (IL)-23 receptor, retinoid-related orphan receptor gamma t (ROR γ t), and CCR6. No difference was observed in granzyme B, and CD3⁻CD127⁺ cells were more abundant in native intestines. *Ex vivo*, and after *in vitro* activation, CD3⁻ IELs in grafts produced significantly more interferon (IFN)- γ and IL-22, and a double IFN γ ⁺IL-22⁺ population was observed. Epithelial cell-depleted grafts IELs were cytotoxic, whereas this was not observed in controls. In conclusion, different from native intestines, a CD3⁻ IEL subset predominates in grafts, showing features of natural killer cells and intraepithelial ILC1 (CD56⁺, NKp44⁺, CCR6⁺, CD127⁻, cytotoxicity, and IFN γ secretion), ILC3 (CD56⁺, NKp44⁺, IL-23R⁺, CCR6⁺, ROR γ t⁺, and IL-22

secretion), and intermediate ILC1–ILC3 phenotypes (IFN γ ⁺IL-22⁺). Viability of intestinal grafts may depend on the balance among proinflammatory and homeostatic roles of ILC subsets.

Abbreviations: E:T, effector:target; FC, flow cytometry; IEL, intraepithelial lymphocyte; IFN γ , interferon-gamma; IL, interleukin; ILC, innate lymphoid cell; NK, natural killer; PBL, peripheral blood lymphocyte; PB-NK, peripheral blood natural killer cell; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; post-Tx, posttransplant; ROR γ t, retinoid-related orphan receptor gamma t; SBT, small bowel transplantation

Received 12 February 2015, revised 27 May 2015 and accepted for publication 21 June 2015

Introduction

Despite recent advances in the outcome of small bowel transplantation (SBT), recipients of intestinal grafts continue to experience frequent and severe complications, principally acute rejection, infections, posttransplant (post-Tx) lymphoproliferative disease, graft-versus-host disease, and chronic rejection with delayed graft failure (1,2). Problems occurring in SBT are closely related to the importance of the intestine itself as an immune system organ. In contrast to other solid organs, intestinal grafts transport high amounts of donor lymphoid cells organized into a sophisticated structural and functional network known as gut-associated lymphoid tissue. Together with T, B, natural killer (NK), plasma, and dendritic cells, among others, human gut-associated lymphoid tissue encompasses the recently described types 1, 2, and 3 innate lymphoid cells (ILC1, ILC2, and ILC3), which lack antigen-specific rearranged receptors and are specialized in rapid immune responses. Human ILC1 constitutively express the transcription factor T-bet and produce interferon-gamma (IFN γ). They accumulate in inflammatory conditions such as Crohn's disease. The ILC1 population includes two subsets: CD127⁻ cells, which reside in the intestinal epithelium, express CD103, CD56, and NKp44 and are cytotoxic, and CD127⁺ cells, which are mostly located in the lamina propria and are noncytotoxic. ILC2 cells constitutively express GATA-3 and produce type 2 cytokines like interleukin (IL)-5, IL-9, IL-13, and amphiregulin. ILC2 cells are involved in airway epithelium repair but also

contribute to pathology in allergy, asthma, and atopic dermatitis. ILC3 cells express retinoid-related orphan receptor gamma t (ROR γ t) and produce IL-22 in response to IL-1 β and IL-23. ILC3 cells promote tissue repair, intestinal homeostasis, and immunity to extracellular bacteria via IL-22, but they are also implied in inflammation via IL-17 as observed in psoriasis (3–6). Both adaptive and innate immune cells play important roles in maintenance of the epithelial barrier integrity, effector immune responses against pathogens, and tolerance to commensal bacteria and food antigens. After intestinal transplantation, new, recipient-derived immune system cells infiltrate the bowel graft, and, along with donor secondary lymphoid structures, they trigger alloimmune responses favoring sensitization and rejection (7).

Intestinal immune cells reside in the lamina propria as well as in the epithelium. Intraepithelial lymphocytes (IELs) locate within the enterocytes through interaction between the constitutively expressed α β γ integrin (CD103) and E-cadherin on epithelial cells. Immunohistochemistry and flow cytometry (FC)-based analyses have shown that in healthy human adults, the main small bowel IEL population (>70%) is formed by CD3⁺ effector T lymphocytes, mostly CD8⁺ T cell receptor (TCR) $\alpha\beta$ ⁺ (80–95%) and, to a much lesser degree, CD4⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ (10%). From 5% to 15% of CD3⁺ IELs are TCR $\gamma\delta$ ⁺, and the remaining cells, CD3⁻ and without specific markers of lymphoid T and B lineages, include precursors of CD3⁺ T cells and other lymphocytes resembling peripheral blood NK cells (PB-NKs) (8,9).

Changes in IEL features or distribution of the subsets have been observed in viral and parasitic enteropathies (10), HIV infection (11,12), cow’s milk protein sensitivity (13,14), or intestinal bowel disease (15,16). Some authors support the diagnostic usefulness of IEL phenotyping in celiac disease

and its complications, based on the finding of a specific pattern consisting of increased IEL infiltration, high levels of TCR $\gamma\delta$ ⁺, and low levels of CD3⁻ cells (17–20). However, despite the potential interest of understanding IELs for the diagnosis of post-Tx complications, prognosis, or identification of specific therapy targets, studies analyzing these cells in SBT are scarce (21), and whether and how IEL compartment changes in intestinal allografts remain largely unknown.

In the present study, we investigated the distribution and functional characteristics of IELs in ileal biopsy samples taken from intestinal grafts during a 10-year period after SBT. Our observations show that IEL proportions in grafts are significantly different from native intestines, with ILC1 and ILC3 cells being important IEL components in transplanted bowels.

Patients and Methods

Patients and controls

The study included 16 adult recipients who underwent small bowel or multivisceral transplantation between 2005 and 2013 in our hospital. Clinical data of recipients are summarized in Table 1. Biopsy samples from ileal mucosa were taken 10–20 cm from the ileostomy. According to our monitoring protocol, endoscopic and biopsy controls were frequently performed soon post-Tx and at progressively increasing intervals (two per week during the first month, one per week during the second and third months, one in 2 weeks during the fourth and fifth months, one monthly until the end of the first year, and then once every 6 months). Additional endoscopy and biopsy analyses were performed when clinical events occurred. For analysis purposes, biopsies were grouped according to the interval from transplantation to biopsy (Table 2). Data from the histological diagnosis from paired biopsies and immunosuppressive therapy were also collected. All patients received alemtuzumab for induction therapy, except patient 16 (SBT plus kidney recipient), who received thymoglobulin. The

Table 1: Clinical data from small bowel and multivisceral recipients

| Patient no. | Underlying disease | Sex | Age at Tx, Y | Organ Tx | Post-Tx follow-up period (days) | Bx (n) |
|-------------|--|--------|--------------|--------------|---------------------------------|--------|
| 1 | Crohn’s disease | Male | 38 | SBT | 5–2573 | 31 |
| 2 | Familial adenomatous polyposis | Male | 34 | SBT | 46–503 | 22 |
| 3 | Acute mesenteric ischemia | Male | 45 | SBT | 3339–3006 | 18 |
| 4 | Familial adenomatous polyposis | Male | 36 | SBT | 274–2297 | 16 |
| 5 | Familial adenomatous polyposis | Female | 32 | MVT | 97–2779 | 14 |
| 6 | Politraumatism | Male | 30 | SBT | 9–1861 | 21 |
| 7 | Gastrointestinal stromal tumor | Female | 47 | SBT | 4–1270 | 17 |
| 8 | Polycythemia vera | Male | 38 | MVT | 4–28 | 5 |
| 9 | Schistosomiasis | Female | 62 | MVT | 12–24 | 2 |
| 10 | Acute mesenteric ischemia | Male | 64 | SBT | 6–1539 | 4 |
| 11 | Politraumatism | Male | 56 | SBT | 9–1012 | 18 |
| 12 | Familial adenomatous polyposis | Male | 44 | SBT | 7–711 | 15 |
| 13 | Familial adenomatous polyposis | Male | 40 | SBT | 3–829 | 6 |
| 14 | Familial adenomatous polyposis | Male | 24 | SBT | 29–720 | 9 |
| 15 | Acute mesenteric ischemia | Female | 38 | SBT | 14–593 | 11 |
| 16 | Primary intestinal lymphangiectasia Hemolytic uremic syndrome | Female | 26 | SBT + kidney | 15–208 | 4 |

MVT, multivisceral abdominal transplantation; Bx (n), number of biopsy samples studied and obtained in the equivalent number of procedures along the follow-up period.

Table 2: Number of biopsy samples studied according to post-Tx time

| | Post-Tx time | No. of biopsies | No. of individuals |
|----------|--------------|-----------------|--------------------|
| Controls | | 32 | 32 |
| Patients | Month 1 | 33 | 12 |
| | Month 2 | 22 | 9 |
| | Month 3 | 23 | 9 |
| | Months 4–6 | 38 | 11 |
| | Months 7–12 | 25 | 10 |
| | Months 13–24 | 33 | 8 |
| | >Month 24 | 39 | 9 |

main immunosuppressive drug was tacrolimus in all patients. Mycophenolate mofetil was added in patients 12, 13, 14, and 15 within the first 3 months post-Tx. Patients 5, 10, 15, and 16 received everolimus at 4 years, 6 years, 2 months, and 8 months post-Tx, respectively. Corticosteroids were administered because of a rejection episode as three methylprednisolone boluses (patients 2, 3, 4, 5, 6, 9, 14, and 15), followed by decreasing doses for 5–10 days and maintenance with prednisone for 3 months. Other patients received prednisone because of Crohn's disease (patient 1), adrenal insufficiency (patient 5), or kidney allograft (patient 16) at the same dose as that administered for maintenance after rejection.

Ileal biopsy samples from unaffected areas of 32 native intestines in adult patients with delimited colorectal cancer (without any previous therapy or other clinical complications) were included as the control group (Table 2). Biopsy samples were taken once from every control subject along the same time period as patients.

Experiments were approved by the institutional review board (CEIC 13/370), and written informed consent was obtained from all patients and controls.

IEL isolation and FC

IELs and epithelial cells were isolated from intestinal biopsy samples as described previously (22). Expression of several IEL surface and intracytoplasmic markers (Table S1) was analyzed by FC (FACSCalibur and FACSCanto II; BD Bioscience, San Diego, CA). Data were processed by using FACS Diva version 6.0 (BD Bioscience) and Flowjo software (TreeStar Inc., Ashland, OR). Given that every epithelial infiltrating lymphocyte expresses CD103, IEL infiltration was defined as the percentage of CD103⁺/side-scattered light cells. CD3⁻ IELs and CD3⁺ IELs (with their subsets TCRγδ⁺, CD4⁺, and CD8⁺) were studied (Figure 1A). Expression of typical ILC markers was determined in CD3⁻ IELs: CD56, NKp44, and CD127 (ILC1 and ILC3), RORγt, IL-23R, and CCR6 (ILC3), and granzyme B (NK cells).

Intracellular cytokine detection

Total IELs or peripheral blood lymphocytes (PBLs) were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 25 ng/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and ionomycin (1 μg/mL; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) in the presence of Brefeldin A (10 μg/mL; Sigma-Aldrich) for 4 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were fixed and permeabilized with use of the Inside Stain Kit (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) and then stained with anti-IFNγ, anti-IL-17A (Miltenyi Biotec), and anti-IL-22 (eBioscience, San Diego, CA) monoclonal antibodies.

IEL cell enrichment and cytotoxicity assay

Epithelial cells (which constitutively express the interepithelial cell adhesion molecule, EpCAM) were removed from IEL suspension through depletion

with magnetic beads labeled with anti-EpCAM (Miltenyi Biotec). After depletion, IEL recovery was about 40–60% (Figure S1). PB-NKs were positively isolated from PBLs through anti-CD56 magnetic bead labeling (Miltenyi Biotec). IEL and PB-NK cytotoxicity against K562 cells was evaluated with FC (23). Experimental effector:target (E:T) ratios for CD3⁻ IELs (1.5:1, 2.5:1, and 5:1, calculated after normalization by CD3⁻ IEL%) and PB-NKs (1:1, 2:1, 5:1, and 10:1) were set up. Cytotoxic activity was expressed as percent specific lysis calculated as:

$$\text{Specific lysis (\%)} = 100 \times (\% \text{ sample lysis} - \text{basal lysis}) / (100 - \% \text{ basal lysis})$$

Statistical analysis

Data from IEL subsets were analyzed according to post-Tx time (month 1, month 2, month 3, months 4–6, months 7–12, months 13–24, and >24 months post-Tx), immunosuppressive therapy (with or without corticosteroids), and pathological events (minimal changes, active inflammation, or rejection episodes). Longitudinal analysis with a linear mixed-effects model was performed to take into account the within-patient correlation (random effect) at the different post-Tx periods (fixed effect). Student's t (with Welch's correction for unequal variances) or Mann-Whitney U tests were used for statistical analysis of quantitative variables. Bonferroni adjustment was performed for multiple comparisons. Fisher's exact test was used for qualitative variables. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

IEL subset proportions change in transplanted versus native bowels

Clinical data of recipients are summarized in Table 1. No differences were observed in sex distribution between the control group and recipients; however, mean age was significantly higher in the control group (66.6 years vs. 41.9 years in recipients; $p < 0.001$). A total of 213 biopsy samples were obtained from the 16 recipients between post-Tx days +3 and +3006 (mean follow-up time, 425 days). Biopsies were classified in seven groups according to when they were obtained post-Tx (Table 2).

Compared with healthy donors, patients exhibited a significant decrease in IEL% (percent of CD103⁺/SCC or IEL infiltration, Figure 1A) from the second month to the first year post-Tx (patients 2.6% and controls 5.6% at months 7–12; $p = 0.0014$) (Figure 1B). In transplant biopsy samples obtained during the first month, CD3⁺ IELs, mostly T cells, formed the main IEL population (Figure 1C) and were significantly higher than in control biopsy samples (patients 89% and controls 83%; $p = 0.026$). In the second month post-Tx, T cell levels returned to normal values and then decreased significantly from the third month (patients 58% and controls 83% at month 3; $p = 0.0061$). The decrease in T lymphocytes in bowel recipients was mainly due to a reduction in CD8⁺ T cells, whereas the CD4⁺ T cells exhibited a relative progressive increase to the second year, when they reached an average of 50% among total CD3⁺ cells (Figure 1D and 1E). This pattern differed from small bowel IEL populations in healthy, native bowel controls, where, consistent with previous literature, CD8⁺ cells

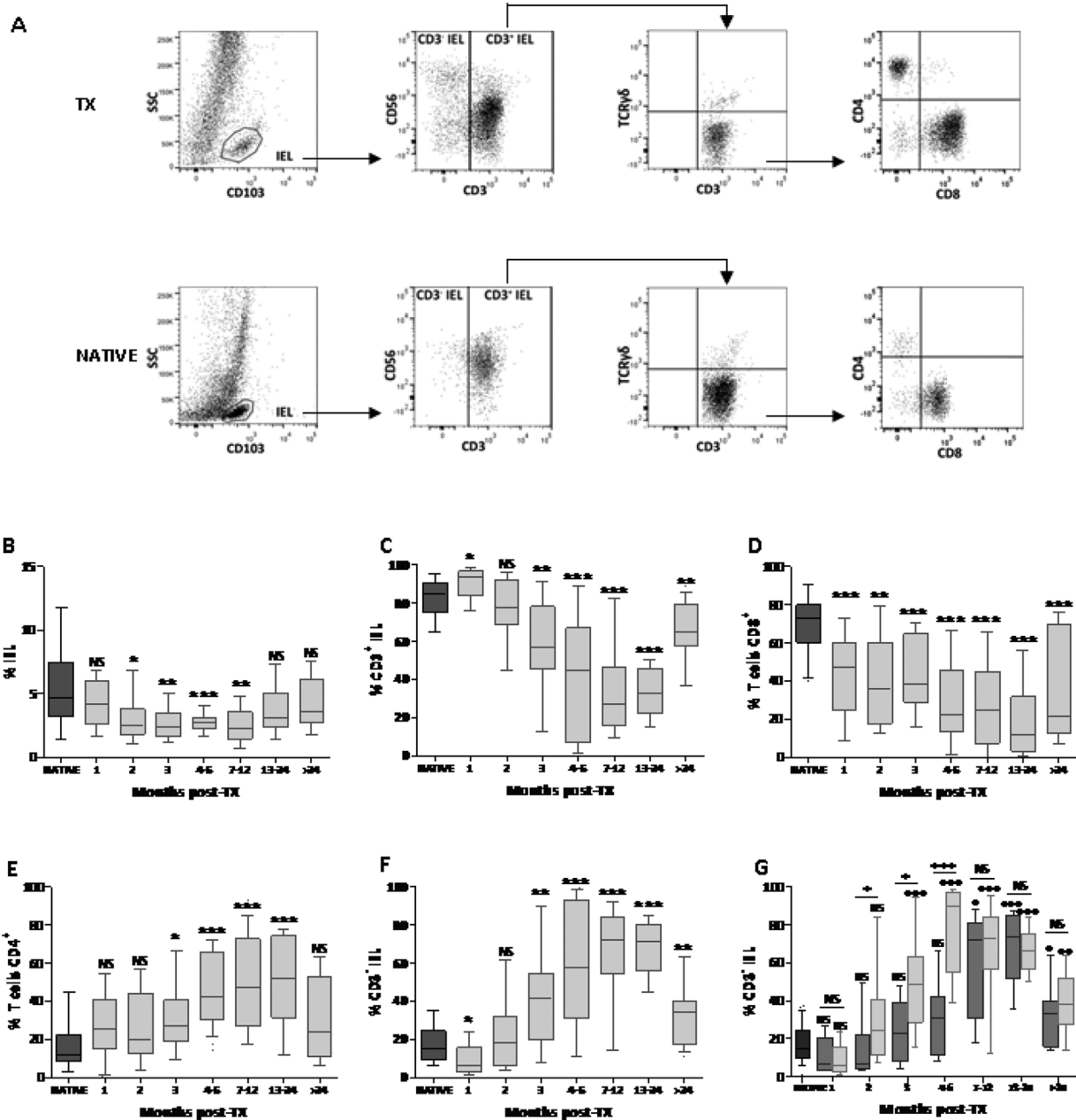


Figure 1: IEL subset proportions change in transplanted versus native bowels. (A) Representative FC dot-plots from intestinal biopsies analyses in transplanted (TX) and native intestines. IEL infiltration (CD103⁺ cells), gated from all events; CD3⁻ and CD3⁺ IELs gated from IELs; T cell subsets, gated from CD3⁺ population. (B-F) Statistical analysis of IEL populations. Patients grouped by post-Tx time versus native intestines. (G) CD3⁻ IEL evolution according to presence or absence of corticosteroids (CE) in the immunosuppressive therapy. ■ Native intestines, ■ patients without CE, ■ patients with CE. NS, not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Bars show medians and whiskers show 10th–90th percentiles.

predominated and CD4⁺ cells were present in smaller amounts (68% and 18%, respectively; Figure 1D and 1E). No changes were observed in TCRγδ⁺ T cells.

Parallel to the T cell reduction, the CD3⁻ cell subset became the main IEL population in intestinal grafts from the fourth

month (patients 59% and controls 18% at months 4–6; p < 0.001) to the second year post-Tx (Figure 1F). From the first year post-Tx, IEL infiltration recovered and was statistically similar in grafts versus control biopsies (Figure 1B). However, at this time point, infiltrating CD3⁺ cell levels were still significantly lower, whereas the CD3⁻

cell subset was significantly higher in grafts versus native bowels (Figure 1C and 1F). The longitudinal analysis of IEL subsets by the linear mixed-effects model also showed the influence of post-Tx time in the evolution of the subsets, independent of the within-patient effect (Table S2).

We analyzed the potential relationship between the main IEL subsets (total CD103⁺ IELs, CD3⁻ cells, CD3⁺ cells, CD4⁺ T cells, and CD8⁺ T cells) and the pathological diagnoses (minimal changes, active inflammation, reparative mucosa, and rejection). The proportion of CD8⁺ T cells was higher in the group of patients with minimal changes versus patients with active inflammation, at 3–6 months post-Tx (48.5% vs. 28.2%, $p=0.004$) (Figure S2A). When we compared the group with minimal changes versus the remaining pathologies combined, we observed a significantly higher proportion of total IELs in the former, at 6–12 months post-Tx (3.3% vs. 2.1%, $p=0.033$) (Figure S2B). When we repeated this analysis in the global post-Tx period, comparing either the four pathology groups or the group with minimal changes versus other pathologies, we did not observe significant differences in the referred cell populations (Figure S3A and S3B).

IEL subsets were not different in either multivisceral transplantation or isolated SBT. However, the increase of CD3⁻ IELs was significantly higher in biopsy samples of patients receiving additional corticosteroids (because of a rejection episode, Crohn's disease, adrenal insufficiency, or kidney allograft) versus patients taking the standard immunosuppressive therapy based on tacrolimus (either alone or in combination with mycophenolate mofetil and/or everolimus). Recipients who were not receiving corticosteroids also showed an increase in CD3⁻ IELs, although this was more gradual and occurred later (Figure 1G).

Intraepithelial CD3⁻ lymphocytes in grafts display phenotype of NK cells, ILC1, and ILC3

We hypothesized that the increased/predominant CD3⁻ IEL population in bowel grafts would partially correspond to the recently described ILCs, which are mostly abundant in mucosa-associated lymphoid tissues. Several surface and intracellular markers characteristic of the different ILC groups (Figure 2) were studied in biopsy samples taken >2 months post-Tx, when the increase of CD3⁻ IELs becomes significant. When comparing grafts versus control native bowels, close to 60% of intraepithelial CD3⁻ cells expressed CD56 and NKp44 in the former, whereas <40% did so in controls (Figure 2A and 2B). Both CD56 and NKp44 are characteristic markers of NK cells as well as subsets of ILC1 and ILC3, and they are not expressed by ILC2 cells. This is consistent with the reported lower prevalence of ILC2 cells in gut and the preferential localization of these cells in lungs and skin (3,24). Approximately the same proportion of graft CD3⁻ IELs that were positive for CD56 and NKp44 were also IL-23R⁺ cells (Figure 2C). This suggests that in

transplanted bowels, most CD3⁻ IELs expressing CD56 and/or NKp44 also expressed IL-23R, a hallmark for ILC3 that is not found in either NK cells and ILC1. On the contrary, in native bowels, <20% of CD3⁻ IELs expressed IL-23R. However, we found that the ILC3-specific transcription factor ROR γ t was expressed in a lower amount of CD3⁻ IELs of the grafts, even though it was still twice the level in transplants than in native intestines (10.0% vs. 5.6%, respectively) (Figure 2D). Close to 40% of CD3⁻ IELs in grafts versus <10% in native intestines expressed the gut-homing chemokine receptor CCR6, also characteristic of one ILC1 subset and all ILC3 subsets (Figure 2E). Finally, no differences were observed in granzyme B expression between the CD3⁻ IELs of the grafts and those of the controls (Figure 2F), and CD3⁻CD127⁺ cells were more abundant in the epithelium of native intestines (Figure 2G). In summary, we observed that populations of CD3⁻ IELs expressing CD56, NKp44, IL-23R, ROR γ t, and CCR6 were significantly more abundant in grafts than in native intestines. Because combinations of these markers characterize NK cells, ILC1, and ILC3, these cell subsets seemed to be overrepresented among the CD3⁻ lymphocytes infiltrating the epithelium of human intestinal transplants.

We next aimed to delineate the recorded association between corticosteroids in therapy and increased CD3⁻ IELs. We did not observe significant differences in proportions of CD103⁺CD3⁻ cells expressing CD56, NKp44, IL-23R, ROR γ t, CCR6, granzyme B, and CD127 between patients receiving versus those not receiving corticosteroids. The use of neither mycophenolate mofetil nor everolimus in the therapy showed an effect on these cell subsets. However, we observed a significantly higher proportion of CD103⁺CD3⁻NKp44⁺ cells in patients receiving only tacrolimus versus patients receiving double or triple therapy (tacrolimus plus mycophenolate mofetil and/or everolimus) (62% vs. 40%; $p=0.003$).

A significant proportion of CD3⁻ IELs in grafts produce both IFN γ and IL-22

To further investigate the nature of the CD3⁻ lymphocytes infiltrating the epithelium of intestinal grafts and given that the different ILC subsets are distinguished by their cytokine profile, we also assessed the cytokines synthesized by CD3⁻ IELs. First, we observed that compared with controls, transplanted intestinal CD3⁻ IELs produced significantly higher amounts of IFN γ and IL-22, signature cytokines of ILC1 and ILC3, respectively. This differential production was reported without stimulation, which reflects a preactivated state in basal conditions, and after stimulation with PMA/ionomycin (Figure 3A). PB-NKs isolated from controls and bowel recipients synthesized similar amounts of IFN γ and IL-22, which made it possible to discard that the observed differences in production of those cytokines between CD3⁻ IELs in transplanted and native bowels were secondary to the immunosuppressive therapy (Figure S4).

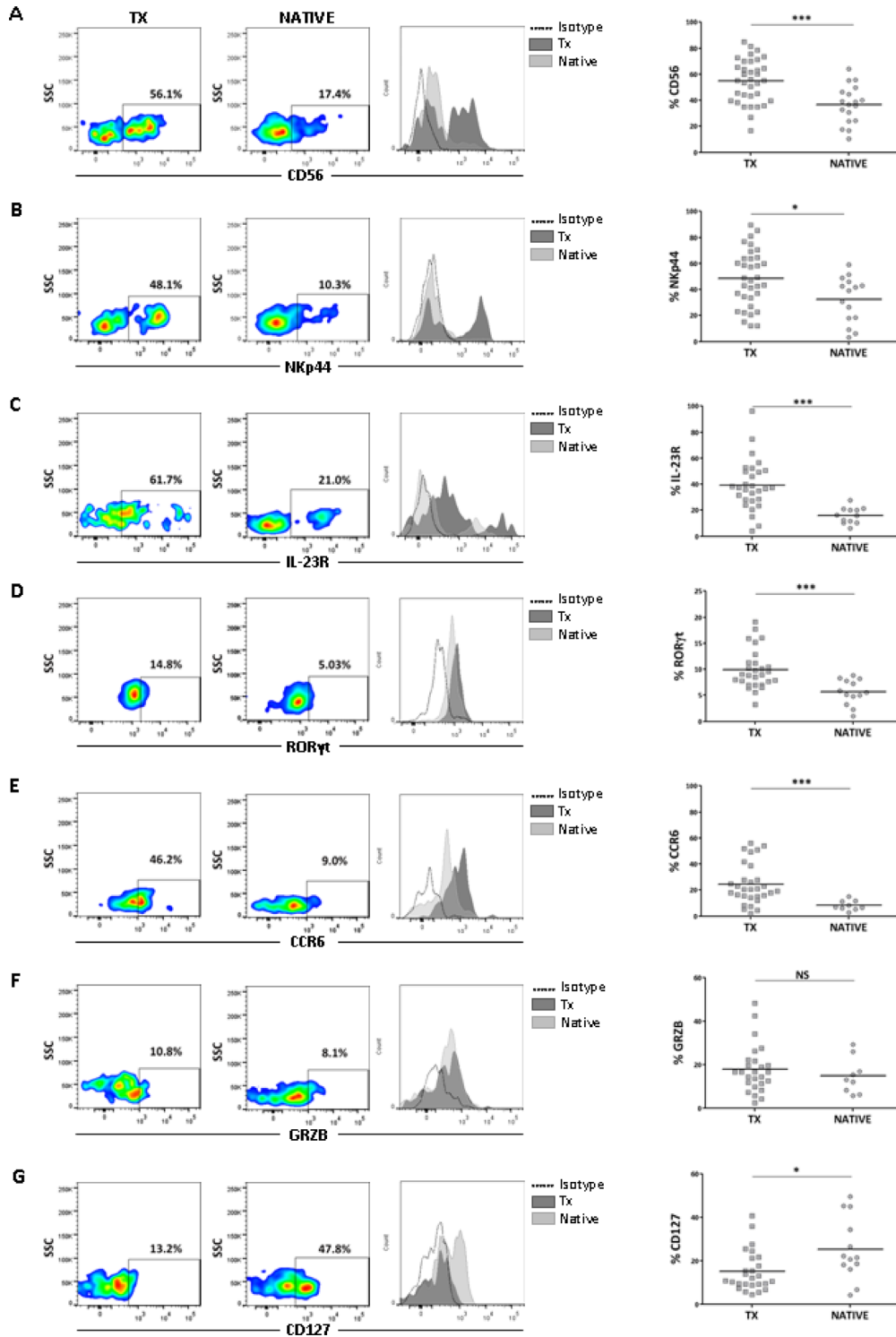


Figure 2: CD3⁻ IELs in grafts display features of NK cells, ILC1, and ILC3. (A–G) CD3⁻ IEL phenotype in patients > 2 months post-Tx and native intestines. All plots are gated from CD3⁻ IEL population as shown in Figure 1A. Statistical analysis: NS, not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Bars show means.

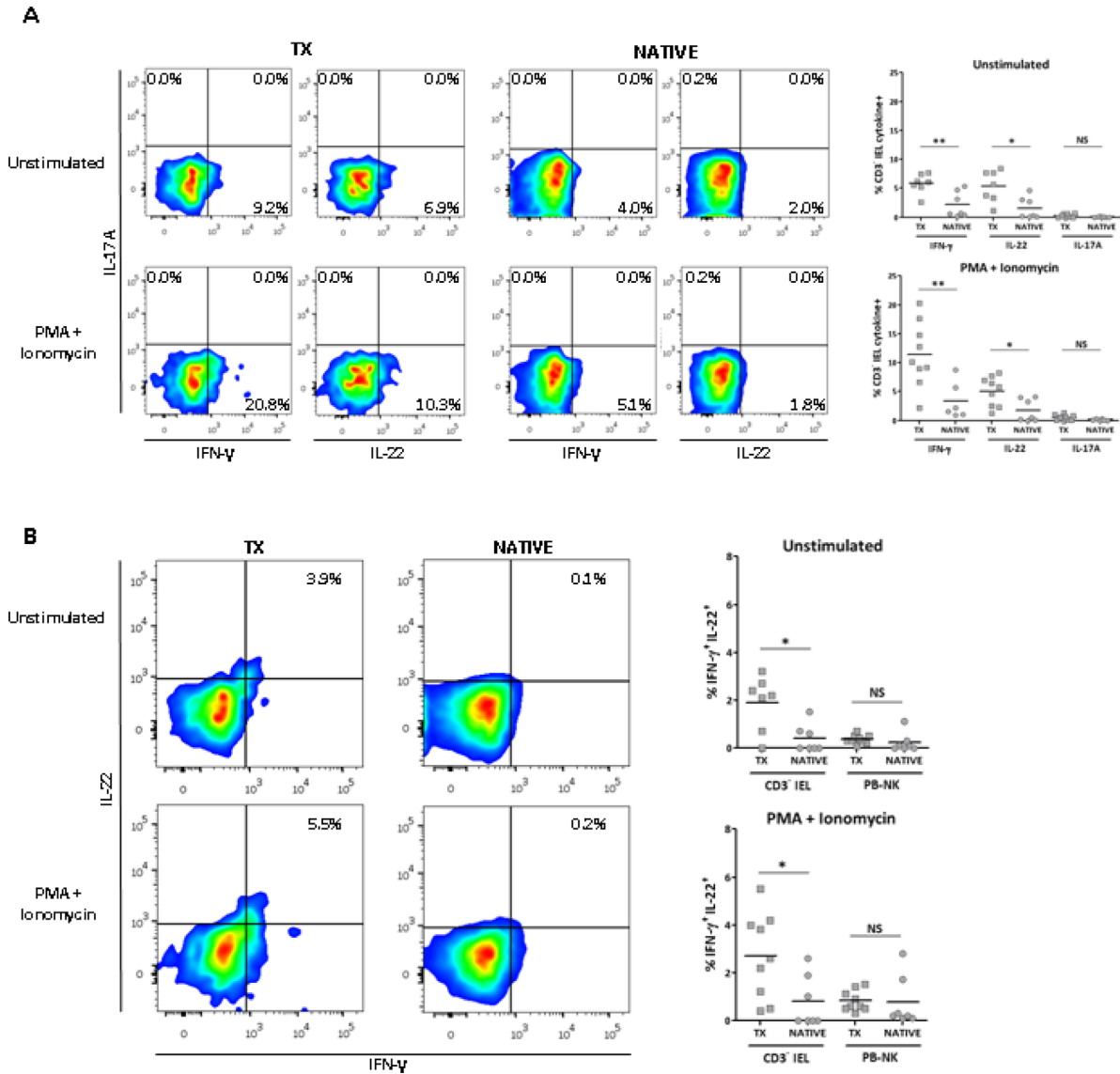


Figure 3: Production of IFN γ , IL-22, and IL-17A by CD3⁺ IELs. Intracellular IFN γ , IL-22, and IL-17A were recorded by FC, in unstimulated CD3⁺ IELs and after 4-h stimulation with PMA/ionomycin (Io). (A) Representative graphs and statistics of IFN γ , IL-22, and IL-17A production in CD3⁺ IELs of native and transplanted (TX) bowels. (B) Representative graphs and statistics of IFN γ ⁺IL-22⁺ cells in CD3⁺ IELs and PB-NKs of native and transplanted (TX) bowels. Bars show means. NS, not significant, *p < 0.05, **p < 0.01.

Very low and nondiffering amounts of IL-17A were detected in CD3⁺ IELs and PB-NKs (Figure 3A and S4), although both native and transplanted bowel CD3⁺ IELs synthesized this cytokine, mostly after stimulation (Figure S5). Remarkably, a unique IFN γ ⁺IL-22⁺ population was observed in grafts (in basal conditions and after stimulation), with this being significantly smaller in native intestines. Production of both cytokines among PB-NKs was low and similar between controls and patients (Figure 3B). Together, these data support that the CD3⁺ IELs in intestinal grafts may contain subsets corresponding to NK cells, ILC1, and ILC3.

Cytotoxic cells in IELs of intestinal grafts

Epithelial cell-depleted IELs from control and graft bowels were analyzed to compare their cytotoxic activity. After normalization according to percentage of CD3⁺ IELs, total enriched IELs were incubated with the K562 cell line. Cells from transplanted bowels showed cytotoxic activity, whereas no specific lysis was detected in cells from control intestines (Figure 4A). This difference was independent of the immunosuppressive treatment, because PB-NKs of the patients and controls exhibited similar cytotoxicity (Figure 4B). Interestingly, cytotoxic capacity characterizes NK cells and ILC1.

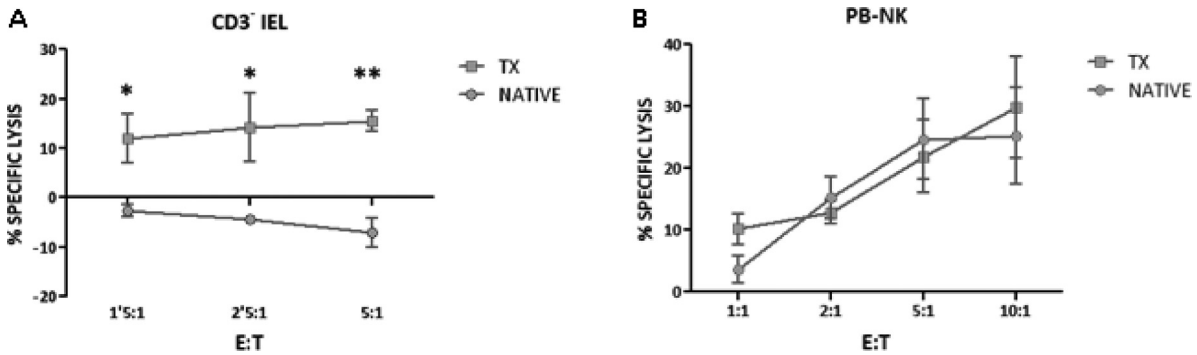


Figure 4: CD3⁺ IELs in grafts show cytotoxic activity against K562 cells. K562 cells were labeled with 1 μ mol/L CFSE, and were incubated with effector cells in complete medium for 4 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were collected and labeled with 7-amino-actinomycin D (7AAD). Target lysis was determined as the percentage of 7AAD⁺ in total CFSE⁺ cells. (A) Total IELs were incubated with K562, normalizing by CD3⁺ IEL%, at different E:T ratios (1.5:1, 2.5:1, and 5:1). (B) PB-NKs were incubated with target cells at 1:1, 2:1, 5:1, and 10:1 E:T ratios. Cumulative data from six native intestines and eight grafts are shown. Values represent means, and whiskers show standard error of mean. *p < 0.05, **p < 0.01.

Discussion

We found that during the first year after SBT in adult recipients, FC-recorded IELs were significantly low. This observation confirms the data of Liu and Talmon from an analysis of hematoxylin-eosin-stained slides in pediatric transplants (21), suggesting that IEL reduction in grafts is independent of recipient age and technique used to measure infiltration. Low IEL counts in transplanted patients may be a consequence of tacrolimus-based immunosuppressive therapy; a similar effect has been observed in FK506-treated mice (25). The observed relationship between increased CD3⁺ IELs and corticoid therapy should be analyzed in depth by use of multivariate models and mechanistic studies. The decrease in IELs and CD8⁺ cells in pathologies other than minimal changes also merits further investigation. Compared with native intestine controls, graft epithelium had fewer CD3⁺CD8⁺ lymphocytes and a more prominent CD103⁺CD3⁺ population (CD3⁺ IELs). The proportion of CD3⁺ IELs has been reported to increase with age (26). This makes the augmentation of CD103⁺CD3⁺ cells in recipients more pronounced, as these subjects were significantly younger than the controls.

Several data support that a substantial proportion of this population may correspond to NK cells and ILC1. First, approximately 50% of CD103⁺CD3⁺ cells in grafts expressed CD56 and NKp44 but lacked the membrane receptor for IL-7 (CD127). This is consistent with previous observations that, contrary to human ILC1 residing in intestinal lamina propria, both intraepithelial ILC1 and NK cells are CD127⁺ cells (15). Second, compared with CD3⁺ IELs in native bowels, CD103⁺CD3⁺ cells in grafts synthesized more IFN γ , the signature cytokine for ILC1 and NK cells (15,27). Third, CD103⁺CD3⁺ cells in grafts had cytotoxic activity, also a feature of NK cells, as well as some ILC1 (15,28). The relatively low granzyme B expression

observed, compared with CD56 and NKp44, within the CD3⁺ IELs in grafts supports that an important subset of these cells would be bona fide ILC1, because NK cells use degranulation of cytotoxic mediators to kill target cells, whereas ILC1 cytotoxicity seems to depend on the proapoptotic molecule tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (29). NK cells and ILC1 have proinflammatory properties, and ILC1 are augmented in the intestines of patients with Crohn's disease and in different murine colitis models (15,27). In transplanted bowels, the immune response against new tissue alloantigens and new commensal bacteria promotes an inflammatory environment (30) that may be consistent with the observed accumulation of NK cells and ILC1 in the epithelium.

We also observed that a substantial proportion of CD3⁺ IELs from grafts expressed IL-23R, ROR γ t, and IL-22 compared with native bowels but did not synthesized IL-17A. We propose that these cells mostly differ from the prototypical group 3 ILC, lymphoid tissue inducer cells, and would rather correspond to human NKp44⁺ ILC3 [NCR⁺ ILC3, according to current nomenclature (5), formerly known as NK-22 (31)]. A protective role of gastrointestinal surface has been proposed for IL-22⁺NKp44⁺ ILC3 (32,33), supported by reported correlations between them and preservation of intestinal mucosa in HIV-infected (34,35) or ankylosing spondylitis patients (36). In addition, it has been recently shown that the intestinal CCR6⁺ROR γ t⁺IL-22⁺ ILC3 subset inhibits CD4⁺ T cell responses to commensal bacteria after MHC class II-mediated antigen presentation (37). Therefore, the accumulation of these cells in the epithelial compartment of intestinal grafts could be linked to promotion of tolerance to both commensal bacteria and new tissue alloantigens.

In intestinal grafts, we also observed a CD103⁺CD3⁺ cell subset that synthesized both IFN γ and IL-22 cytokines.

ILC3 are considered highly plastic cells, and different ILC3/ILC1 intermediate phenotypes have been described in mice and humans (6,38,39). It has been shown that acquisition of the capacity to produce IFN γ (ILC1 signature cytokine) by ILC3 after IL-23 stimulation is concomitant with downregulation of ROR γ t, and the stability of this transcription factor is highly dependent on IL-7–IL-7R (CD127) signaling. In the CD3 $^-$ IELs of the transplants, we observed parallel CD56, NKp44, and IL-23R expression levels, whereas CD127 and ROR γ t levels were lower. We propose that IFN γ $^+$ IL-22 $^+$ CD3 $^-$ IELs in intestinal grafts may represent an ILC3-to-ILC1 transitional form where cells have downregulated ROR γ t and CD127 while acquiring the ability to produce IFN γ .

Several limitations need to be considered. First, it has been difficult to obtain an extensive definition of CD103 $^+$ CD3 $^-$ cells by FC and functional studies because of the reduced availability of intestinal tissue from biopsy samples. Because SBT is an infrequent procedure and collection of data began before explosion of the ILC field in the literature, the complete array of phenotype markers that defines each ILC group at present is not included in the analysis. We have described CD103 $^+$ CD3 $^-$ cells in intestinal grafts principally according to human ILC characteristics recently described by Hazenberg and Spits (3). This report defines human ILCs based on information compiled from studies in the bowel as well as in blood or tonsil. Different environmental conditions in transplanted intestines may explain the emergence of ILC subsets with heterogeneous and intermediate phenotypes and functions. In addition, it remains to be defined whether the ILCs reported here come from the donor or recipient and whether the CD103 $^+$ CD3 $^-$ population might contain some CD8 $\alpha\alpha$ cells or cytotoxic T cell precursors lacking CD3 (40,41). Finally, the analysis of epithelial cells themselves would be probably very relevant for a better understanding of the transplanted intestines.

Interestingly, description of ILC subsets in intestinal grafts as reported here corresponded to organs that did not fail and did not experience graft-versus-host disease, infections, or severe rejection episodes. Consequently, the intraepithelial ILC pattern defined in grafts is consistent with functional transplanted bowels. During the first year post-Tx, epithelial ILC1 and ILC3 might play important roles, respectively, in balance between inflammation/rejection and homeostasis/tolerance. In this complex environment, the adaptive alloimmune response, cytokine factors, commensal flora, and diet antigens may boost the plasticity of some ILC populations and contribute to the emergence of heterogeneous and transitional ILC subsets. A detailed knowledge of ILCs residing in the epithelium of the transplanted bowel could be helpful for an early detection of acute rejection and discrimination from other complications to stop chronic

deterioration and to define new targets for SBT-tailored immunosuppression.

Funding Source

Funding for this study was obtained from projects 13/0068 to J. C-P (Fundación Mutua Madrileña), and 13/00045 and 13/01407 to E. P-A (Instituto de Salud Carlos III, Spain, and European Regional Development Fund).

Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

References

1. Fishbein TM. Intestinal transplantation. *N Engl J Med* 2009; 361: 998–1008.
2. Ueno T, Fukuzawa M. Current status of intestinal transplantation. *Surgery Today* 2010; 40: 1112–1122.
3. Hazenberg MD, Spits H. Human innate lymphoid cells. *Blood* 2014; 124: 700–709.
4. Sonnenberg GF. Regulation of intestinal health and disease by innate lymphoid cells. *Int Immunol* 2014; 26: 501–507.
5. Spits H, Artis D, Colonna M, et al. Innate lymphoid cells: A proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 145–149.
6. Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. Innate lymphoid cells: How did we miss them? *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 75–87.
7. Wang J, Dong Y, Sun JZ, et al. Donor lymphoid organs are a major site of alloreactive T-cell priming following intestinal transplantation. *Am J Transpl* 2006; 6: 2563–2571.
8. Spencer J, MacDonald TT, Diss TC, Walker-Smith JA, Ciclitira PJ, Isaacson PG. Changes in intraepithelial lymphocyte subpopulations in coeliac disease and enteropathy associated T cell lymphoma (malignant histiocytosis of the intestine). *Gut* 1989; 30: 339–346.
9. Lundqvist C, Baranov V, Hammarstrom S, Athlin L, Hammarstrom ML. Intra-epithelial lymphocytes. Evidence for regional specialization and extrathymic T cell maturation in the human gut epithelium. *Int Immunol* 1995; 7: 1473–1487.
10. Chang F, Mahadeva U, Deere H. Pathological and clinical significance of increased intraepithelial lymphocytes (IELs) in small bowel mucosa. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2005; 113: 385–399.
11. Nilssen DE, Brandtzaeg P. Intraepithelial gammadelta T cells remain increased in the duodenum of AIDS patients despite antiretroviral treatment. *PLoS One* 2012; 7: e29066.
12. Sips M, Sciaranghella G, Diefenbach T, et al. Altered distribution of mucosal NK cells during HIV infection. *Mucosal Immunol* 2012; 5: 30–40.
13. Augustin MT, Kokkonen J, Karttunen TJ. Duodenal cytotoxic lymphocytes in cow's milk protein sensitive enteropathy and coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1398–1406.
14. Augustin MT, Kokkonen J, Karttunen TJ. Evidence for increased apoptosis of duodenal intraepithelial lymphocytes in cow's milk

- sensitive enteropathy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 352–358.
15. Fuchs A, Vermi W, Lee JS, et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN γ -producing cells. *Immunity* 2013; 38: 769–781.
 16. Liu Z, Yadav PK, Xu X, et al. The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J Leukocyte Biol* 2011; 89: 597–606.
 17. Eiras P, Leon F, Camarero C, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes contain a CD3- CD7+ subset expressing natural killer markers and a singular pattern of adhesion molecules. *Scand J Immunol* 2000; 52: 1–6.
 18. Leon F, Eiras P, Roy G, Camarero C. Intestinal intraepithelial lymphocytes and anti-transglutaminase in a screening algorithm for coeliac disease. *Gut* 2002; 50: 740–741.
 19. Liu H, Brais R, Lavergne-Slove A, et al. Continual monitoring of intraepithelial lymphocyte immunophenotype and clonality is more important than snapshot analysis in the surveillance of refractory coeliac disease. *Gut* 2010; 59: 452–460.
 20. Verbeek WH, von Blomberg BM, Scholten PE, Kuik DJ, Mulder CJ, Schreurs MW. The presence of small intestinal intraepithelial gamma/delta T-lymphocytes is inversely correlated with lymphoma development in refractory celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 3152–3158.
 21. Liu L, Talmon G. Quantification of intraepithelial lymphocytes in normal pediatric small intestinal allograft and native ilea. *Transpl Proc* 2011; 43: 1831–1835.
 22. Leon F. Flow cytometry of intestinal intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *J Immunol Methods* 2011; 363: 177–186.
 23. Kim GG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Gooding W, Whiteside TL. A novel multiparametric flow cytometry-based cytotoxicity assay simultaneously immunophenotypes effector cells: Comparisons to a 4 h 51Cr-release assay. *J Immunol Methods* 2007; 325: 51–66.
 24. Mjosberg JM, Trifari S, Crellin NK, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat Immunol* 2011; 12: 1055–1062.
 25. Hidaka M, Nakamura M, Ohmichi Y, et al. Involvement of intestinal intraepithelial lymphocytes in turnover of intestinal epithelial cells: Morphological and functional alterations due to daily administration of FK506. *Cell Immunol* 2012; 279: 124–133.
 26. Camarero C, Leon F, Sanchez L, Asensio A, Roy G. Age-related variation of intraepithelial lymphocytes subsets in normal human duodenal mucosa. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 685–691.
 27. Bernink JH, Peters CP, Munneke M, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol* 2013; 14: 221–229.
 28. Leon F, Roldan E, Sanchez L, Camarero C, Bootello A, Roy G. Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes. *Gastroenterology* 2003; 125: 345–356.
 29. Eberl G, Di Santo JP, Vivier E. The brave new world of innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2014; 16: 1–5.
 30. Oh PL, Martinez I, Sun Y, Walter J, Peterson DA, Mercer DF. Characterization of the ileal microbiota in rejecting and non-rejecting recipients of small bowel transplants. *Am J Transpl* 2012; 12: 753–762.
 31. Cella M, Fuchs A, Vermi W, et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 2009; 457: 722–725.
 32. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, et al. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* 2012; 336: 1321–1325.
 33. Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, et al. ROR γ mat+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat Immunol* 2011; 12: 320–326.
 34. Kim CJ, Nazli A, Rojas OL, et al. A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis. *Mucosal Immunol* 2012; 5: 670–680.
 35. Fernandes SM, Pires AR, Ferreira C, et al. Enteric mucosa integrity in the presence of a preserved innate interleukin 22 compartment in HIV type 1-treated individuals. *J Infect Dis* 2014; 210: 630–640.
 36. Ciccia F, Accardo-Palumbo A, Alessandro R, et al. Interleukin-22 and interleukin-22-producing Nkp44+ natural killer cells in subclinical gut inflammation in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 1869–1878.
 37. Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, et al. Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* 2013; 498: 113–117.
 38. Cella M, Otero K, Colonna M. Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1 β reveals intrinsic functional plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 10961–10966.
 39. Vonarbourg C, Mortha A, Bui VL, et al. Regulated expression of nuclear receptor ROR γ mat confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR γ mat(+) innate lymphocytes. *Immunity* 2010; 33: 736–751.
 40. Van Kaer L, Algood HM, Singh K, et al. CD8 α high(+) innate-type lymphocytes in the intestinal epithelium mediate mucosal immunity. *Immunity* 2014; 41: 451–464.
 41. Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 445–456.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Figure S1: IEL enrichment after epithelial cell depletion with anti-EpCAM magnetic beads.

Figure S2: Statistical analysis of IEL populations according to the histological diagnosis and post-Tx periods. (A) The different histological categories (minimal changes, active inflammation, reparative mucosa, and rejection) were compared in each period of time by analysis of variance (for more than two categories) or t-test. **p=0.004. (B) Same analysis performed comparing minimal changes versus the other histologies. *p=0.033, **p=0.004.

Figure S3: Statistical analysis of IEL populations according to the histological diagnosis in the global post-Tx period. (A) The different histological categories (minimal changes, active inflammation, reparative mucosa, and rejection) were compared by analysis of variance. (B) Same analysis performed comparing minimal changes versus the other histologies. No differences were observed.

Figure S4: Production of IFN γ , IL-22, and IL-17A in PB-NKs, without stimulation and after 4-h stimulation with PMA/ionomycin. TX, transplanted patients. Bars show means. NS, not significant.

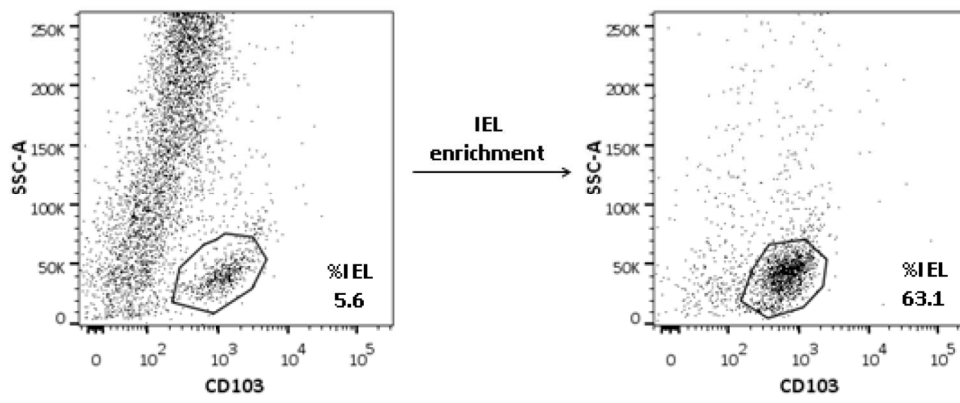
Figure S5: Intracellular IL-17A detection by flow cytometry in CD3⁺ IELs without stimulation and after

4-h stimulation with PMA/ionomycin. TX, transplanted patients. Bars show means. NS, not significant.

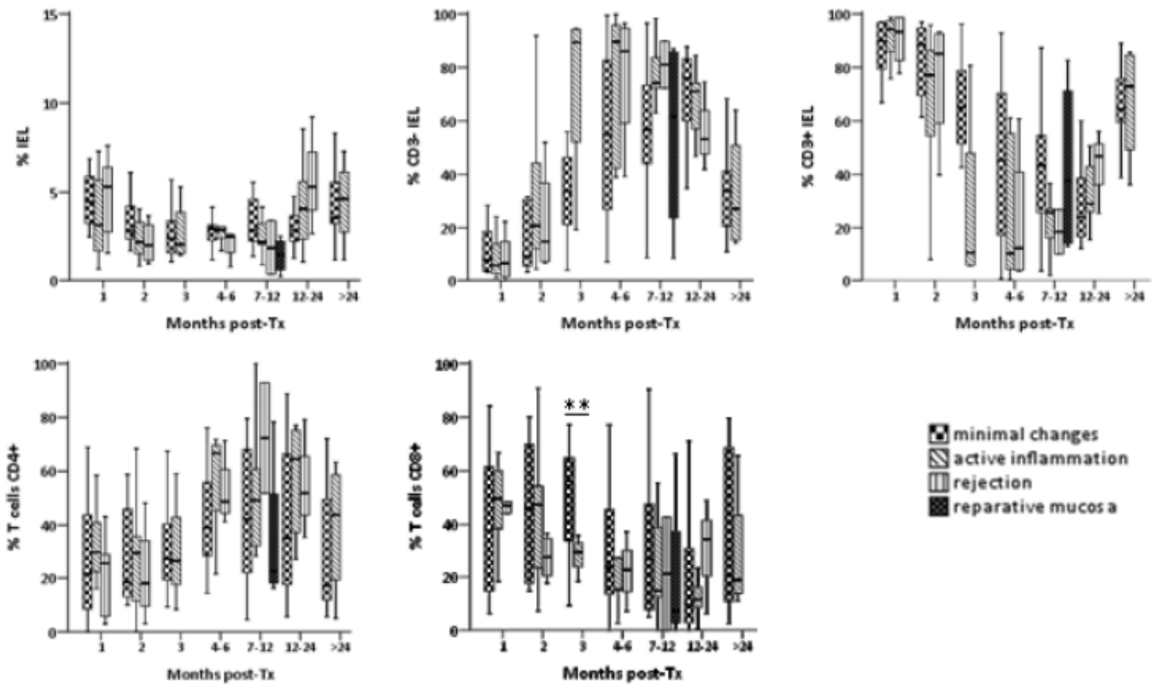
Table S1: Monoclonal antibodies (MoAb) used in the study.

Table S2: Results of the linear mixed-effects model.

Figure S1



A



B

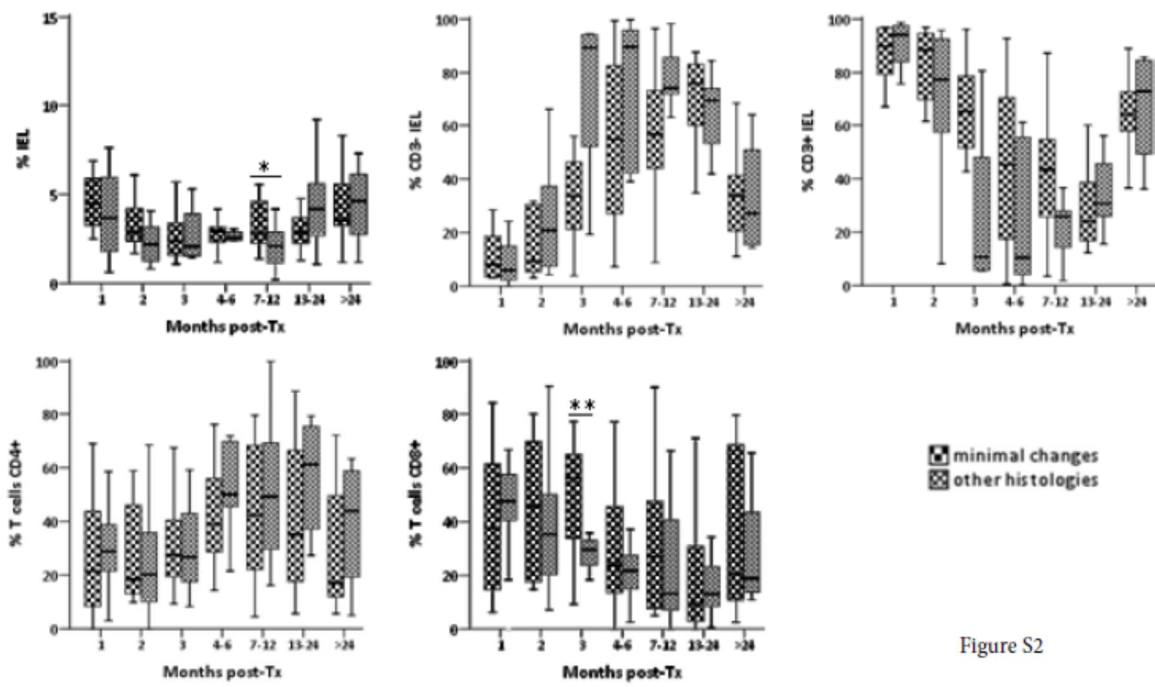
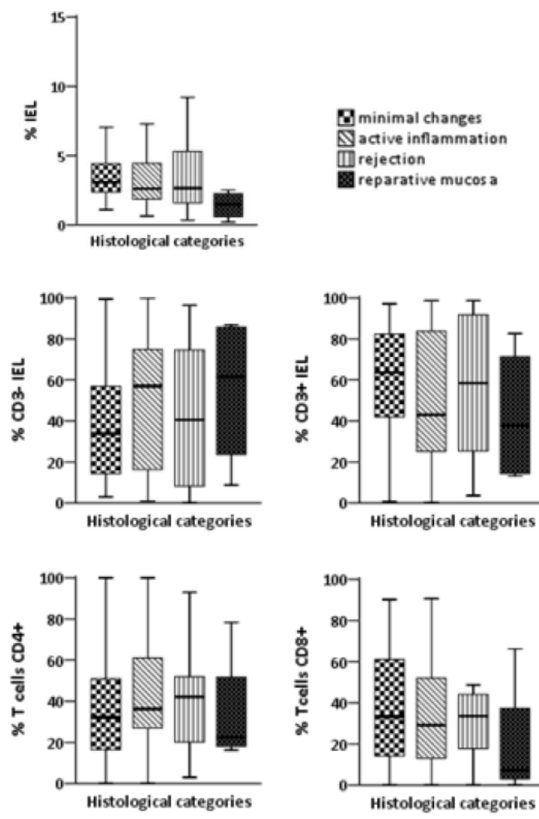


Figure S2

A



B

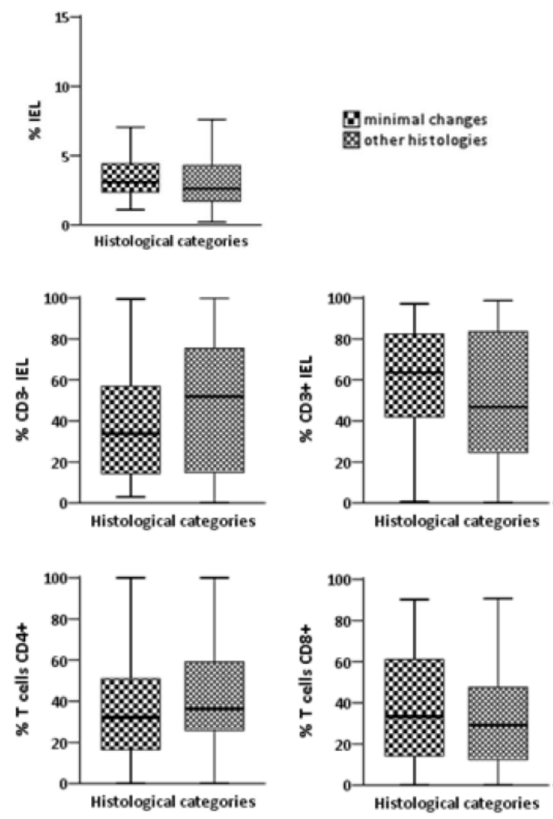


Figure S3

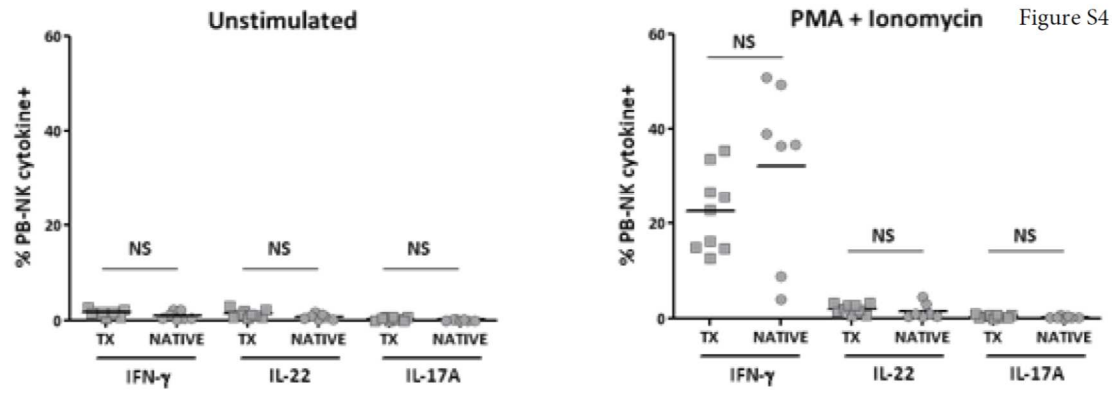
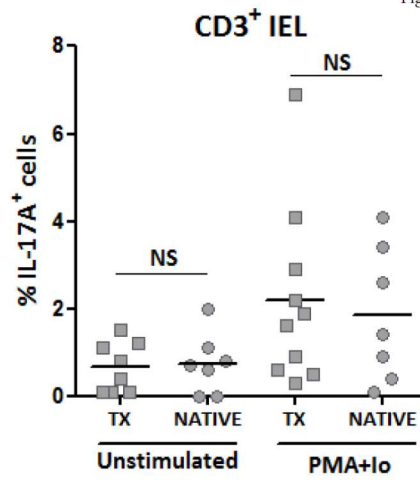


Figure S5



CAPÍTULO 3:

5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts.

Paloma Talayero, Lola Alonso Guirado, Guillermo Padilla, Haydee Artaza, Ana Dopazo, Fátima Sánchez-Cabo, Sarbelio Rodríguez Muñoz, Jorge Calvo Pulido, Esther Mancebo, Mario García de Lacoba, Estela Paz Artal.

Experimental and Molecular Pathology 2017 Oct;103(2):163-171

OBJETIVOS

La monitorización de la integridad del TxI se basa principalmente en el examen endoscópico e histológico de las biopsias de la mucosa intestinal. Sin embargo, estos procedimientos detectan los problemas una vez que se han producido los cambios en los tejidos, si bien los mecanismos moleculares responsables pueden precederlos significativamente.

En el campo del trasplante clínico existe una necesidad de biomarcadores predictivos para la evolución del aloinjerto. El análisis del transcriptoma del órgano trasplantado se viene empleando recientemente para la identificación de firmas moleculares relacionadas con rechazo, tolerancia o toxicidad farmacológica. Estos estudios pretenden trasladarse al contexto clínico proponiendo la medición de un número reducido de genes expresados diferencialmente para anticipar el evento y guiar la terapia. Sin embargo, la mayoría de ellos muestran dos limitaciones importantes. En primer lugar, debido a que analizan fenotipos patológicos muy seleccionados y distantes, es decir, biopsias de rechazo normales frente a agudos, sus resultados no proporcionan información adicional a la ya conocida. En segundo lugar, en todos estos estudios la expresión génica se ha medido con conjuntos de sondas que no interrogan todo el transcriptoma, sino solamente un grupo determinado de transcritos elegidos *a priori*.

Dados estos antecedentes y tomando como población 12 receptores intestinales adultos trasplantados en el Hospital Universitario 12 de Octubre, los objetivos planteados son:

1. Analizar mediante tecnología de RNA-Seq el transcriptoma de biopsias de íleon de injertos intestinales correspondientes a una histología de cambios mínimos.

2. Determinar una firma molecular de pocos genes que permita distinguir aquellas biopsias en riesgo de rechazo (biopsias de histología normal que se encuentren cercanas a episodios de rechazo).
3. Validar los hallazgos obtenidos mediante qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) en un grupo independiente de biopsias.
4. Establecer un modelo matemático de predicción basado en la expresión de los genes seleccionados, que resulte aplicable en la práctica clínica.

CONCLUSIONES

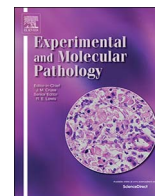
1. La tecnología de RNA-Seq resulta altamente sensible y permite distinguir molecularmente biopsias con un mismo diagnóstico histológico (“cambios mínimos” en nuestro estudio), observándose 816 genes diferencialmente expresados (DEGs) entre biopsias estables y biopsias no estables con riesgo de rechazo.
2. Los genes ADH1C (subunidad gamma de la alcohol deshidrogenasa de clase I), SLC39A4 (transportador de solutos de la familia 39, miembro 4), CYP4F2 (citocromo P450, familia 4, subfamilia F, polipéptido 2), OPTN (optineurina) y PDZK1 (factor 3 regulador del intercambiador sodio-hidrógeno) seleccionados mediante herramientas bioinformáticas del total de los 816 DEGs permiten la clasificación de estos dos tipos de biopsias en los dos grupos de estudio de RNA-Seq (set de descubrimiento y set de prueba).
3. La expresión de estos 5 genes obtenida mediante qPCR en un grupo de validación independiente permite construir un modelo matemático de predicción que valida los resultados obtenidos con RNA-Seq.
4. El modelo matemático de predicción resulta aplicable también a muestras con diagnósticos histológicos de indeterminado para rechazo y rechazo agudo.
5. Tanto la qPCR como el modelo matemático de predicción son aplicables fácilmente a la práctica clínica, pudiendo convertirse así en una herramienta de uso para la monitorización del injerto intestinal.

CAPÍTULO 3
PUBLICACIÓN



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental and Molecular Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexmp

5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts



Paloma Talayero^{a,b}, Lola Alonso-Guirado^c, Guillermo Padilla^c, Haydee Artaza^c, Ana Dopazo^d, Fátima Sánchez-Cabo^e, Sarbelio Rodríguez-Muñoz^f, Jorge Calvo-Pulido^g, Esther Mancebo^{a,b,h}, Mario García de Lacoba^c, Estela Paz-Artal^{a,b,h,i,*}

^a Department of Immunology, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^b I + 12 Research Institute, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^c Bioinformatics and Biostatistics Unit, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, Spain

^d Genomics Unit, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain

^e Bioinformatics Unit, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain

^f Department of Gastroenterology, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^g Department of General and Digestive Surgery and Abdominal Organ Transplantation, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^h School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

ⁱ Section of Immunology, San Pablo CEU University, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Intestinal transplantation
Graft stability
Gene expression
RNA-sequencing
Biomarkers

ABSTRACT

In intestinal allografts, endoscopy and histology detect the injury once changes in the bowel wall architecture have occurred. We aimed to identify a molecular signature that could predict early deterioration, within histologically indistinguishable biopsies with “minimal changes” (MC) pathology. Sixty biopsies from 12 adult recipients were longitudinally taken during 8 years post-transplant. They were classified as either stable (STA) or non-stable (NSTA) according to the prospectively recorded number, frequency and severity of rejection events of the allograft. In a discovery set of MC samples analyzed by RNA-Seq, 816 genes were differentially expressed in STA vs NSTA biopsies. A group of 5 genes (ADH1C, SLC39A4, CYP4F2, OPTN and PDZK1) correctly classified all NSTA biopsies in the discovery set and all STA biopsies from an independent set. These results were validated by qPCR in a new group of MC biopsies. Based on a logistic regression model, a cutoff of 0.28 predicted the probability of being a NSTA biopsy with 85% sensitivity and 69% specificity. In conclusion, by analyzing MC samples early after transplantation, the expression of a 5-gene set may predict the evolution of the bowel allograft. This prognostic biomarker may be of help to personalize care of the intestinal transplant recipient.

1. Introduction

Intestinal transplantation (IT) is a procedure to treat irreversible intestinal failure (caused in most cases by short bowel syndrome) in patients suffering life-threatening complications of parenteral nutrition. Until 2014, nearly 2500 ITx cases had been performed throughout the world, but despite recent improvements, management of IT recipients is still challenging (Grant et al., 2015; Kubal et al., 2015; Smith et al., 2017; Sudan, 2014). In contrast to other organs, the transplanted small bowel bears an important proportion of immune cells and commensal bacterial flora, making it prone to inflammation and infection. The

acute rejection rate of intestinal allografts is higher than in other organs and may appear early after transplantation and repeatedly with time (Ruiz, 2012). Severe rejection episodes involve immune mechanisms that eventually damage the intestinal absorptive capacity and favor the translocation of luminal bacteria, which are closely associated with graft loss and patient death. Other post-transplant (post-Tx) events such as lymphoproliferative disease, graft versus host disease, ulcers, enteritis, eosinophilic syndromes or *de novo* autoimmunity, derive from a complex interplay of both non-immune and immune factors as yet barely understood (Fishbein, 2009; Kroemer et al., 2016; Loo et al., 2017; Ranganathan et al., 2015; Selvaggi et al., 2007).

Abbreviations: AUC, area under the curve; CI, confidence interval; cpm, counts per million; DEGs, differential expressed genes; FDR, false discovery rate; GLM, generalized linear model; IRX, indeterminate for rejection; IT, intestinal transplantation; MC, minimal changes; MDS, multidimensional scaling; NSC, nearest shrunken centroids; NSTA, non-stable; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; RF, random forest; RNA-Seq, RNA sequencing; RX, rejection; SBT, small bowel transplantation; STA, stable; SVM, support vector machine; Tx, transplant

* Corresponding author at: Avenida de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain.

E-mail address: estela.paz@salud.madrid.org (E. Paz-Artal).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.08.008>

Received 23 May 2017; Received in revised form 25 July 2017; Accepted 19 August 2017

Available online 24 August 2017

0014-4800/ © 2017 Published by Elsevier Inc.

Monitoring of IT integrity relies on endoscopic and histological examination of intestinal mucosa biopsies, continuously performed during the first post-Tx period. However, in a recent series investigating 1770 endoscopies in pediatric transplants, 45% of biopsy-proven rejections showed a normal gross appearance, suggesting a low correlation between endoscopy and histology (Yeh et al., 2015). Thus, in many cases, these procedures detect the problems once tissular changes have occurred, although the responsible molecular mechanisms may significantly precede them.

In the clinical transplantation arena there is a need for predictive biomarkers for allograft evolution. The transcriptome analysis of the transplanted organ was introduced to identify molecular signatures for rejection, tolerance or drug toxicity. These studies aim to translate into the clinical setting by proposing the measurement of a reduced number of differentially expressed genes to anticipate the event and guide therapy. However, most studies show two important limitations. Firstly, because they analyze very selected and distant pathology phenotypes, *i.e.* normal vs acute rejection biopsies, their results do not provide additional information to that already known. Secondly, in all cases gene expression is measured with probe arrays which do not interrogate the whole transcriptome but an *a priori* determined set of transcripts.

In the present work, we aim to identify a molecular signature of IT deterioration before it translates into visible histological injuries. We explored histologically indistinguishable IT biopsies with minimal changes (MC), which corresponded to either stable (STA) or non-stable (NSTA) intestinal transplants. Because of its potential to quantify the complete transcriptome we used massive RNA sequencing (RNA-Seq) to measure differently expressed genes (Marguerat and Bahler, 2010; Wang et al., 2009). With the unprecedented use of this tool for biomarker discovery in transplantation, we identified and validated a 5-gene set as a molecular classifier with a good predictive capacity for the evolution of IT. The measurement of these 5 genes in IT biopsies by quantitative PCR (qPCR) may identify unstable intestinal allografts and guide early therapeutic intervention.

2. Materials and methods

2.1. Patients, biopsies and study design

The study included 12 adult recipients who had undergone small bowel (SBT) or multivisceral transplantation between 2005 and 2015 in our hospital (Table 1). Biopsies from ileal mucosa were taken at 10–20 cm from ileostomy. Endoscopic and biopsy controls were performed soon after transplantation and at progressively increasing

Table 1
Clinical data from small bowel and multivisceral recipients.

| Patient | Underlying disease | Gender | Age at Tx | Organ Tx |
|---------|---|--------|-----------|--------------|
| P1 | Familial Adenomatous Polyposis | Male | 40 | SBT |
| P2 | Familial Adenomatous Polyposis | Male | 44 | SBT |
| P3 | Familial Adenomatous Polyposis | Male | 24 | SBT |
| P4 | Acute mesenteric ischemia | Female | 38 | SBT |
| P5 | Crohn's disease | Male | 38 | SBT |
| P6 | Acute mesenteric ischemia | Male | 64 | SBT |
| P7 | Acute mesenteric ischemia | Male | 45 | SBT |
| P8 | Politraumatism | Male | 30 | SBT |
| P9 | Gastrointestinal stromal tumor (GIST) | Female | 47 | SBT |
| P10 | Familial Adenomatous Polyposis | Female | 32 | MVT |
| P11 | Primary intestinal lymphangiectasia Haemolytic uremic syndrome | Female | 26 | SBT + Kidney |
| P12 | Intestinal pseudo-obstruction syndrome | Female | 30 | MVT |

Tx: transplantation/SBT: small bowel transplantation/MVT: multivisceral abdominal transplantation.

intervals (2 per week during 1st month, 1 per week during 2nd and 3rd months, 1 every two weeks during 4th and 5th months, 1 monthly until the end of the first year, and then once every six months). According to this protocol, biopsies were routinely taken even in the absence of clinical symptoms, and additional endoscopies and biopsies were performed when clinical events appeared. Data from histological diagnosis from paired biopsies (examined by at least two independent pathologists) and immunosuppressive therapy were also collected. MC was considered in biopsies without specific histopathologic changes, closely resembling the features of normal gut. Indeterminate for rejection (IRX) was considered in biopsies with minimal rejection, < 6 apoptosis in 10 crypts, mild inflammatory infiltrate and edema. Rejection grade 1 (RX) was defined by increased apoptosis in crypts and epithelium, occasional endothelitis and mild villous blunting (Fig. S1) (Andreev et al., 2011; Wu et al., 2003).

All patients received alemtuzumab for induction therapy, except P11 (SBT plus kidney recipient) and P12 who received thymoglobulin. The main immunosuppressive drug was tacrolimus in all patients. Mycophenolate mofetil was added in patients P1, P2, P3, P4 and P12 within the first three months post-Tx. P4, P6, P10, P11 and P12 received everolimus at 2 months, 6 years, 4 years, 8 months and 1 month post-Tx respectively. Corticosteroids were administered because of a rejection episode in P3, P4, P7, P8, P10 and P11 and because of Crohn's disease (P5), adrenal insufficiency (P10) or kidney allograft (P11).

A total of 60 IT biopsies were longitudinally taken between 2011 and 2015 in a post-Tx period of 13 to 3101 days. Fifty biopsies showed MC, 7 were IRX, and 3 showed RX (Table 2). All 50 MC biopsies were classified into two groups. STA group included all biopsies from allografts of patients who had experienced no rejection, and biopsies from patients who rejected, obtained at least 15 days after rejection, if no other event occurred within the next six months. When rejection occurs, 3 boluses of methylprednisolone are administered followed by decreasing doses of prednisone for 5–10 days. By day 15 after the last rejection biopsy, corticosteroids are minimized and patients are considered clinically stable. NSTA group included biopsies obtained between rejection episodes (those occurring < 6 months apart), together with biopsies collected within 15 days before the first rejection episode. By defining the biopsies under these criteria we hypothesized that biopsies in the STA category may represent quiescent intestines whereas biopsies in the NSTA group may represent intestinal allografts prone to suffer rejection events. This categorization was established prior to analysis.

Fig. 1A shows the workflow for biomarker identification and validation. Twenty-four MC samples (discovery and test sets, 17 STA and 7 NSTA) from 8 patients (Fig. 1B and Table 2) were analyzed by RNA-Seq. Eighteen biopsies for the discovery set (11 STA and 7 NSTA) were obtained from 4 IT recipients. To minimize differences due to the intrinsic characteristics of patients, 3 recipients (P2, P3 and P4) were included because they were the only ones with both STA and NSTA biopsies. All biopsies from the fourth patient included in the discovery set (P1) were STA samples, but they were obtained at a post-Tx period matching that of the other 3 recipients (most biopsies taken within the first year post-Tx) (Fig. 1B). The other 6 biopsies from the remaining 4 patients (P5, P6, P7 and P8) were used as the test set. These 6 biopsies were all STA and were taken at long post-Tx time (more than two years) (Fig. 1B and Table 2). Genes obtained in the RNA-Seq stage as possible biomarkers were validated as predictors by qPCR and logistic regression in a validation set formed by 26 independent biopsies (17 STA and 9 NSTA) from 9 patients. The model was then tested in a rejection set formed by 10 new biopsies (7 IRX and 3 RX) from 4 patients, and in 16 biopsies from the initial discovery set (Fig. 1 and Table 2).

Experiments were approved by the institutional review board (CEIC 13/370) and written informed consent was obtained from all patients.

Table 2
Number of biopsies studied according to post-transplantation time.

| Patient | No bx | RNA-Seq | | qPCR | |
|---------|-------|------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|
| | | Discovery set | Test set | Validation set | Rejection set |
| P1 | 7 | 4 STA (33,92,113,643) | – | 3 STA (26,44,1201) | – |
| P2 | 12 | 4 STA (79,99,134,509) | – | 2 STA (86,162) | 1 IRX (448) |
| | | 1 NSTA (33) | | 2 NSTA (21,72) | 2 RX (17,58) |
| P3 | 5 | 2 STA (125,185) | – | – | 1 IRX (37) |
| | | 2 NSTA (30,49) | | | |
| P4 | 11 | 1 STA (244) | – | 2 STA (986,1096) | 3 IRX (13,69,208) |
| | | 4 NSTA (48,90,115,176) | | 1 NSTA (55) | |
| P5 | 2 | – | 2 STA (1826,1874) | – | – |
| P6 | 2 | – | 2 STA (929,1504) | – | – |
| P7 | 2 | – | 1 STA (2292) | 1 STA (2202) | – |
| P8 | 2 | – | 1 STA (1096) | 1 STA (2297) | – |
| P9 | 1 | – | – | 1 STA (2306) | – |
| P10 | 1 | – | – | 1 STA (3101) | – |
| P11 | 4 | – | – | 4 STA (14,20,25,39) | – |
| P12 | 11 | – | – | 2 STA (157,171) | 2 IRX (31, 66) |
| | | | | 6 NSTA (18,27,38,69,73,87) | 1 RX (48) |

Numbers between () represent days post-transplantation/Bx: biopsies/STA: biopsy with minimal changes considered in the stable group/NSTA: biopsy with minimal changes considered in the non-stable group/IRX: biopsy with a diagnosis of indetermined for rejection/RX: biopsy with a diagnosis of acute rejection grade 1.

2.2. RNA isolation and quality control

Following extraction, intestinal biopsies were immediately submerged in RNAlater solution (Ambion, Austin, TX, USA) and stored at -80°C . Samples were maintained this way until RNA extraction, which was performed just before sample processing. After tissue disruption with needle and syringe and homogenization with QIAshredder, RNA was isolated and purified with RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA integrity of samples included in RNA-Seq ($n=24$) was determined in a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). All samples passed the quality control, showing an RNA integrity number exceeding 7.

2.3. RNA-Seq library production and sequencing

Total RNA was input into the TruSeq RNA Sample Preparation v2 Kit (Illumina, San Diego, CA) to construct index-tagged cDNA libraries. The quality, quantity and size distribution of the Illumina libraries were determined using DNA-1000 Kit (Agilent Bioanalyzer). Libraries were sequenced on Genome Analyzer Iix following the standard RNA-Seq protocol with TruSeq SBS Kit v5. Fastq files containing reads for each library were extracted and demultiplexed with Casava v1.8.2 pipeline. Raw data from the 24 RNA-Seq samples have been deposited in NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) with number GSE74118.

2.4. RNA-Seq data analysis and classifier discovery

Sequencing adapter contaminations and low-quality reads were removed using Cutadapt software v1.6 (Martin, 2011). Resulting reads were aligned to the reference human genome (Ensembl gene-build GRCh37.75) using TopHat2 v2.0.13 (Kim et al., 2013; Trapnell et al., 2012). Gene expression values were calculated as counts using HTSeq v0.6.1 (Anders et al., 2015). Only genes above 1 count per million (cpm) in all samples were considered for statistical analysis. Data were then normalized by trimmed mean of M-values normalization method (TMM) and differences between STA and NSTA groups in the discovery set were tested by a generalized linear model (GLM) analysis. To reduce error variance, patient identity and treatment with or without corticosteroids were incorporated into the linear predictor model as blocking factors, so their effects could be discarded when comparing biopsies. Both normalization and model fitting were implemented with the R Bioconductor package edgeR (Robinson et al., 2010). Results were considered significant when Benjamini-Hochberg adjusted p-value

was < 0.05 (false discovery rate, FDR $< 5\%$). Gene classification, training and testing were performed using nearest shrunken centroids (NSC) method with the R Bioconductor package pamr (Hibi et al., 2012; Tibshirani et al., 2002) and support vector machine (SVM), bagSVM and random forest (RF) (Chen and Ishwaran, 2012; Furey et al., 2000; Peng, 2006; Wang and Sarwal, 2015) with the R Bioconductor package MLSeq. BioGPS (Su et al., 2004; Wu et al., 2009) was used to assess the biological significance of the selected genes. A gene was considered tissue-specific if its expression was at least 3-fold higher in a given tissue than the median expression of the gene across all tissues (Khatri et al., 2013; Roedder et al., 2015).

2.5. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)

The expression of the 5 genes selected as classifiers (ADH1C, SLC39A4, CYP4F2, OPTN and PDZK1) was measured with predesigned TaqMan Gene Expression assays (Hs02383872_s1, Hs01592433_g1, Hs00426608_m1, Hs00184221_m1, Hs00275727_m1, Hs02758991_g1) on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) according to manufacturer's instructions for standard runs and final volume of 20 μL . Threshold cycle (Ct) scores were calculated as the average of the triplicates, and they were normalized against Ct scores for the endogenous control (GAPDH). Relative expression was determined as $2^{-\Delta\text{Ct}}$, where $\Delta\text{Ct} = \text{Ct gene of interest} - \text{Ct endogenous control}$ (Schmittgen and Livak, 2008). To evaluate the performance of the classifiers as a diagnosis test, a logistic regression model with Firth penalization (used to reduce small-sample bias in maximum likelihood estimation) (Firth, 1993; Heinze and Puh, 2010; Markowetz and Spang, 2005; Wang, 2014) was built with the relative gene expression data of the validation set. Bootstrap operations for confidence interval (CI) were performed with a non-parametric non-stratified resampling and with the percentile method, as previously described (Carpenter and Bithell, 2000). The generated model was then validated in the rejection set and also in 16 samples of the discovery set. R Bioconductor packages logistf (Heinze et al., 2013), pROC (Robin et al., 2011) and Epi (Carstensen et al., 2017) were used for statistical computing.

Data from qPCR and all R scripts are available as Supplementary Materials and Methods in the Mendeley Data Repository.

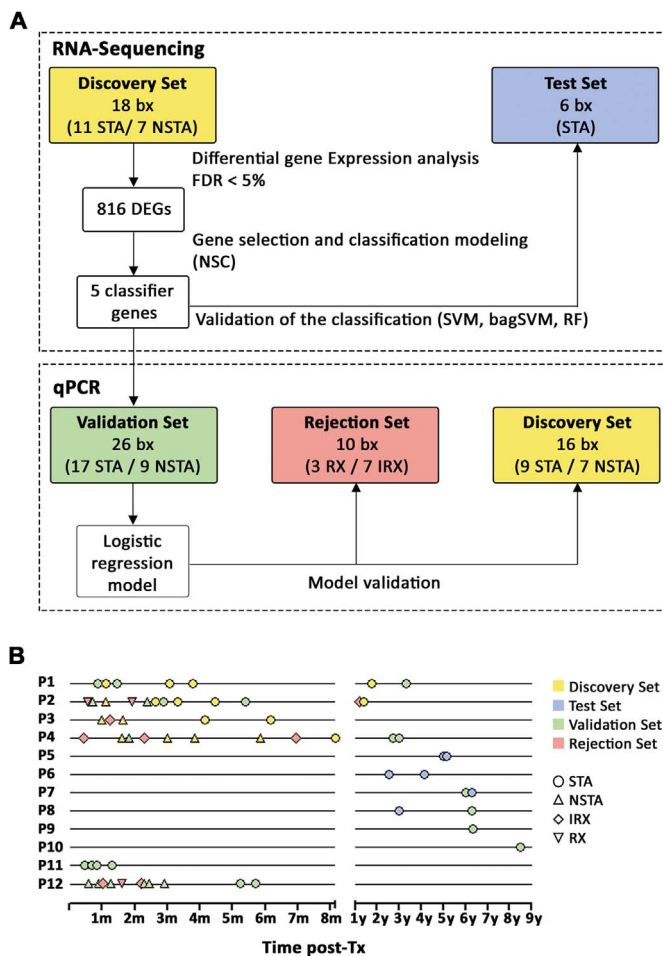


Fig. 1. Workflow of biomarker panel identification and validation, biopsies and patients. (A) In the RNA-Seq stage, the selection of classifier genes was performed with the discovery set, while the test set was used for validation of the results. In the qPCR stage, a logistic regression model was built with the results of a new independent cohort (validation set). The model was tested in the rejection set and re-validated in 16 samples of the discovery set (the remaining 2 samples were not tested because no RNA was available). (B) Graphic representation of studied biopsies along post-transplant time for each patient. Symbols represent biopsy type (STA, NSTA, IRX or RX) and colors show the group where they are included (discovery, test, validation and rejection sets). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3. Results

3.1. 816 genes are differentially expressed in stable and non-stable biopsies

Tables 1 and 2 summarize the main characteristics of IT recipients and collected biopsies. Fig. 1 shows the flowchart and composition of every sample set analyzed. MC biopsies (Fig. S1) were classified into STA or NSTA samples according to criteria described in the Materials and Methods section. By analyzing the data obtained from the RNA-Seq of the discovery set we aimed to find differentially expressed genes (DEGs) between STA and NSTA biopsies in spite of all them being MC, histologically undistinguishable samples. A total of 13,333 genes showed > 1 cpm in all samples. To search for a possible bias in the samples that could negatively affect future differential expression analysis, we performed a multidimensional scaling (MDS) plot of normalized data (Fig. S2A). Because the MDS plot showed a bias by patient identification, this was considered as a blocking factor in GLM analysis when computing differential expression. Administration of corticosteroids at the time of collecting the biopsy was also taken into account as a blocking factor, since it is directly related to rejection. We found 816

DEGs between STA and NSTA biopsies (FDR < 5%); 369 of them were downregulated and 447 were upregulated in NSTA group (Fig. S2B).

3.2. 5 classifier genes discriminate STA and NSTA biopsies

To find a gene signature that could discriminate between STA and NSTA biopsies we performed a NSC analysis with the 816 DEGs. A subset of 5 DEGs was obtained: ADH1C (class I alcohol dehydrogenase gamma subunit), SLC39A4 (solute carrier family 39, member 4), CYP4F2 (cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2), OPTN (optineurin) and PDZK1 (sodium-hydrogen exchanger regulatory factor 3). ADH1C was more expressed and SLC39A4, CYP4F2, OPTN and PDZK1 were downregulated in NSTA biopsies (Fig. 2A). These 5 genes classified biopsies of the discovery set in STA and NSTA with an overall error rate of 11%, showing a misclassification of 2 out of 11 STA biopsies as NSTA (Fig. 2B and Table S1) whereas, importantly, all NSTA biopsies were correctly classified. When we calculated the probability of being NSTA in the test set (formed by 6 STA samples) with the model built by the NSC method, all biopsies were correctly classified as STA with NSTA probabilities < 0.01 (Fig. 2B). The power of the 5-gene set to predict stability in discovery and test sets (collectively considering all 24 samples) was confirmed by SVM, bagSVM and RF methods, showing an accuracy, specificity and sensitivity of 100% in the discovery set modeling (Table 3). The predictions for the test set were almost perfect, with only one STA sample misclassified as NSTA by RF method. In hierarchical clustering (Fig. 2C) samples with different phenotypes clustered separately even if they came from the same patient. Interestingly, samples with the same phenotype from the same patient clustered together, especially if they were close in time (P3_49 and P3_30, P1_92 and P1_33, P5_1874 and P5_1826), which could be considered a good quality control. Principal component analysis (Fig. 2D) showed also good segregation of the samples.

Using BioGPS (Khatri et al., 2013), we found that ADH1C, SLC39A4, CYP4F2 and PDZK1 are preferentially expressed in the small bowel. Interestingly, OPTN was found highly expressed in T lymphocytes (especially in CD4+ but also in CD8+ cells), natural killer (NK) and other cells of lymphoid lineage (Fig. 3).

3.3. qPCR validation of the 5-gene model

In order to validate the results obtained by RNA-Seq and with the aim of developing a possible diagnostic tool, the 5-gene set expression was measured by qPCR in a new independent group of biopsies. This validation set included 26 biopsies (17 STA and 9 NSTA) from 9 patients (Fig. 1 and Table 2). A logistic regression model (corrected with Firth penalization to reduce small-sample bias in maximum likelihood estimation) was developed with the GAPDH-normalized 5-gene expression data. Table S2 shows regression coefficients that describe the size of the contribution of each gene as a risk factor.

Based on the ROC curve built upon this regression model with an AUC of 0.81 (95% CI, 0.63 to 0.96), a cutoff value $\theta = 0.28$ classified NSTA and STA samples with 53% specificity and the highest sensitivity (100%) (95% CI, 0.29 to 0.76), and, importantly, it allowed the detection of every NSTA biopsy (Fig. 4A). The 5 gene-model was subsequently tested in a set of samples with histological diagnosis of IRX ($n = 7$) or acute rejection ($n = 3$, Table 2), under the hypothesis that it should classify these samples as NSTA. Assuming the same reference value of 0.28 as a classifier score, the model misclassified only one IRX sample and one RX biopsy (the last one with a predicted probability of 0.27) (Fig. 4B). Finally, within 16 biopsies from discovery set (9 STA and 7 NSTA) tested by the regression model, only two NSTA samples were misclassified (Fig. 4C). Taking together all the results obtained in the three sets of samples (discovery, rejection and validation), the model showed an accuracy of 77% (85% sensitivity, 69% specificity, 73% positive predictive value, 82% negative predictive value).

Fig. 4D shows the predicted probabilities in four different patients,

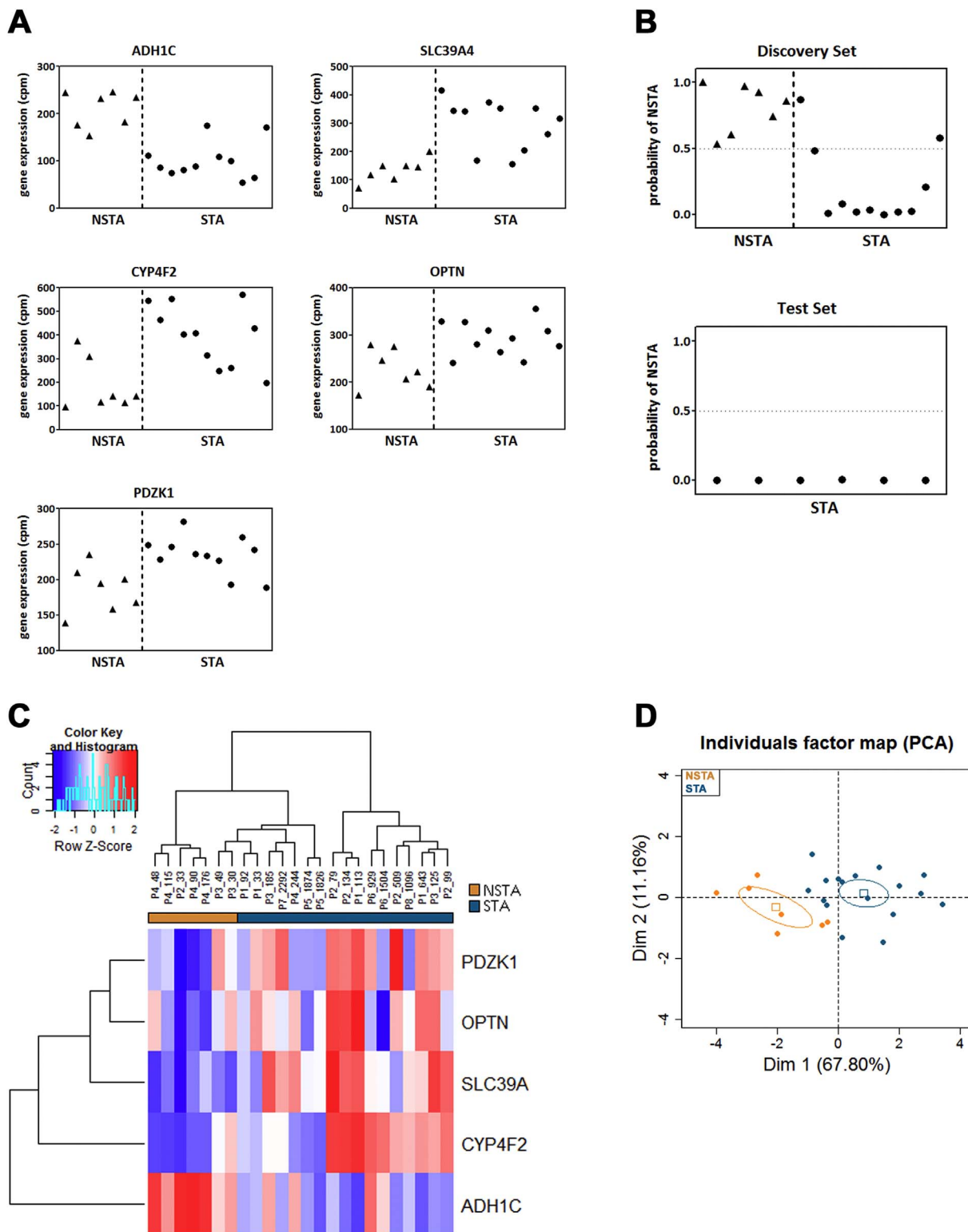


Fig. 2. Gene selection and prediction based on the 5-gene set RNA-Seq expression values. (A) Expression in cpm of the top five genes selected by NSC method. Each symbol represents a biopsy. NSTA samples are represented by ▲ and STA samples by ●. (B) The probabilities of being NSTA based on the expression of these five genes were calculated for the discovery set (up) and the test set (down). (C) Heatmap and hierarchical clustering (dissimilarities are represented by the Manhattan distance and clusters are defined by the Ward method) in both discovery and test sets show the segregation of STA and NSTA samples. Rows represent genes, and columns represent biopsies. Relative expression values were calculated as standardized z-scores, obtained by the following formula: $z\text{-score} = (x - \text{mean}) / \text{standard deviation}$, where “x” is the normalized gene expression of each sample. Z-scores were scaled across rows. Red and blue indicate respectively over- and under-expression of the gene. (D) Principal Component Analysis plot. STA and NSTA samples of discovery and test sets are clearly separated along dimension 1, which explains 67.8% of the differences between both groups. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3
Results of prediction by SVM, bagSVM and RF methods.

| Method | Discovery set modeling | Test set prediction (+ 1 NSTA bx from discovery test) | | | |
|--------|------------------------|---|-------------------|------|---|
| SVM | Accuracy (%): | 100 | Prediction | | |
| | Sensitivity (%): | 100 | STA | NSTA | |
| | Specificity (%): | 100 | Actual STA | 6 | 0 |
| | | | NSTA | 0 | 1 |
| bagSVM | Accuracy (%): | 100 | Prediction | | |
| | Sensitivity (%): | 100 | STA | NSTA | |
| | Specificity (%): | 100 | Actual STA | 6 | 0 |
| | | | NSTA | 0 | 1 |
| RF | Accuracy (%): | 100 | Prediction | | |
| | Sensitivity (%): | 100 | STA | NSTA | |
| | Specificity (%): | 100 | Actual STA | 5 | 1 |
| | | | NSTA | 0 | 1 |

SVM: support vector machine/RF: random forest.

those with a higher number of studied biopsies along post-Tx time. Patient 1 never suffered rejection so, with regard to our initial definition, all his 6 biopsies were STA. According to predicted probabilities, only the sample obtained at day 26 post-Tx was misclassified, whereas all other biopsies (from day 33 to 1201 post-Tx) were correctly classified. Within 12 samples from patient 2, only two were misclassified. The first was a RX biopsy taken at day 58 and was classified as STA with a probability value very close to the cutoff (0.27). The second misclassified biopsy was taken on day 448. This sample, which was diagnosed as IRX, was an isolated biopsy with no previous or later RX or IRX biopsies. The patient did not develop clinical symptoms of rejection and no changes were made in the immunosuppression. Accordingly, this biopsy might well have been classified as MC and STA. Patient 4 suffered several IRX biopsies and many rejection episodes even two years post-Tx. The unstable evolution of his intestinal graft is well reflected by the predicted probabilities that show three misclassifications (within 11 samples analyzed). Patient 12 showed only one misclassification out of 11 samples, corresponding to the biopsy obtained at day 171 (STA). Although this sample was classified as NSTA, its predicted probability was lower than probabilities for the same patient NSTA, RX or IRX biopsies. These examples illustrate that the molecular signature described here may be more accurate than histology to diagnose the status of intestinal allograft. Not only the predicted probability values of isolated samples, but also the trend of probabilities within each patient could be a guide to prognosticate the transplant stability.

4. Discussion

The design of the present analysis shows three main strengths. Firstly, as opposed to other studies (Bradley et al., 2008), we have not compared clinical distant, rejection vs non-rejection biopsies, but we have analyzed an *a priori* histologically homogeneous, all “minimal changes” group of samples. The emerged 5-gene signature is able to accurately identify MC biopsies corresponding to non-stable intestinal transplants which will probably suffer more frequent and more severe rejection events, and MC biopsies corresponding to stable grafts. Secondly, because we found the 5-gene signature in biopsies showing incipient injury, valuable information has been gained about the molecular mechanisms of early IT deterioration before it translates into visible histological changes. Thirdly, the transcriptome has been profiled by RNA-Seq, a technology that does not explore a predetermined set of transcripts according to an array of probes, but the whole transcriptome. RNA-Seq has shown to be a highly quantitative technology with a wide dynamic range and measures differential gene expression at least as well as microarrays (Marguerat and Bahler, 2010; Wang et al., 2009). On the other hand, IT is a very infrequent clinical procedure and obtaining biopsy samples for research purposes is hampered by sophisticated logistics. The disparity between the sample size and the

multidimensionality of the analyzed data needs to be mentioned as a limitation in our study. Nevertheless, classifiers obtained in only 4 patients have been validated in eight different patients set by several methods. In small cohorts, slight inter-individual differences have greater effects, so to standardize and validate the findings has an added value.

We performed a search of the 5 genes reported here across all transplantation-related transcriptomes deposited in GEO. In a study of renal transplants, all 5 genes were more expressed in biopsies from well-functioning grafts than in biopsies from acute rejection or renal dysfunction without rejection (Flechner et al., 2004). This is consistent with changes in the same direction for CYP4F2, PDZK1, SLC39A4 and OPTN in the present study, as these genes were significantly more expressed in STA vs NSTA samples.

All 5 genes included in the molecular signature are important for the enteric physiology. ADH1C (also known as ADH3), mediates the synthesis of retinoic acid by metabolizing retinol (Molotkov et al., 2002). Migratory dendritic cells from mesenteric lymph nodes use retinoic acid to induce the expression of gut homing molecules on T cells and innate lymphoid cells 1 and 3 (Habtezion et al., 2016). The recorded overexpression of ADH1C in NSTA samples might be consistent with an enhanced retinoic acid-mediated lymphocyte traffic into the small intestine, as the first step for the initiation of local effector responses that might disrupt the stability of the allograft.

CYP4F2, which was downregulated in NSTA samples, reduces the activity of several fatty acid metabolites of arachidonic acid, such as leukotriene B4 and prostaglandins, which are potent mediators of inflammation. The role of CYP4F2 in reducing inflammation could be related with the association of certain CYP4F2 single nucleotide variants with Crohn's (Costea et al., 2010) and celiac diseases (Curley et al., 2006). Interestingly, a metabolomics analysis of effluent fluid from ileostomy or stool in IT recipients found that leukotriene E4 showed the highest fold change in rejection compared to non-rejection samples (Girlanda et al., 2012).

PDZK1 expression is limited to epithelial cells. It is a fundamental component in brush borders of renal proximal tubular cells, where it interacts with sodium transporters (Gisler et al., 2003). Recently, PDZK1 mRNA and protein have been shown strongly downregulated in the enterocytes of a model of murine colitis and in ulcerative colitis patients (Lenzen et al., 2012; Yeruva et al., 2015). The decrease of PDZK1 diminishes the sodium/hydrogen ionic transport rate of members of the solute carrier family (SLC) located in the apical membrane of the enterocyte. These observations link intestinal inflammation to molecular disturbances in the enteric physiology. The decrease of PDZK1 in NSTA biopsies may be considered a biomarker of ongoing inflammation in the intestinal graft.

SLC39A4, also known as ZIP4, is abundantly expressed in the apical membrane of the enterocytes. Mutations in SLC39A4 impair zinc absorption and cause acrodermatitis enteropathica (Kury et al., 2002; Yeruva et al., 2015). Insufficient zinc absorption is commonly observed among IT recipients (Ubesie et al., 2013; Venick et al., 2006, 2011). Overexpression of SLC39A4 in hepatocellular or pancreatic carcinomas increases cell growth and represses apoptosis (Weaver et al., 2010; Zhang et al., 2010), while its lack in enterocytic-specific SLC39A4 KO mice causes dysfunction of Paneth cells that leads to disruption of the villus stem cell niche in the crypts. Remarkably, apoptosis and crypts distortion are hallmarks of intestinal allograft rejection (Ruiz et al., 2004, 2010).

Within the 5-gene signature, only OPTN is significantly expressed in lymphoid cells. This is biologically consistent with the fact that the inflammatory infiltrate was not a prominent feature in most samples, as they were MC biopsies. Optineurin participates in the autophagy process to limit intracellular proliferation of *Salmonella* (Wild et al., 2011). Mice without OPTN are significantly susceptible to *Salmonella* infection (Slowicka et al., 2016) and peritonitis caused by *Citrobacter* colitis and *E. coli*, due to reduced neutrophil recruitment to sites of acute

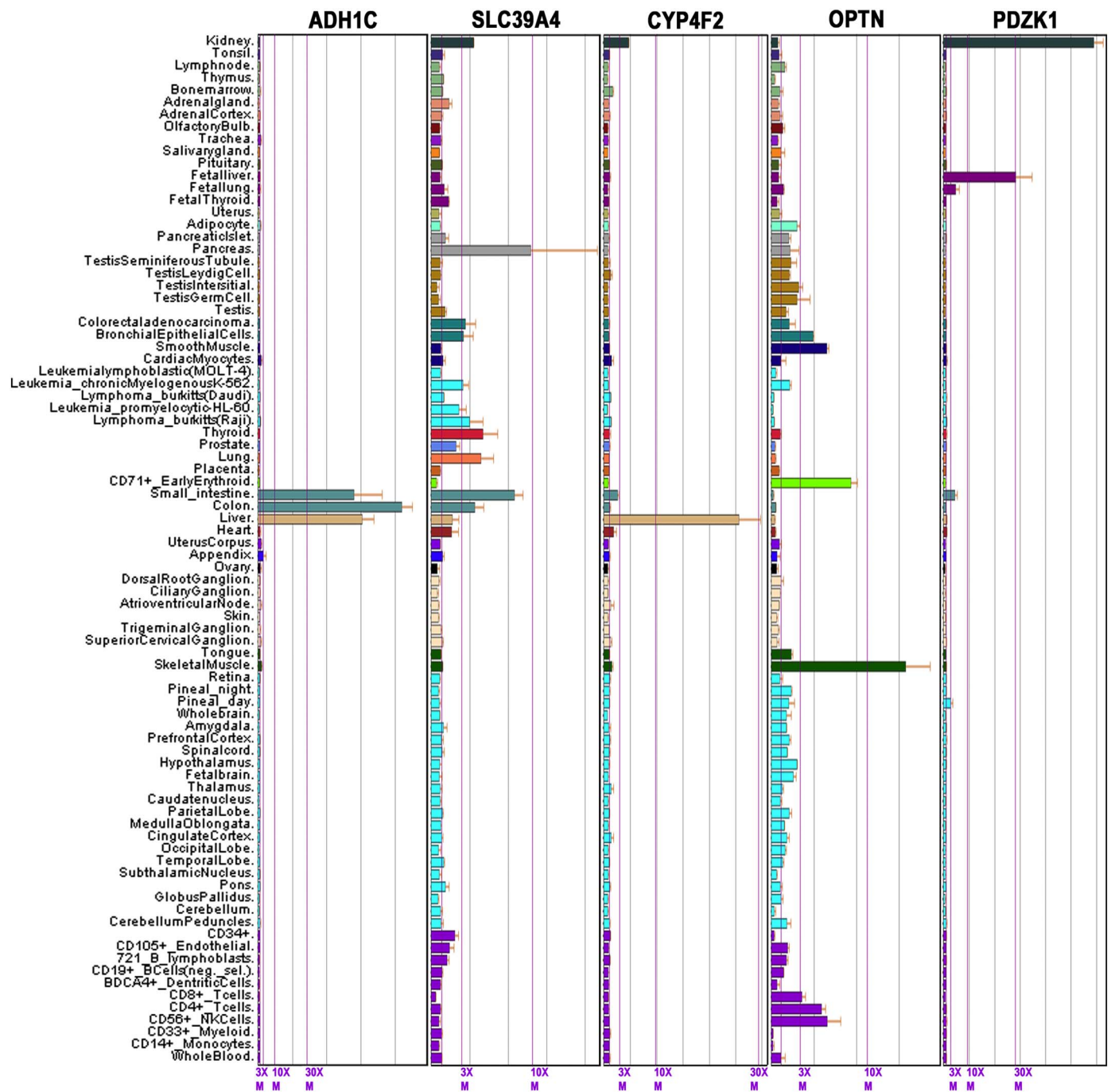


Fig. 3. Tissue-specific patterns of mRNA expression of the 5-genes set. Gene expression profiles of 79 human tissues obtained from the GeneAtlas U133A dataset (BioGPS). It has been proposed that a gene is tissue-specific if its expression is at least 3-fold higher in a given tissue than the median expression of the gene across all tissues.

inflammation and impaired pro-inflammatory cytokine secretion. (Chew et al., 2015). In a subgroup of patients with Crohn's disease, optineurin was the most common under-expressed transcript in macrophages, which were also defective in production and release of tumor necrosis factor and interferon- γ after stimulation by *E. coli* (Smith et al., 2015). Interestingly, profiling of microbiota in ileal effluents from transplanted intestines showed an increase of taxa from the *Enterobacteriaceae* family during rejection (Oh et al., 2012). These data suggest a role for optineurin in the innate immune response to bacteria in the gut. A reduced expression of OPTN might negatively impact the evolution of the intestinal allograft by favoring the bacterial overgrowth.

In conclusion, we have found a 5-gene expression signature useful as a prognostic classifier for the intestinal grafts that may help to intensify

or reduce surveillance biopsies or therapy. The molecular signature can be identified early after transplantation and does not include typical inflammation or effector immune response transcripts, which probably correspond to allografts with prominent infiltration and more advanced injury phases. Thus, the 5-gene set may discriminate, within histologically indistinguishable biopsies, those corresponding to grafts with damage before they translate into visible tissular changes. Given this molecular information, clinical decisions such as the dose adjustment of immunosuppressive drugs or the biopsy monitoring frequency could be taken to prevent and anticipate the allograft damage. Histological findings of intestinal rejection (Ruiz et al., 2004) are not specific and high apoptosis rates can be found in patients receiving mycophenolate mofetil (Apostolov et al., 2017) or during adenovirus infections

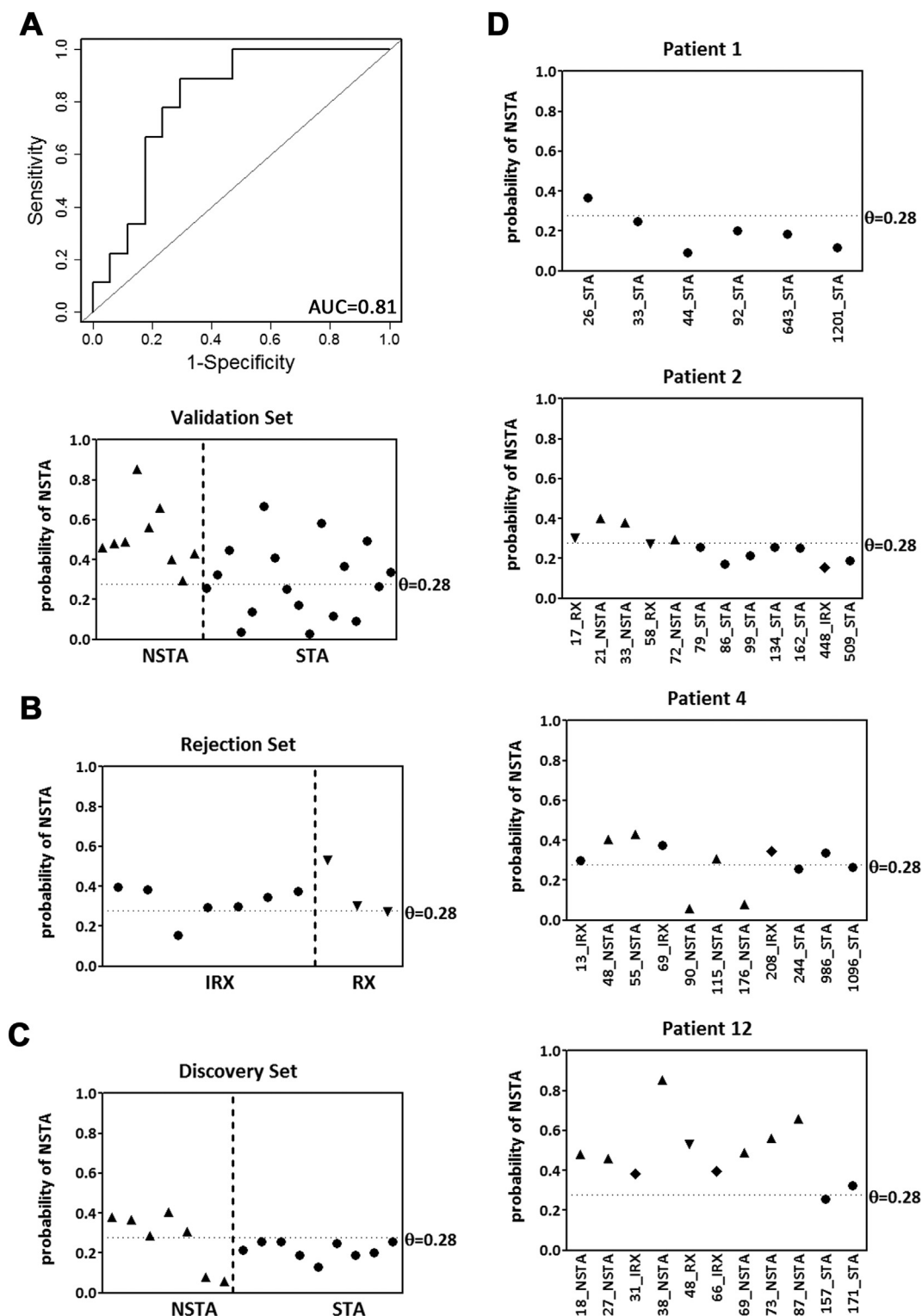


Fig. 4. 5-gene set qPCR validation. (A) ROC curve from the logistic regression model developed with qPCR gene expression data from the discovery set for a probability cutoff $\theta = 0.28$ (up). Performance of the regression model in the validation set (down). (B, C) Predicted probabilities on the rejection set (B) and discovery set (C) biopsies derived from the logistic regression model. Dotted line represents the cutoff value selected ($\theta = 0.28$). (D) Evolution of the predicted probabilities along post-transplant time in four different patients. Biopsies are plotted in the x axis (numbers show the days after transplantation). ● STA, ▲ NSTA, ▼ RX, ◆ IRX.

(Kaufman et al., 2002). As the 5-gene set also identifies RX and IRX biopsies, it could be useful to discriminate those “false rejection” biopsies, avoiding the aggressive anti-rejection therapies. Larger studies of more samples, pediatric patients and a prospective and multicenter design may provide further evidence of our results and confirm their clinical usefulness.

Acknowledgments

We thank Dra. P. López García for the images of the histology of the intestinal biopsies. We also thank the patients for their collaboration in this study.

Funding sources

Funding for this study was obtained from projects 13/00045 and 13/01407 to E. P-A (Instituto de Salud Carlos III, Spain and European Regional Development Fund) and project 13/0068 to J. C-P (Fundación Mutua Madrileña).

Disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.08.008>.

References

- Anders, S., et al., 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169.
- Andreev, V.P., et al., 2011. Peripheral blood gene expression analysis in intestinal transplantation: a feasibility study for detecting novel candidate biomarkers of graft rejection. *Transplantation* 92, 1385–1391.
- Apostolov, R., et al., 2017. Mycophenolate mofetil toxicity mimicking acute cellular rejection in a small intestinal transplant. *World J. Transplant.* 7, 98–102.
- Bradley, S.P., et al., 2008. Genetic expression profile during acute cellular rejection in clinical intestinal transplantation. *Transplantation* 86, 998–1001.
- Carpenter, J., Bithell, J., 2000. Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians. *Stat. Med.* 19, 1141–1164.
- Carstensen, B., et al., 2017. Epi: A Package for Statistical Analysis in Epidemiology.
- Chen, X., Ishwaran, H., 2012. Random forests for genomic data analysis. *Genomics* 99, 323–329.
- Chew, T.S., et al., 2015. Optineurin deficiency in mice contributes to impaired cytokine secretion and neutrophil recruitment in bacteria-driven colitis. *Dis. Model. Mech.* 8, 817–829.
- Costea, I., et al., 2010. Genes involved in the metabolism of poly-unsaturated fatty-acids (PUFA) and risk for Crohn's disease in children & young adults. *PLoS One* 5, e15672.
- Curley, C.R., et al., 2006. A functional candidate screen for coeliac disease genes. *Eur. J. Hum. Genet.* 14, 1215–1222.
- Firth, D., 1993. Bias reduction of maximum likelihood estimates. *Biometrika* 80, 27–38.
- Fishbein, T.M., 2009. Intestinal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 361, 998–1008.
- Flechner, S.M., et al., 2004. Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Transplant.* 4, 1475–1489.
- Furey, T.S., et al., 2000. Support vector machine classification and validation of cancer tissue samples using microarray expression data. *Bioinformatics* 16, 906–914.
- Girlanda, R., et al., 2012. Metabolomics of human intestinal transplant rejection. *Am. J. Transplant.* 12 (Suppl. 4), S18–26.
- Gisler, S.M., et al., 2003. PDZK1: I. A major scaffold in brush borders of proximal tubular cells. *Kidney Int.* 64, 1733–1745.
- Grant, D., et al., 2015. Intestinal transplant registry report: global activity and trends. *Am. J. Transplant.* 15, 210–219.
- Habtezion, A., et al., 2016. Leukocyte trafficking to the small intestine and colon. *Gastroenterology* 150, 340–354.
- Heinze, G., Puh, R., 2010. Bias-reduced and separation-proof conditional logistic regression with small or sparse data sets. *Stat. Med.* 29, 770–777.
- Heinze, G., et al., 2013. Logistf: Firth's Bias Reduced Logistic Regression.
- Hibi, T., et al., 2012. Citrulline level is a potent indicator of acute rejection in the long term following pediatric intestinal/multivisceral transplantation. *Am. J. Transplant.* 12 (Suppl. 4), S27–32.
- Kaufman, S.S., et al., 2002. Discrimination between acute rejection and adenoviral enteritis in intestinal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 34, 943–945.
- Khatiri, P., et al., 2013. A common rejection module (CRM) for acute rejection across multiple organs identifies novel therapeutics for organ transplantation. *J. Exp. Med.* 210, 2205–2221.
- Kim, D., et al., 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 14, R36.
- Kroemer, A., et al., 2016. Intestinal transplant inflammation: the third inflammatory bowel disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 18, 56.
- Kubal, C.A., et al., 2015. Intestine and multivisceral transplantation: current status and future directions. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 17, 427.
- Kury, S., et al., 2002. Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat. Genet.* 31, 239–240.
- Lenzen, H., et al., 2012. Downregulation of the NHE3-binding PDZ-adaptor protein PDZK1 expression during cytokine-induced inflammation in interleukin-10-deficient mice. *PLoS One* 7, e40657.
- Loo, L., et al., 2017. Intestinal transplantation: a review. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 33, 203–211.
- Marguerat, S., Bahler, J., 2010. RNA-seq: from technology to biology. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 569–579.
- Markowitz, F., Spang, R., 2005. Molecular diagnosis. Classification, model selection and performance evaluation. *Methods Inf. Med.* 44, 438–443.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.J.* 17, 10–12.
- Molotkov, A., et al., 2002. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5337–5342.
- Oh, P.L., et al., 2012. Characterization of the ileal microbiota in rejecting and non-rejecting recipients of small bowel transplants. *Am. J. Transplant.* 12, 753–762.
- Peng, Y., 2006. A novel ensemble machine learning for robust microarray data classification. *Comput. Biol. Med.* 36, 553–573.
- Ranganathan, S., et al., 2015. The transcription factor, T-bet, primes intestine transplantation rejection and is associated with disrupted mucosal homeostasis. *Transplantation* 99, 890–894.
- Robin, X., et al., 2011. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinform.* 12, 77.
- Robinson, M.D., et al., 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.
- Roedder, S., et al., 2015. A three-gene assay for monitoring immune quiescence in kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 2042–2053.
- Ruiz, P., 2012. How can pathologists help to diagnose late complications in small bowel and multivisceral transplantation? *Curr. Opin. Organ Transplant.* 17, 273–279.
- Ruiz, P., et al., 2004. Histological criteria for the identification of acute cellular rejection in human small bowel allografts: results of the pathology workshop at the VIII International Small Bowel Transplant Symposium. *Transplant. Proc.* 36, 335–337.
- Ruiz, P., et al., 2010. International grading scheme for acute cellular rejection in small-bowel transplantation: single-center experience. *Transplant. Proc.* 42, 47–53.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Selvaggi, G., et al., 2007. Analysis of acute cellular rejection episodes in recipients of primary intestinal transplantation: a single center, 11-year experience. *Am. J. Transplant.* 7, 1249–1257.
- Slowicka, K., et al., 2016. Optineurin deficiency in mice is associated with increased sensitivity to *Salmonella* but does not affect proinflammatory NF-kappaB signaling. *Eur. J. Immunol.* 46, 971–980.
- Smith, A.M., et al., 2015. Disruption of macrophage pro-inflammatory cytokine release in Crohn's disease is associated with reduced optineurin expression in a subset of patients. *Immunology* 144, 45–55.
- Smith, J.M., et al., 2017. OPTN/SRTR 2015 annual data report: intestine. *Am. J. Transplant.* 17 (Suppl. 1), 252–285.
- Su, A.I., et al., 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6062–6067.
- Sudan, D., 2014. The current state of intestine transplantation: indications, techniques, outcomes and challenges. *Am. J. Transplant.* 14, 1976–1984.
- Tibshirani, R., et al., 2002. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6567–6572.
- Trapnell, C., et al., 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and cufflinks. *Nat. Protoc.* 7, 562–578.
- Ubesie, A.C., et al., 2013. Micronutrient deficiencies in pediatric and young adult intestinal transplant patients. *Pediatr. Transplant.* 17, 638–645.
- Venick, R.S., et al., 2006. Nutritional outcomes following pediatric intestinal transplantation. *Transplant. Proc.* 38, 1718–1719.
- Venick, R.S., et al., 2011. Long-term nutrition and predictors of growth and weight gain following pediatric intestinal transplantation. *Transplantation* 92, 1058–1062.
- Wang, X., 2014. Firth logistic regression for rare variant association tests. *Front. Genet.* 5, 187.
- Wang, A., Sarwal, M.M., 2015. Computational models for transplant biomarker discovery. *Front. Immunol.* 6, 458.
- Wang, Z., et al., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63.
- Weaver, B.P., et al., 2010. Zip4 (Slc39a4) expression is activated in hepatocellular carcinomas and functions to repress apoptosis, enhance cell cycle and increase migration. *PLoS One* 5, e13158.
- Wild, P., et al., 2011. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts *Salmonella* growth. *Science* 333, 228–233.
- Wu, T., et al., 2003. A schema for histologic grading of small intestine allograft acute rejection. *Transplantation* 75 (8), 1241.
- Wu, C., et al., 2009. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol.* 10, R130.
- Yeh, J., et al., 2015. Endoscopy following pediatric intestinal transplant. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 61, 636–640.
- Yeruva, S., et al., 2015. Evidence for a causal link between adaptor protein PDZK1 downregulation and Na(+)/H(+) exchanger NHE3 dysfunction in human and murine colitis. *Pflugers Arch.* 467, 1795–1807.
- Zhang, Y., et al., 2010. ZIP4 regulates pancreatic cancer cell growth by activating IL-6/STAT3 pathway through zinc finger transcription factor CREB. *Clin. Cancer Res.* 16, 1423–1430.

Table S1. NSC prediction of the discovery set samples based on the 5 genes selected

| | | Prediction | | |
|--------|------|------------|------|-------|
| | | STA | NSTA | error |
| Actual | STA | 9 | 2 | 0.18 |
| | NSTA | 0 | 7 | 0.00 |

Overall error rate= 0.11

Table S2. Logistic regression coefficients

| | Coefficient | SE | 95% CI |
|------------------|--------------------|-----------|----------------|
| Intercept | -0,0275 | 2,1853 | -4,13 - 4,04 |
| ADH1C | -1,2814 | 18,4630 | -34,53 - 32,49 |
| SLC39A4 | -12,1512 | 32,4217 | -84,52 - 41,34 |
| CYP4F2 | -1,0705 | 7,9344 | -18,29 - 14,52 |
| OPTN | 26,0519 | 19,0391 | -6,16 - 74,64 |
| PDZK1 | -23,2030 | 20,3181 | -82,17 - 8,28 |

SE: standard error / CI: confidence interval

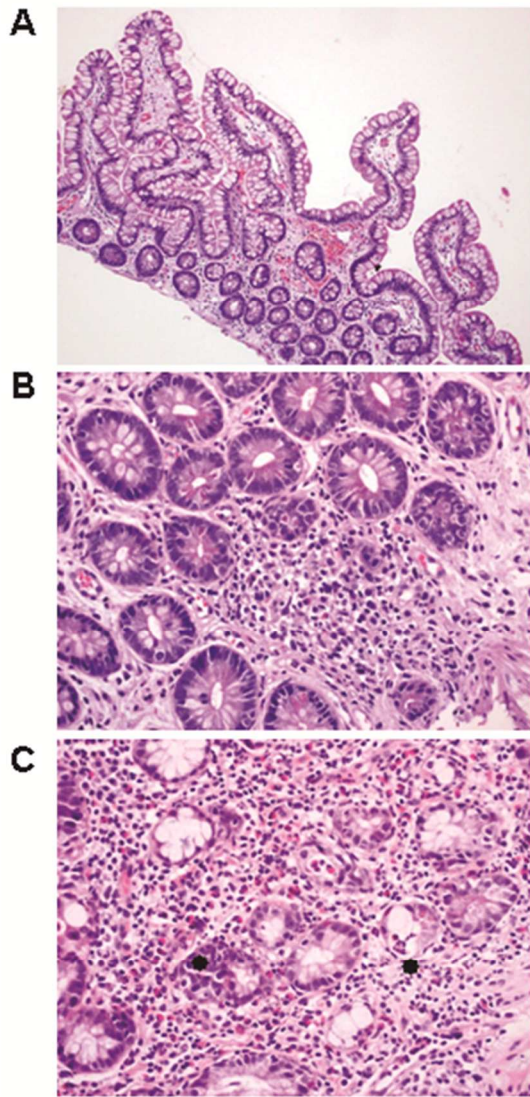


Figure S1. Histology of intestinal biopsies. (A) Minimal changes. Mucosal architecture is intact with no crypt injury (H-E, 10x). (B) Indeterminate for rejection. Minimal localized inflammatory infiltrate and crypt epithelial injury, with less than 6 apoptosis in 10 crypts (H-E, 20x). (C) Acute rejection grade 1. Mild inflammatory infiltrate with lymphocytes and eosinophils and increased apoptosis in crypts (> 6 apoptosis in 10 crypts) (H-E, 20x).

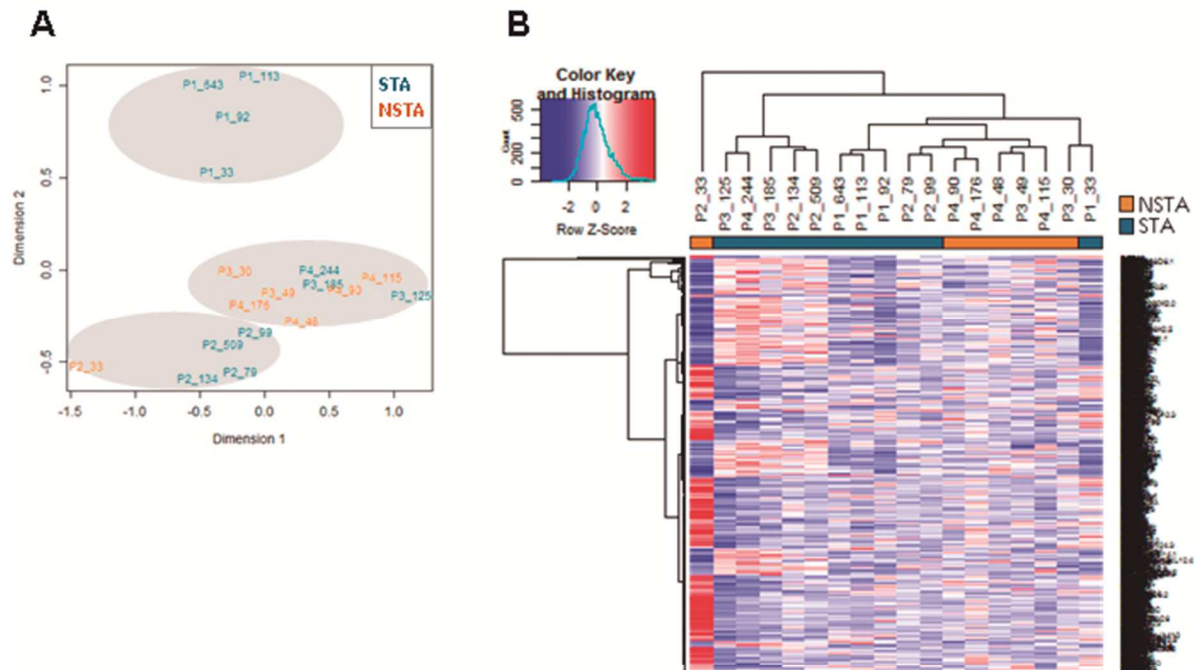


Figure S2. Differentially expressed genes in the discovery set. (A) Multidimensional Scaling plot generated with the normalized expression of the 13333 filtered genes suggested considering patient identity as a blocking factor. Dimension 2 roughly corresponds to patient number, showing a clear differentiation of P1 samples (this patient never suffered rejection and all the biopsies were STA). P2 samples were also clearly separated, while P3 and P4 biopsies were more similar. **(B)** Heatmap and hierarchical clustering. Dissimilarities are represented by the Manhattan distance and clusters are defined by the Ward method. Rows represent the 816 DEGs obtained, and columns represent biopsies. Relative expression values were calculated as standardized z-scores, obtained by the following formula: $z\text{-score} = (x - \text{mean}) / \text{standard deviation}$, where "x" is the normalized gene expression of each sample. Z-scores were scaled across rows. Red color indicates overexpression of the transcript, whereas blue corresponds to decreased levels.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El TxI resulta único dentro del TOS debido a sus características epidemiológicas, inmunológicas y fisiológicas (159). El hecho de que el TxI sea el trasplante minoritario de órgano sólido, representando menos del 0.5% del total de los TOS (figura 11), hace que la experiencia sea limitada a unos pocos centros en el mundo y los avances se produzcan de manera más lenta. Además, los conocimientos obtenidos en otros TOS no resultan siempre aplicables al TxI, ya que, a diferencia del resto de órganos, el intestino porta una gran cantidad de carga linfoide del donante. Esta elevada inmunogenicidad resulta en una mayor tasa de rechazo y de otras patologías inmunológicas (EICH, PTLD, autoinmunidad...), lo que supone que los receptores sean sometidos en consecuencia a dosis más elevadas y regímenes más potentes de inmunosupresión, incrementándose además el riesgo de otras complicaciones.

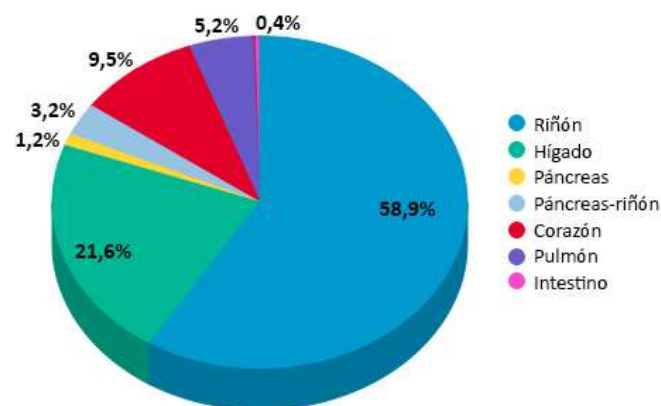


Figura 11. Trasplantes de órgano sólido realizados en Estados Unidos desde el 1 de enero de 1988 hasta el 30 de junio de 2018. Datos obtenidos de la UNOS (*United Network for Organ Sharing*; <https://unos.org/data/transplant-trends/>).

La monitorización del TxI se basa principalmente en el seguimiento endoscópico y análisis histológico de las biopsias del injerto. Sin embargo, este abordaje presenta varias limitaciones y no siempre resulta suficiente para un diagnóstico completo. Debido a la invasividad de la

técnica, muchos centros no realizan endoscopias de protocolo sino solo por indicación clínica (especialmente en el trasplante pediátrico), lo que se traduce en una menor detección de los rechazos subclínicos y leves y, en ocasiones, en un diagnóstico tardío. El hecho de que el rechazo en el TxI se produzca de manera parcheada en el injerto supone otra dificultad, ya que no siempre la lesión puede evidenciarse en el examen endoscópico. Tampoco las biopsias tomadas por endoscopia alcanzan la profundidad suficiente para identificar el rechazo crónico, que afecta a capas más internas. Por último, las propias técnicas histológicas presentan limitaciones diagnósticas, ya que los hallazgos de rechazo pueden ser confundidos con otras entidades (PTLD, infección, toxicidad por MMF...) y no existe un consenso sobre los criterios para distinguir el rechazo humoral del celular (45, 160, 161).

Respecto a los biomarcadores no invasivos que se han postulado en la bibliografía, los niveles de citrulina plasmática y la calprotectina fecal no han llegado a consolidarse en la práctica clínica debido a su baja especificidad para detectar el rechazo (123). Solo la determinación de los anticuerpos anti-HLA se ha implementado como herramienta de monitorización serológica de la respuesta aloinmune en el TxI. Sin embargo, aunque su estudio es cada vez más extendido, la experiencia al respecto es aún limitada y los trabajos descritos en la literatura presentan resultados controvertidos.

Con el fin de profundizar y aportar más experiencia en este campo, el primer capítulo de la Tesis aborda la caracterización de los DSA, los factores que contribuyen a su aparición y su significado en la evolución del injerto intestinal. Una de las aportaciones principales de este trabajo es que es el primero que realiza un análisis en profundidad de supervivencia a largo plazo en una cohorte exclusivamente pediátrica. Hasta la fecha, solo el grupo de Petit

presenta un estudio realizado en receptores pediátricos del Hospital Necker de París, aunque este es meramente descriptivo (133). El resto los trabajos existentes se han realizado en cohortes de adultos o mixtas, si bien es sabido que los resultados obtenidos en el campo del trasplante en adultos no pueden extrapolarse a la población pediátrica, ya que el estado inmunológico difiere entre ambas poblaciones. Este hecho, constituye además uno de los posibles factores responsables de la elevada disparidad de los resultados entre los estudios.

El papel de los DSA preformados en la evolución del injerto es uno de los puntos en los que no existe consenso. Mientras que Abu-Elmagd (34) y Cheng (37) describieron su efecto perjudicial incluso habiendo aplicado protocolos de desensibilización antes del trasplante, Kubal y colaboradores (36) no reportaron ningún impacto de los DSA preformados sobre la evolución clínica. En el presente trabajo tampoco se observa que los DSA promuevan el rechazo y empeoren la supervivencia del injerto, aunque el grupo de pacientes con DSA preformados es pequeño (5 pacientes), lo que limita el análisis estadístico. A diferencia también del estudio de Cheng (37), la presencia de trasplantes previos constituye en nuestra cohorte un potente factor de sensibilización. Esta disparidad en los resultados podría atribuirse al hecho de que el estudio de Cheng comprende una cohorte mixta de adultos y niños. En los adultos las causas de sensibilización son principalmente las transfusiones y los embarazos, siendo el retrasplante menos frecuente. Por ello, el análisis conjunto de ambas poblaciones podría estar enmascarando el impacto del retrasplante como factor de riesgo.

Otra de las contribuciones del presente estudio es el análisis del efecto de los anticuerpos con capacidad fijadora de complemento sobre el injerto. En trasplante renal, hepático, cardíaco y pulmonar son varios los trabajos que han demostrado el efecto deletéreo de estos

anticuerpos (162-165), sin embargo, en TxI las evidencias son escasas, encontrándose solo el artículo reciente de Rabant (que analiza la misma cohorte pediátrica del Hospital Necker de París) como única referencia (166). En su estudio se describe una peor supervivencia del injerto y del paciente en los receptores con DSA fijadores de complemento. Si bien en nuestro trabajo no se encontró asociación estadística entre la actividad fijadora de C1q y el rechazo del injerto (probablemente debido al bajo número de pacientes), sí que cabe resaltar que ninguno de los pacientes con DSAdn negativos en el ensayo de fijación sufrió rechazo, mientras que sí lo hicieron 4 de los 5 receptores con DSAdn fijadores de complemento. La frecuencia de estos anticuerpos en nuestro trabajo fue mayor que la descrita por Rabant (71.4% vs 41.6%), correlacionando además con intensidades de fluorescencia elevadas (MFI >10000). En su estudio, Rabant reportó una peor supervivencia del injerto y del paciente a 2 años postTx en aquellos receptores con DSA fijadores de complemento. Consistentemente con estos hallazgos, en nuestro trabajo se evidencia el efecto deletéreo de los DSAdn en la evolución del injerto, aumentando en más de 10 veces la probabilidad de rechazo y en más de 60 la de pérdida del injerto. Estos resultados concuerdan con los presentados por Cheng (37) pero difieren de los de Kubal, quien no observó efecto de los DSAdn sobre el rechazo y la supervivencia del injerto (36). Como complemento a ambos estudios, el nuestro es el primero que presenta un análisis multivariante que mantiene los DSAdn como factor independiente asociado a mayor pérdida del injerto, frente a otras variables como son la terapia de inducción y mantenimiento, la inclusión del hígado o diversas complicaciones postTx (PTLD, EICH, alteraciones hematológicas, etc.).

La presencia de los depósitos de C4d en los injertos intestinales sigue siendo de utilidad limitada para el diagnóstico del rechazo humoral. Aunque en el trabajo de Rabant parecen

asociarse en el tiempo a la aparición de los DSA (166), los resultados en la literatura son controvertidos (35, 167-169), encontrándose también en injertos sin DSA y con una histología normal. En este sentido, cabe pensar que, al margen de la actividad fijadora de complemento, el daño producido por los DSA en el TxI comprende otros mecanismos de activación inmunológica (27). Si bien aún queda mucho por entender en este aspecto, los resultados presentados en este trabajo refuerzan la importancia de la monitorización de los DSA en el seguimiento del TxI.

Con el fin de profundizar en los factores que se asocian a la generación de DSAdn, se analizaron también variables que se han postulado como protectoras o desencadenantes, prestando especial atención a la inclusión del hígado y a la compatibilidad HLA. Abu-Elmagd y colaboradores describieron por primera vez el papel del hígado en el aclaramiento de los DSA preformados mostrando además una tendencia protectora aunque sin significación estadística frente al desarrollo de DSAdn (34). Otros grupos analizaron posteriormente su posible influencia sin llegar a demostrarla (36, 37), siendo nuestro trabajo el primero en demostrar estadísticamente el efecto protector de la inclusión del hígado.

Respecto a la compatibilidad en los antígenos HLA, los resultados varían en el número de incompatibilidades, los loci estudiados o los más relevantes. Gerlach y colaboradores mostraron asociación de los DSAdn y el número total de incompatibilidades tanto a nivel serológico como de epítipo en A, B, DR y DQ (35). También Kubal describió como factor de riesgo la presencia de más de 5 incompatibilidades en A, B y DR (36). Por el contrario, Abu-Elmagd (34) y Cheng no encontraron ninguna correlación entre la generación de DSAdn y el número total de incompatibilidades, aunque este último describió la discordancia en 2

antígenos DQ como un factor de riesgo significativo (37). En el presente trabajo, hemos analizado la compatibilidad serológica clásica y la compatibilidad a nivel de epítipo (empleando la novedosa herramienta de predicción PIRCHE por primera vez en TxI y la ya conocida HLAMatchmaker) para los loci A, B, DR y DQ, sin hallar ningún tipo de correlación entre incompatibilidades y aparición de DSAdn.

Tanto en el caso del hígado como en el de la compatibilidad HLA, nuestros resultados se contraponen con la mayoría de lo descrito con anterioridad. Estas discrepancias son probablemente atribuibles al hecho de que el nuestro es el primer trabajo que analiza estos factores en una cohorte exclusivamente pediátrica. La inclusión del hígado en los receptores adultos es mucho menos frecuente que en los niños ($\approx 35\%$ vs $\approx 60\%$; (170)), siendo por tanto otros los factores que influyen en mayor grado en la generación de DSAdn. De hecho, el número de incompatibilidades HLA es una de las variables que en los estudios de cohortes de adultos o mixtas ha aparecido como principalmente relacionada con la aparición de anticuerpos.

Según todo lo descrito anteriormente, el presente trabajo pone de relevancia la importancia de la monitorización de los DSA para el seguimiento del paciente trasplantado, sugiriendo también algunas claves sobre cómo abordar el manejo del paciente ante la aparición de estos anticuerpos. La desensibilización peri-Tx en receptores inmunizados parece tener un efecto beneficioso evitando el rechazo dentro del primer año. Esto es de especial importancia, ya que en la mayoría de los casos no puede seleccionarse el donante según su tipaje HLA, trasplantándose en muchas ocasiones en presencia de DSA. Respecto a la desensibilización posTx existe algo de controversia, habiendo grupos que apoyan los protocolos de eliminación

de DSA en cuanto estos aparecen incluso en ausencia clínica de daño (35), mientras que otros muestran reticencias debido a la agresividad que suponen estos tratamientos. En nuestro trabajo no se ha podido abordar este aspecto debido al bajo número de pacientes con DSA y al carácter retrospectivo del estudio, pero resulta un tema importante en el que seguir profundizando. También la inclusión del hígado, especialmente en los casos de retrasplante en los que ha habido un TIA previo, supone un punto de controversia. A pesar de la existencia de hallazgos que demuestran una mejor supervivencia del paciente y del injerto en los trasplantes con hígado (171), las consideraciones éticas de poner un hígado a un paciente que de por sí no lo necesita están todavía en discusión. Las evidencias de la protección inmunológica que confiere (sea en trasplantes o primeros trasplantes) presentadas en este trabajo apoyan sin embargo su inclusión siempre que sea posible.

La segunda parte de la tesis aborda la respuesta celular local en los injertos intestinales. El estudio de los IEL constituye una herramienta para el diagnóstico y seguimiento de diversas patologías, como la enfermedad celíaca, la alergia alimentaria, la enfermedad inflamatoria intestinal o la enteropatía asociada a linfoma (tabla 9). Sin embargo, en el ámbito del TxI, la evolución, composición y función de las poblaciones de IEL resulta aún bastante desconocida. Anteriormente a la publicación correspondiente al Capítulo 2, solo Liu y Talmon describieron en 2011 una disminución del número total de IEL en los injertos de receptores pediátricos (112). El nuestro ha sido por tanto el primer trabajo en caracterizar de una manera exhaustiva la composición de las poblaciones de IEL en los injertos intestinales de receptores adultos a lo largo de más de 2 años postTx. El primero de los hallazgos, coincidente con lo reportado por Liu, es la reducción del número de IEL durante el primer año postTx, lo que sugiere que este hecho es independiente de la edad del receptor y la técnica utilizada para medir infiltración

(citometría de flujo o tinción de hematoxilina-eosina). La población de IEL CD3⁺ CD8⁺, que es mayoritaria en los intestinos nativos, es la que resulta más visiblemente mermada incluso cuando el porcentaje de IEL totales ya se encuentra normalizado. En compensación, son los IEL CD3⁻ los que toman el protagonismo en el epitelio intestinal de los injertos, siendo mayoritarios desde el tercer mes hasta los 2 años postTx y de manera más acentuada en los receptores que recibieron corticosteroides en la terapia de mantenimiento.

Esta población de IEL CD3⁻ fue inicialmente conocida como *NK-like* por su similitud en algunos rasgos fenotípicos y funcionales con los linfocitos NK de sangre periférica (72, 73). Sin embargo, paralelamente a la realización de nuestro estudio, comenzaron a describirse y caracterizarse los diferentes tipos de ILC, observándose que al menos una parte de estas células correspondía a las iILC1 con un fenotipo determinado por la expresión de CD103⁺ NKp44⁺ CD56⁺ y CD127⁻, la producción de IFN γ y la independencia de la IL15 para su desarrollo y diferenciación (76, 77). En base a estos primeros marcadores que definieron a las ILC, procedimos a caracterizar los IEL CD3⁻ de los injertos, observando un incremento de iILC1 (CD103⁺ NKp44⁺ CD56⁺ CD127⁻ GRZB⁻ IFN γ ⁺, no citotóxicas) y de ILC3 (IL23R⁺ CCR6⁺ NKp44⁺ IL22⁺) respecto a los intestinos nativos. Además, hallamos un grupo de células secretoras a la vez de IFN γ e IL22, único en los injertos y ausente en los controles. La plasticidad entre ILC1 e ILC3 está bien descrita en la literatura (93, 94) y viene determinada por las señales de citoquinas y otros estímulos del microambiente. En estos estadios transicionales puede observarse la coexpresión de moléculas y citoquinas de ambas poblaciones, lo que explica no solo la producción simultánea de IFN γ e IL22 sino también la disminución de los marcadores ROR γ t o CD127, característicos de ILC3 pero no de las iILC1.

La administración de tacrolimus ha demostrado reducir el número de IEL en modelos de ratón (172), y explicaría de forma análoga la disminución de IEL CD3⁺ observada en nuestros pacientes. Sin embargo, este fármaco parece no tener un efecto deletéreo sobre las ILC. La vía de la calcineurina se desencadena principalmente tras la activación del TCR/BCR, por lo que al carecer las ILC de este tipo de receptores es probable, desde el punto de vista teórico, que sean más resistentes al efecto de la terapia con tacrolimus. Ante la disminución de los IEL CD3⁺, las ILC se convierten por tanto en los reguladores principales de la respuesta inmune en el injerto intestinal, al menos a nivel epitelial. Cuál es su papel concreto y qué relevancia pueden tener en la evolución del trasplante es algo que aún queda por dilucidar. Mientras que las ILC1 se han asociado a situaciones de inflamación, las ILC3 se relacionan más con el mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal. El que ambas poblaciones se encuentren más expresadas en los injertos, hallándose además fenotipos intermedios, representa, a nuestro juicio, el equilibrio entre los ambientes inflamatorio y tolerogénico característicos del trasplante. Posteriormente a nuestro trabajo, Weiner y colaboradores publicaron un estudio que analizó el quimerismo de ILC en la mucosa de 6 receptores de TxI. En él muestran la permanencia de las ILC del donante incluso a más de 8 años postTx, siendo las ILC3 las más persistentes (173). En el trasplante de precursores hematopoyéticos existen también algunos trabajos al respecto, aunque son escasos. Munneke y colaboradores reportaron tras el trasplante un aumento de ILC circulantes con marcadores de migración tisulares y fenotipo activado que se relacionaron con una menor incidencia de EICH (174). Puesto que la EICH es un fenómeno relativamente frecuente en el TxI, sería de gran interés estudiar si existe alguna relación con las ILC en este aspecto. Por otro lado, el grupo de Eric Vivier realizó estudio de las ILC en 28 pacientes con inmunodeficiencia combinada grave debida a distintos defectos genéticos. Mientras que en los pacientes con defectos en JAK3 o IL2RG

(implicados en la ruta de señalización de la IL7 y la IL15) no existían ILC circulantes y estas apenas se reconstituyeron tras el trasplante, los pacientes con deficiencias en los genes RAG sí que presentaron ILC en sangre periférica y la repoblación fue más efectiva tras el trasplante. En ambos casos, las ILC fueron detectables tras un régimen mieloablativo, lo que indica que, al contrario de lo que se creía, pueden ser reconstituidas posnatalmente (175).

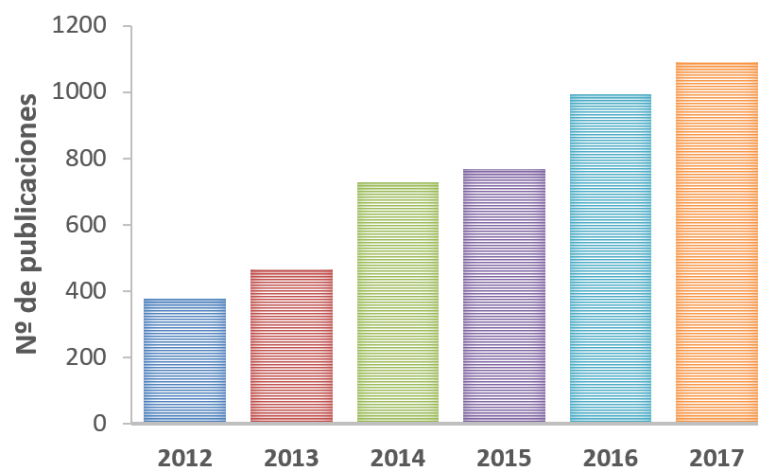


Figura 12. Número de publicaciones relacionadas con células linfoides innatas en los últimos 5 años. Datos obtenidos de la Web of Science, introduciendo como término de búsqueda “innate lymphoid cells” en la categoría “tema”.

Es un hecho que las ILC se postulan como grandes reguladores de enfermedades inflamatorias (reumatológicas, intestinales...) (86, 176), alérgicas (177) y oncológicas (178, 179). A día de hoy, el trabajo de Weiner y el nuestro constituyen las dos únicas referencias en la literatura sobre ILC y TOS, aunque no cabe duda de que estos hallazgos suponen un punto de partida para el estudio en otros órganos como el pulmón o el hígado, que cuentan también con una población significativa de ILC. Puesto que nuestro estudio comenzó de manera paralela a la descripción de las ILC y las publicaciones al respecto han ido aumentando considerablemente desde entonces (figura12), resulta necesaria una caracterización actualizada tanto en epitelio como en la LP de los injertos para comprender mejor su papel en el TxI. Sin embargo, la baja

disponibilidad de tejido y la ausencia de biopsias de protocolo en muchos centros, suponen una gran dificultad metodológica para ello.

El último capítulo de la Tesis se centra en uno de los campos que se encuentra en expansión en el ámbito del trasplante: la búsqueda de biomarcadores a través de las plataformas “ómicas”. Desde 2005 se han triplicado las publicaciones que utilizan estas tecnologías aplicadas al trasplante (figura 13) (117), y es que son muchos los aspectos que demandan de nuevos marcadores. Un diagnóstico más específico del rechazo, la predicción de eventos infecciosos, una mejor selección de donantes, la anticipación de la respuesta a los fármacos inmunosupresores... el área de investigación resulta inmensa.

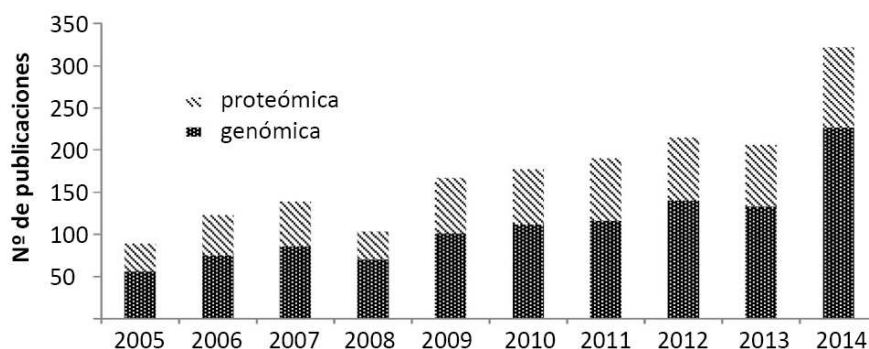


Figura 13. Publicaciones de Pubmed en el período 2005-2014 resultantes de la búsqueda “trasplante y proteómica” o “trasplante y genómica”. Adaptada de *Front Immunol.* 2015 Sep 8;6:458. (117)

A través de tecnologías simples como la qPCR, pasando por los chips de sondas y encontrando su apogeo en los *microarrays*, son muchos los estudios en TOS que han tratado de establecer firmas de expresión génica que den respuesta a parte de los interrogantes mencionados (180, 181). Algunos de estos trabajos han conseguido trasladarse a la práctica clínica gracias a su estandarización en kits comerciales, como son AlloMap para el diagnóstico del rechazo en

trasplante cardiaco (182-184) y kSORT para la identificación de receptores en alto riesgo de rechazo en trasplante renal (185).

A diferencia de todos estos estudios, nuestro trabajo no compara fenotipos clínicamente distantes y bien definidos (rechazo frente a no rechazo, receptores tolerantes frente a no tolerantes), sino que analiza mediante la tecnología de RNA-Seq (empleada por primera vez en TOS) un grupo de muestras que *a priori* es histológicamente homogéneo e indistinguible. La monitorización del TxI mediante endoscopia y biopsia de rutina resulta en la detección frecuente y a veces temprana de los episodios de rechazo, siendo habitual la alternancia de biopsias con diagnóstico de rechazo leve o indeterminado con biopsias aparentemente normales (categorizadas como “cambios mínimos”). Todo esto sumado al hecho de que la lesión del rechazo en el injerto intestinal es parcheada, supone un reto para el manejo de los pacientes. La firma de 5 genes hallada en este trabajo es capaz de identificar con precisión biopsias de cambios mínimos correspondientes a injertos con mayor probabilidad de sufrir rechazo (no estables) y diferenciarlas de las biopsias con el mismo diagnóstico histológico pero correspondientes a injertos estables (alejados más de 6 meses de futuros episodios de rechazo).

En muchos de los estudios de expresión génica en TOS, la selección última de genes, e incluso el diseño de sondas del panel, se realiza basándose en criterios de significado biológico previamente conocidos (181), lo que de alguna manera sesga los resultados que se obtienen y limita la posibilidad de hallar nuevos mecanismos moleculares subyacentes. En el presente trabajo, sin embargo, además de secuenciar de forma masiva todo el transcriptoma de las muestras, la selección de transcritos diferencialmente expresados se ha realizado de una

forma no sesgada basada exclusivamente en métodos bioestadísticos validados (117), obteniendo así información sobre nuevas vías moleculares que participan en el daño temprano del injerto antes de que éste se traslade a cambios histológicamente visibles. Cuatro de los 5 genes incluidos en la firma molecular del panel propuesto (ADH1C, CYP4F2, PDZK1 Y SLC39A4) no forman parte en principio de las típicas rutas inmunológicas implicadas en el rechazo del injerto ni se encuentran enriquecidos en células del SI, sin embargo, sí juegan importantes funciones en la fisiología entérica. Esto es biológicamente consistente con el hecho de que el infiltrado inflamatorio en las biopsias no es significativo al tratarse de muestras con “cambios mínimos”.

ADH1C (también conocido como ADH3 o alcohol deshidrogenasa 3), media la síntesis del ácido retinoico participando en el metabolismo del retinol (186). Como ya se ha mencionado en la introducción, el ácido retinoico constituye uno de los principales reguladores de la migración de las células del sistema inmune al intestino. Las células dendríticas de los MLN sintetizan y presentan ácido retinoico, induciendo así la expresión en ILC1, ILC3 y LT de las moléculas de migración intestinal CCR9 e integrina $\alpha 4\beta 7$ (65). De este modo, la mayor expresión de ADH1C en las biopsias NSTA podría ser reflejo de un incremento de la migración de linfocitos del receptor a la mucosa como paso inicial a una posterior respuesta efectora de rechazo. La actuación sobre la vía del ácido retinoico y el tráfico linfocitario podría suponer por tanto una nueva vía para el abordaje del tratamiento o la prevención del rechazo. De hecho, el bloqueo de $\alpha 4\beta 7$ con vedolizumab (un anticuerpo monoclonal humanizado frente a esta integrina aprobado para el tratamiento de colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) (187) se ha postulado como un posible tratamiento para el rechazo en TxI. Por otro lado, el

ácido retinoico controla también la transición de ILC1 a ILC3 (188), lo que puede dar más pistas sobre el papel de las ILC en la estabilidad del injerto.

El segundo de los genes seleccionados es CYP4F2, perteneciente a la familia de los citocromos y encargado de reducir la actividad de diversos metabolitos del ácido araquidónico como son el leucotrieno B4 y las prostaglandinas (189). Entre sus funciones principales, el leucotrieno B4 se encarga del reclutamiento leucocitario (especialmente neutrófilos y LT) (190) y estimula la síntesis de α -defensinas (potentes péptidos antimicrobianos) (191). La importancia de CYP4F2 como regulador negativo de la respuesta inflamatoria queda reflejada por estudios que reportan una pérdida de función debida a variantes nucleotídicas sencillas en pacientes con enfermedad de Crohn (192) y enfermedad celiaca (193). Además, el CYP4F2 puede reprimirse por el ácido retinoico a través del receptor nuclear RAR α (194), lo que concuerda con lo hallado para el gen ADH1C. Con todas estas evidencias, no resulta por tanto extraño que encontremos este gen menos expresado en las biopsias NSTA. Curiosamente, Girlanda y colaboradores describieron en su estudio del análisis metabolómico del fluido de la ileostomía en receptores de TxI, un aumento de otro leucotrieno (el E4) en los receptores que rechazaron frente a los que no, siendo además el metabolito que mayor diferencia de expresión presentó (153).

PDZK1 codifica para el factor 3 regulador del intercambiador sodio-hidrógeno, y su expresión se limita a las células epiteliales. Es un componente fundamental de los bordes en cepillo de los túbulos renales proximales (195), y recientemente se ha descrito una disminución acusada de su expresión en los enterocitos de diversos modelos murinos de colitis así como en

pacientes con colitis ulcerosa (196, 197). Aunque su papel exacto es aún desconocido, parece que la menor expresión de PDZK1 es consecuencia y no causa del ambiente inflamatorio. Por ello, la reducción de su expresión en las biopsias NSTA puede considerarse un marcador de inflamación temprana en el injerto intestinal.

Otro gen implicado en el transporte de iones es SLC39A4 (también conocido como ZIP4), un transportador de zinc que se expresa abundantemente en la membrana apical de los enterocitos. Las mutaciones en este gen alteran la absorción de zinc causando acrodermatitis enteropática, una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por presentar dermatitis acral, alopecia, diarrea y problemas de crecimiento (198). Este cuadro, que también puede presentarse de manera adquirida por deficiencias de zinc, pone de manifiesto el papel fundamental del oligoelemento en la fisiología intestinal. Curiosamente, los receptores de Txl tanto pediátricos como adultos presentan con frecuencia niveles bajos de zinc en el postTx (199-201). Puesto que la expresión de SLC39A4 fue menor en las biopsias NSTA, una monitorización de los niveles del zinc podría ser de gran utilidad para detectar un estado de disregulación del injerto. Por otro lado, se ha visto que en carcinomas pancreáticos y hepatocelulares existe una sobre-expresión de SLC39A4 que aumenta el ciclo celular y reprime la apoptosis (202, 203), mientras que su falta total en ratones *knocked-out* para SLC39A4 produce una disfunción de las células de Paneth que lleva al daño de las criptas. Estos hechos coinciden con que tanto la apoptosis como la destrucción de las criptas son marcadores principales de la histología del rechazo del injerto intestinal (23, 204).

De la firma de 5 genes, solo OPTN tiene una expresión enriquecida (en relación a otros tejidos) en células linfoides. La optineurina es una proteína adaptadora multifuncional implicada

íntimamente en diversas rutas de tráfico de vesículas, división celular, autofagia y respuesta inflamatoria, antiviral y antibacteriana (205). Es un regulador negativo de la señalización mediada por NFκB en respuesta a TNFα e IL1β (206, 207) y juega un papel fundamental en la producción de interferones de tipo I (208). A nivel intestinal resulta de gran importancia, ya que participa en el proceso de autofagia necesario para eliminación de patógenos intracelulares (por ejemplo, *Salmonella*) (209). De hecho, en los ratones deficientes de OPTN se observa una mayor susceptibilidad a infecciones por *Salmonella* (210), peritonitis causadas por *Citrobacter* y colitis por *E. coli* (211). En un grupo de pacientes con enfermedad de Crohn, la optineurina resultó ser el transcrito que más se reprimía en macrófagos, los cuales mostraron además una producción deficiente de TNFα e IFNγ tras la estimulación con *E. coli* (212). Con estos datos no extrañan los resultados presentados por Oh y colaboradores en su estudio del microbioma en los efluentes de ileostomía, en los que observó un incremento de la familia *Enterobacteriaceae* durante el rechazo (156). Esto concuerda además con lo observado en las biopsias NSTA, que presentan menor expresión de OPTN y por tanto una posible mayor proliferación de estas bacterias.

Aunque *a priori* los genes integrantes de esta firma molecular no parecían pertenecer a las típicas rutas de activación inmunológica, han revelado formar parte de otros mecanismos que son indispensables para el control de la inflamación intestinal como son el tráfico linfocitario, el control de iones y oligoelementos, la integridad epitelial y el balance del microbioma intestinal. Además, al realizar la búsqueda de estos 5 genes en todos los transcriptomas depositados en GEO relacionados con el trasplante, se encontró un estudio de trasplante renal en el que los 5 genes se hallaron diferencialmente más expresados en biopsias de injertos funcionantes que en biopsias de rechazo agudo o de injertos disfuncionales (213), lo

que coincide con los cambios observados en la misma dirección para CYP4F2, PDZK1, SLC39A4 y OPTN.

La firma molecular hallada junto con el modelo matemático, pueden aplicarse de manera temprana tras el trasplante, clasificando correctamente las biopsias a menos de 1 mes postTx hasta más allá de 8 años. Esto convierte al conjunto de 5 genes en un marcador pronóstico de rechazo del injerto intestinal de gran utilidad, que puede ayudar en decisiones clínicas como aumentar o disminuir el número de biopsias de seguimiento (que siempre supone un procedimiento invasivo no deseado), o regular la dosis de inmunosupresión para prevenir el rechazo o en las pautas descendentes tras el mismo. Aunque la firma fue obtenida en biopsias con “cambios mínimos”, también es capaz de identificar las biopsias con diagnóstico de rechazo o de indeterminado para rechazo. Los hallazgos histológicos del rechazo intestinal (23) no son específicos del mismo y por ejemplo altas tasas de apoptosis pueden encontrarse también como consecuencia de la administración de micofenolato de mofetil (161) o en las infecciones por adenovirus (160). En este sentido resultaría de gran utilidad testar la firma molecular en estos grupos de biopsias, ya que la identificación de los rechazos falsamente positivos podría evitar la sobre-inmunosupresión derivada de terapias agresivas y el riesgo de infecciones.

Este trabajo presenta una limitación metodológica que debe ser mencionada: la disparidad entre el tamaño muestras y la multidimensionalidad de los datos analizados. No obstante, si bien es cierto que los clasificadores se han obtenido en solo 4 pacientes, estos se han conseguido validar en 8 pacientes distintos por diversos métodos. Además, en pequeñas cohortes, ligeras diferencias inter-individuales tienen un peso mayor, por lo que haber

conseguido estandarizar y validar los hallazgos tiene un valor añadido. Para conseguir trasladar estos resultados a la práctica clínica y comprobar realmente su utilidad sería deseable realizar un estudio multicéntrico prospectivo con un mayor número de pacientes, que incluyera también receptores pediátricos y otros grupos de biopsias.

Al igual que sucede en el TxI, los criterios histológicos no siempre proporcionan un diagnóstico suficiente en otros TOS, necesitándose nuevas herramientas que discriminen con mayor precisión entre los distintos tipos de rechazo y otras disfuncionalidades del injerto (recurrencia de la enfermedad, infecciones, etc.). El estudio los perfiles de expresión molecular en biopsias se ha convertido por tanto en uno de los puntos principales de investigación en TOS, consiguiendo su implementación en la industria y la práctica clínica. A día de hoy, la herramienta de diagnóstico Molecular Microscope Diagnostic System® (MMDx), desarrollada por el grupo de Philip Halloran en la Universidad de Alberta (Edmonton, Canadá), ofrece un diagnóstico más preciso del tipo de rechazo o la lesión del injerto mediante el estudio por *microarrays* de biopsias de trasplante renal y cardiaco (214-217).

En resumen, esta Tesis ha tratado de profundizar en los mecanismos humorales, celulares y moleculares subyacentes al TxI, aportando más evidencias sobre el papel de los DSA en la evolución del injerto y las causas que influyen en su desarrollo, describiendo por primera vez la población de ILC en el epitelio intestinal como protagonistas durante los dos primeros años postTx, y desarrollando una firma molecular de 5 genes que no solo permite anticipar el rechazo sino que además arroja luz sobre nuevas vías de daño del injerto.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Según los objetivos generales establecidos, las conclusiones de la presente Tesis son:

1. En receptores pediátricos, Los DSA preformados no constituyen un factor de riesgo ni para el rechazo ni para la supervivencia del injerto a 3 años postTx, siendo la existencia de trasplantes previos el principal factor de sensibilización.
2. Los DSAdn confieren un mayor riesgo de rechazo y peor supervivencia del injerto a 5 años postTx. Son en su mayoría poliespecíficos, dirigidos frente a HLA de clase II y suelen presentar una intensidad media de fluorescencia elevada y capacidad fijadora de complemento. La inclusión del hígado en el injerto resulta un factor de protección para el desarrollo de estos anticuerpos, sin embargo, la incompatibilidad HLA tanto a nivel serológico como de epítipo no supone un factor de riesgo en los receptores pediátricos.
3. Las poblaciones de IEL en las biopsias de íleon de los injertos intestinales varían a lo largo del tiempo postTx, difiriendo además de los intestinos nativos en los siguientes aspectos:
 - Disminución del % total de IEL durante el primer año postTx.
 - Disminución de LT totales y aumento de la población de linfocitos CD3⁻ desde el tercer mes a más de dos años postTx.
 - Disminución mantenida a más de dos años postTx de LT CD8⁺.
 - Aumento de LT CD4⁺ desde el tercer mes a los dos años postTx.

Estos cambios en el patrón de IEL no difieren entre los distintos diagnósticos histopatológicos (cambios mínimos, inflamación activa, mucosa reparativa o rechazo).

4. La población de IEL CD3⁻, que resulta mayoritaria desde el tercer mes postTx y cuyo aumento se ve potenciado por la administración de corticosteroides, presenta unos rasgos fenotípicos y funcionales característicos de las células NK y las ielLC1 (CD56⁺, NKp44⁺, CCR6⁺, CD127⁻, capacidad citotóxica y secreción de IFN γ) y de las ILC3 (CD56⁺,

NKp44⁺, CCR6⁺, IL23R⁺, ROR γ t y producción de IL22), mostrando también características de una población intermedia ILC1-ILC3 (síntesis simultánea de IFN γ e IL22) no observada en intestinos nativos.

5. Mediante la tecnología de RNA-Seq se puede distinguir molecularmente biopsias de injertos con un mismo diagnóstico histológico de “cambios mínimos”, que sin embargo presentan distinto grado de estabilidad según su proximidad a eventos de rechazo, observándose 816 DEGs entre biopsias estables y biopsias no estables con riesgo de rechazo.
6. Los genes ADH1C, SLC39A4, CYP4F2, OPTN y PDZK1, seleccionados mediante herramientas bioinformáticas del total de los 816 DEGs, permiten la clasificación de estos dos tipos de biopsias e identifican también biopsias con diagnóstico histológico de indeterminado para rechazo y rechazo agudo. La expresión de estos 5 genes obtenida mediante qPCR permite además construir un modelo matemático de predicción que valida los resultados obtenidos y que resulta aplicable a la práctica clínica, pudiendo convertirse así en una herramienta de uso para la monitorización del injerto intestinal.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Deltz E, Schroeder P, Gebhardt H, Gundlach M, Engemann R, Timmermann W. [First successful clinical small intestine transplantation. Tactics and surgical technic]. *Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen.* 1989;60(4):235-9.
2. Grant D, Abu-Elmagd K, Mazariegos G, Vianna R, Langnas A, Mangus R, et al. Intestinal transplant registry report: global activity and trends. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2015;15(1):210-9.
3. Mazariegos G. ITR Report. XIV International Small Bowel Symposium; Buenos Aires2015.
4. Bielawska B, Allard JP. Parenteral Nutrition and Intestinal Failure. *Nutrients.* 2017;9(5).
5. Buchman AL, Scolapio J, Fryer J. AGA technical review on short bowel syndrome and intestinal transplantation. *Gastroenterology.* 2003;124(4):1111-34.
6. O'Keefe SJ, Buchman AL, Fishbein TM, Jeejeebhoy KN, Jeppesen PB, Shaffer J. Short bowel syndrome and intestinal failure: consensus definitions and overview. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association.* 2006;4(1):6-10.
7. Kubal CA, Mangus RS, Tector AJ. Intestine and multivisceral transplantation: current status and future directions. *Current gastroenterology reports.* 2015;17(1):427.
8. Martinez Rivera A, Wales PW. Intestinal transplantation in children: current status. *Pediatric surgery international.* 2016;32(6):529-40.
9. Pironi L, Arends J, Bozzetti F, Cuerda C, Gillanders L, Jeppesen PB, et al. ESPEN guidelines on chronic intestinal failure in adults. *Clin Nutr.* 2016;35(2):247-307.

10. Bharadwaj S, Tandon P, Gohel TD, Brown J, Steiger E, Kirby DF, et al. Current status of intestinal and multivisceral transplantation. *Gastroenterology report*. 2017.
11. Kaufman SS, Atkinson JB, Bianchi A, Goulet OJ, Grant D, Langnas AN, et al. Indications for pediatric intestinal transplantation: a position paper of the American Society of Transplantation. *Pediatric transplantation*. 2001;5(2):80-7.
12. Sudan D. The current state of intestine transplantation: indications, techniques, outcomes and challenges. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2014;14(9):1976-84.
13. Colledan M, Zanfi C, Pinna AD. Technical aspects of intestinal transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2013;18(3):291-7.
14. Loo L, Vrakas G, Reddy S, Allan P. Intestinal transplantation: a review. *Current opinion in gastroenterology*. 2017;33(3):203-11.
15. Smith JM, Skeans MA, Horslen SP, Edwards EB, Harper AM, Snyder JJ, et al. OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report: Intestine. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2017;17 Suppl 1:252-85.
16. Kato T, Tzakis AG, Selvaggi G, Gaynor JJ, Takahashi H, Mathew J, et al. Transplantation of the spleen: effect of splenic allograft in human multivisceral transplantation. *Annals of surgery*. 2007;246(3):436-44; discussion 45-6.
17. Wu G, Selvaggi G, Nishida S, Moon J, Island E, Ruiz P, et al. Graft-versus-host disease after intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation*. 2011;91(2):219-24.

18. Hernandez F, Andres AM, Encinas JL, Dominguez E, Gamez M, Murcia FJ, et al. Preservation of the native spleen in multivisceral transplantation. *Pediatric transplantation*. 2013;17(6):556-60.
19. Garg M, Jones RM, Vaughan RB, Testro AG. Intestinal transplantation: current status and future directions. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011;26(8):1221-8.
20. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Major Histocompatibility Complex Molecules and Antigen Presentation to T Lymphocytes. In: Elsevier, editor. *Cellular and Molecular Immunology*. 8th ed2015.
21. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *The New England journal of medicine*. 1998;338(25):1813-21.
22. Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. *Frontiers in immunology*. 2016;7:582.
23. Ruiz P, Bagni A, Brown R, Cortina G, Harpaz N, Magid MS, et al. Histological criteria for the identification of acute cellular rejection in human small bowel allografts: results of the pathology workshop at the VIII International Small Bowel Transplant Symposium. *Transplantation proceedings*. 2004;36(2):335-7.
24. Swanson BJ, Talmon GA, Wisecarver JW, Grant WJ, Radio SJ. Histologic analysis of chronic rejection in small bowel transplantation: mucosal and vascular alterations. *Transplantation*. 2013;95(2):378-82.
25. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2003;3(6):665-73.

26. Montgomery RA, Cozzi E, West LJ, Warren DS. Humoral immunity and antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Seminars in immunology*. 2011;23(4):224-34.
27. Valenzuela NM, Hickey MJ, Reed EF. Antibody Subclass Repertoire and Graft Outcome Following Solid Organ Transplantation. *Frontiers in immunology*. 2016;7:433.
28. Smith RN, Colvin RB. Chronic alloantibody mediated rejection. *Seminars in immunology*. 2012;24(2):115-21.
29. Ruiz P, Carreno M, Weppeler D, Gomez C, Island E, Selvaggi G, et al. Immediate antibody-mediated (hyperacute) rejection in small-bowel transplantation and relationship to cross-match status and donor-specific C4d-binding antibodies: case report. *Transplantation proceedings*. 2010;42(1):95-9.
30. Wu T, Abu-Elmagd K, Bond G, Demetris AJ. A clinicopathologic study of isolated intestinal allografts with preformed IgG lymphocytotoxic antibodies. *Human pathology*. 2004;35(11):1332-9.
31. Ruiz P, Garcia M, Pappas P, Berney T, Esquenazi V, Kato T, et al. Mucosal vascular alterations in isolated small-bowel allografts: relationship to humoral sensitization. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2003;3(1):43-9.
32. Wu GS. Updates on antibody-mediated rejection in intestinal transplantation. *World journal of transplantation*. 2016;6(3):564-72.
33. Tsai HL, Island ER, Chang JW, Gonzalez-Pinto I, Tryphonopoulos P, Nishida S, et al. Association between donor-specific antibodies and acute rejection and resolution in small bowel and multivisceral transplantation. *Transplantation*. 2011;92(6):709-15.

34. Abu-Elmagd KM, Wu G, Costa G, Lunz J, Martin L, Koritsky DA, et al. Preformed and de novo donor specific antibodies in visceral transplantation: long-term outcome with special reference to the liver. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12(11):3047-60.
35. Gerlach UA, Lachmann N, Sawitzki B, Arsenic R, Neuhaus P, Schoenemann C, et al. Clinical relevance of the de novo production of anti-HLA antibodies following intestinal and multivisceral transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2014;27(3):280-9.
36. Kubal C, Mangus R, Saxena R, Lobashevsky A, Higgins N, Fridell J, et al. Prospective Monitoring of Donor-specific Anti-HLA Antibodies After Intestine/Multivisceral Transplantation: Significance of De Novo Antibodies. *Transplantation*. 2015;99(8):e49-56.
37. Cheng EY, Everly MJ, Kaneku H, Banuelos N, Wozniak LJ, Venick RS, et al. Prevalence and Clinical Impact of Donor-Specific Alloantibody Among Intestinal Transplant Recipients. *Transplantation*. 2017;101(4):873-82.
38. Mazariegos GV, Abu-Elmagd K, Jaffe R, Bond G, Sindhi R, Martin L, et al. Graft versus host disease in intestinal transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2004;4(9):1459-65.
39. Abu-Elmagd KM, Mazariegos G, Costa G, Soltys K, Bond G, Sindhi R, et al. Lymphoproliferative disorders and de novo malignancies in intestinal and multivisceral recipients: improved outcomes with new outlooks. *Transplantation*. 2009;88(7):926-34.

40. Nassif S, Kaufman S, Vahdat S, Yazigi N, Kallakury B, Island E, et al. Clinicopathologic features of post-transplant lymphoproliferative disorders arising after pediatric small bowel transplant. *Pediatric transplantation*. 2013;17(8):765-73.
41. Ramos E, Hernandez F, Andres A, Martinez-Ojinaga E, Molina M, Sarria J, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorders and other malignancies after pediatric intestinal transplantation: incidence, clinical features and outcome. *Pediatric transplantation*. 2013;17(5):472-8.
42. Nalesnik M, Jaffe R, Reyes J, Mazariegos G, Fung JJ, Starzl TE, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorders in small bowel allograft recipients. *Transplantation proceedings*. 2000;32(6):1213.
43. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th Ed ed2008.
44. Allen UD, Preiksaitis JK, Practice ASTIDCo. Epstein-Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13 Suppl 4:107-20.
45. Lauro A, Arpinati M, Pinna AD. Managing the challenge of PTLN in liver and bowel transplant recipients. *British journal of haematology*. 2015;169(2):157-72.
46. Timpone JG, Jr., Girlanda R, Rudolph L, Fishbein TM. Infections in intestinal and multivisceral transplant recipients. *Infectious disease clinics of North America*. 2013;27(2):359-77.
47. Silva JT, San-Juan R, Fernandez-Caamano B, Prieto-Bozano G, Fernandez-Ruiz M, Lumbreras C, et al. Infectious Complications Following Small Bowel Transplantation.

- American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2016;16(3):951-9.
48. Cicalese L, Sileri P, Green M, Abu-Elmagd K, Kocoshis S, Reyes J. Bacterial translocation in clinical intestinal transplantation. *Transplantation*. 2001;71(10):1414-7.
 49. San Juan R, Aguado JM, Lumbreras C, Diaz-Pedroche C, Lopez-Medrano F, Lizasoain M, et al. Incidence, clinical characteristics and risk factors of late infection in solid organ transplant recipients: data from the RESITRA study group. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2007;7(4):964-71.
 50. Pascher A, Atanasov G. The role of biologicals in intestinal transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2016;21(2):171-7.
 51. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England journal of medicine*. 2004;351(26):2715-29.
 52. Rege A, Sudan D. Intestinal transplantation. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2016;30(2):319-35.
 53. Dick AA, Horslen S. Antibody-mediated rejection after intestinal transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2012;17(3):250-7.
 54. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Specialized Immunity at Epithelial Barriers and in Immune Privileged Tissues. In: Elsevier, editor. *Cellular and Molecular Immunology*. 8th ed2015.
 55. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(6):411-20.
 56. Dahan S, Roth-Walter F, Arnaboldi P, Agarwal S, Mayer L. Epithelia: lymphocyte interactions in the gut. *Immunological reviews*. 2007;215:243-53.

57. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal immunology*. 2013;6(4):666-77.
58. Pickard JM, Chervonsky AV. Sampling of the intestinal microbiota by epithelial M cells. *Current gastroenterology reports*. 2010;12(5):331-9.
59. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(10):667-85.
60. Gerbe F, Jay P. Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal immunology*. 2016;9(6):1353-9.
61. Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal immunology*. 2008;1(1):31-7.
62. Pistoia V, Cocco C. IL-21: a new player in the control of isotype switch in Peyer's patches. *Journal of leukocyte biology*. 2009;85(5):739-43.
63. Knoop KA, Newberry RD. Isolated Lymphoid Follicles are Dynamic Reservoirs for the Induction of Intestinal IgA. *Frontiers in immunology*. 2012;3:84.
64. Pabst O, Wahl B, Bernhardt G, Hammerschmidt SI. Mesenteric lymph node stroma cells in the generation of intestinal immune responses. *Journal of molecular medicine*. 2009;87(10):945-51.
65. Habtezion A, Nguyen LP, Hadeiba H, Butcher EC. Leukocyte Trafficking to the Small Intestine and Colon. *Gastroenterology*. 2016;150(2):340-54.
66. Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(7):445-56.
67. Gibbons DL, Spencer J. Mouse and human intestinal immunity: same ballpark, different players; different rules, same score. *Mucosal immunology*. 2011;4(2):148-57.

68. van Wijk F, Cheroutre H. Intestinal T cells: facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity. *Seminars in immunology*. 2009;21(3):130-8.
69. Jabri B, Ebert E. Human CD8+ intraepithelial lymphocytes: a unique model to study the regulation of effector cytotoxic T lymphocytes in tissue. *Immunological reviews*. 2007;215:202-14.
70. Spencer J, MacDonald TT, Diss TC, Walker-Smith JA, Ciclitira PJ, Isaacson PG. Changes in intraepithelial lymphocyte subpopulations in coeliac disease and enteropathy associated T cell lymphoma (malignant histiocytosis of the intestine). *Gut*. 1989;30(3):339-46.
71. Jarry A, Cerf-Bensussan N, Brousse N, Selz F, Guy-Grand D. Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *European journal of immunology*. 1990;20(5):1097-103.
72. Eiras P, Leon F, Camarero C, Lombardia M, Roldan E, Bootello A, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes contain a CD3- CD7+ subset expressing natural killer markers and a singular pattern of adhesion molecules. *Scandinavian journal of immunology*. 2000;52(1):1-6.
73. Leon F, Roldan E, Sanchez L, Camarero C, Bootello A, Roy G. Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes. *Gastroenterology*. 2003;125(2):345-56.
74. Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nature reviews Immunology*. 2013;13(2):75-87.

75. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(2):145-9.
76. Fuchs A, Vermi W, Lee JS, Lonardi S, Gilfillan S, Newberry RD, et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells. *Immunity*. 2013;38(4):769-81.
77. Klose CS, Flach M, Mohle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, et al. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell*. 2014;157(2):340-56.
78. Schmitz F, Kooy-Winkelaar Y, Wiekmeijer AS, Brugman MH, Mearin ML, Mulder C, et al. The composition and differentiation potential of the duodenal intraepithelial innate lymphocyte compartment is altered in coeliac disease. *Gut*. 2016;65(8):1269-78.
79. Eiras P, Roldan E, Camarero C, Olivares F, Bootello A, Roy G. Flow cytometry description of a novel CD3-/CD7+ intraepithelial lymphocyte subset in human duodenal biopsies: potential diagnostic value in coeliac disease. *Cytometry*. 1998;34(2):95-102.
80. Leon F. Flow cytometry of intestinal intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *Journal of immunological methods*. 2011;363(2):177-86.
81. Keller AN, Corbett AJ, Wubben JM, McCluskey J, Rossjohn J. MAIT cells and MR1-antigen recognition. *Current opinion in immunology*. 2017;46:66-74.
82. Keller CW, Freigang S, Lunemann JD. Reciprocal Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer T Cells: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Frontiers in immunology*. 2017;8:570.
83. Suzuki K, Fagarasan S. Diverse regulatory pathways for IgA synthesis in the gut. *Mucosal immunology*. 2009;2(6):468-71.

84. Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(6):421-34.
85. Simoni Y, Fehlings M, Kloverpris HN, McGovern N, Koo SL, Loh CY, et al. Human Innate Lymphoid Cell Subsets Possess Tissue-Type Based Heterogeneity in Phenotype and Frequency. *Immunity*. 2017;46(1):148-61.
86. Shikhagaie MM, Germar K, Bal SM, Ros XR, Spits H. Innate lymphoid cells in autoimmunity: emerging regulators in rheumatic diseases. *Nature reviews Rheumatology*. 2017;13(3):164-73.
87. Cortez VS, Colonna M. Diversity and function of group 1 innate lymphoid cells. *Immunology letters*. 2016;179:19-24.
88. Bostick JW, Zhou L. Innate lymphoid cells in intestinal immunity and inflammation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(2):237-52.
89. Seillet C, Belz GT. Differentiation and diversity of subsets in group 1 innate lymphoid cells. *International immunology*. 2016;28(1):3-11.
90. Klose CS, Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nature immunology*. 2016;17(7):765-74.
91. Tait Wojno ED, Artis D. Emerging concepts and future challenges in innate lymphoid cell biology. *The Journal of experimental medicine*. 2016;213(11):2229-48.
92. van der Gracht E, Zahner S, Kronenberg M. When Insult Is Added to Injury: Cross Talk between ILCs and Intestinal Epithelium in IBD. *Mediators of inflammation*. 2016;2016:9765238.
93. Melo-Gonzalez F, Hepworth MR. Functional and phenotypic heterogeneity of group 3 innate lymphoid cells. *Immunology*. 2017;150(3):265-75.

94. Almeida FF, Belz GT. Innate lymphoid cells: models of plasticity for immune homeostasis and rapid responsiveness in protection. *Mucosal immunology*. 2016;9(5):1103-12.
95. Bekiaris V, Persson EK, Agace WW. Intestinal dendritic cells in the regulation of mucosal immunity. *Immunological reviews*. 2014;260(1):86-101.
96. Ko HJ, Chang SY. Regulation of intestinal immune system by dendritic cells. *Immune network*. 2015;15(1):1-8.
97. Flannigan KL, Geem D, Harusato A, Denning TL. Intestinal Antigen-Presenting Cells: Key Regulators of Immune Homeostasis and Inflammation. *The American journal of pathology*. 2015;185(7):1809-19.
98. Joeris T, Muller-Luda K, Agace WW, Mowat AM. Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes. *Mucosal immunology*. 2017;10(4):845-64.
99. Calleja S, Vivas S, Santiuste M, Arias L, Hernando M, Nistal E, et al. Dynamics of non-conventional intraepithelial lymphocytes-NK, NKT, and gammadelta T-in celiac disease: relationship with age, diet, and histopathology. *Digestive diseases and sciences*. 2011;56(7):2042-9.
100. Steenholt JV, Nielsen C, Baudewijn L, Staal A, Rasmussen KS, Sabir HJ, et al. The composition of T cell subtypes in duodenal biopsies are altered in coeliac disease patients. *PloS one*. 2017;12(2):e0170270.
101. Ondrejka S, Jagadeesh D. Enteropathy-Associated T-Cell Lymphoma. *Current hematologic malignancy reports*. 2016;11(6):504-13.
102. Jiang W, Su J, Zhang X, Cheng X, Zhou J, Shi R, et al. Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2014;63(11):943-50.

103. Goldberg R, Prescott N, Lord GM, MacDonald TT, Powell N. The unusual suspects--innate lymphoid cells as novel therapeutic targets in IBD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2015;12(5):271-83.
104. Kmiec Z, Cyman M, Slebioda TJ. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Advances in medical sciences*. 2017;62(1):1-16.
105. Vidali F, Di Sabatino A, Broglia F, Cazzola P, Biancheri P, Viera FT, et al. Increased CD8+ intraepithelial lymphocyte infiltration and reduced surface area to volume ratio in the duodenum of patients with ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2010;45(6):684-9.
106. Kokkonen J, Holm K, Karttunen TJ, Maki M. Children with untreated food allergy express a relative increment in the density of duodenal gammadelta+ T cells. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2000;35(11):1137-42.
107. Brown I, Mino-Kenudson M, Deshpande V, Lauwers GY. Intraepithelial lymphocytosis in architecturally preserved proximal small intestinal mucosa: an increasing diagnostic problem with a wide differential diagnosis. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2006;130(7):1020-5.
108. Lee JB, Chen CY, Liu B, Mugge L, Angkasekwinai P, Facchinetti V, et al. IL-25 and CD4(+) TH2 cells enhance type 2 innate lymphoid cell-derived IL-13 production, which promotes IgE-mediated experimental food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016;137(4):1216-25 e5.
109. Nilssen DE, Brandtzaeg P. Intraepithelial gammadelta T cells remain increased in the duodenum of AIDS patients despite antiretroviral treatment. *PloS one*. 2012;7(1):e29066.

110. Allers K, Puyskens A, Epple HJ, Schurmann D, Hofmann J, Moos V, et al. Distribution and Activation of CD8+ T Cells in the Duodenal Mucosa before and after HIV Seroconversion. *J Immunol.* 2017;198(1):481-91.
111. Kramer B, Goeser F, Lutz P, Glassner A, Boesecke C, Schwarze-Zander C, et al. Compartment-specific distribution of human intestinal innate lymphoid cells is altered in HIV patients under effective therapy. *PLoS pathogens.* 2017;13(5):e1006373.
112. Liu L, Talmon G. Quantification of intraepithelial lymphocytes in normal pediatric small intestinal allograft and native ilea. *Transplantation proceedings.* 2011;43(5):1831-5.
113. Ningappa M, Ashokkumar C, Ranganathan S, Schmitt L, Higgs BW, Sun Q, et al. Mucosal plasma cell barrier disruption during intestine transplant rejection. *Transplantation.* 2012;94(12):1236-42.
114. Tsuruyama T, Fujimoto Y, Yonekawa Y, Miyao M, Onodera H, Uemoto S, et al. Invariant natural killer T cells infiltrate intestinal allografts undergoing acute cellular rejection. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation.* 2012;25(5):537-44.
115. Yeh J, Ngo KD, Wozniak LJ, Vargas JH, Marcus EA, McDiarmid SV, et al. Endoscopy Following Pediatric Intestinal Transplant. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* 2015;61(6):636-40.
116. Olbricht CJ. Why do we need biomarkers in solid organ transplantation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2012;413(17-18):1310-1.
117. Wang A, Sarwal MM. Computational Models for Transplant Biomarker Discovery. *Frontiers in immunology.* 2015;6:458.

118. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
119. Anglicheau D, Naesens M, Essig M, Gwinner W, Marquet P. Establishing Biomarkers in Transplant Medicine: A Critical Review of Current Approaches. *Transplantation*. 2016;100(10):2024-38.
120. Crenn P, Vahedi K, Lavergne-Slove A, Cynober L, Matuchansky C, Messing B. Plasma citrulline: A marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1210-9.
121. Hibi T, Nishida S, Garcia J, Tryphonopoulos P, Tekin A, Selvaggi G, et al. Citrulline level is a potent indicator of acute rejection in the long term following pediatric intestinal/multivisceral transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12 Suppl 4:S27-32.
122. David AI, Selvaggi G, Ruiz P, Gaynor JJ, Tryphonopoulos P, Kleiner GI, et al. Blood citrulline level is an exclusionary marker for significant acute rejection after intestinal transplantation. *Transplantation*. 2007;84(9):1077-81.
123. Lauro A, Marino IR, Matsumoto CS. Advances in allograft monitoring after intestinal transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2016;21(2):165-70.
124. Mercer DF. Hot topics in postsmall bowel transplantation: noninvasive graft monitoring including stool calprotectin and plasma citrulline. *Current opinion in organ transplantation*. 2011;16(3):316-22.

125. Konikoff MR, Denson LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2006;12(6):524-34.
126. Mercer DF, Vargas L, Sun Y, Moreno AM, Grant WJ, Botha JF, et al. Stool calprotectin monitoring after small intestine transplantation. *Transplantation*. 2011;91(10):1166-71.
127. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *The New England journal of medicine*. 1969;280(14):735-9.
128. Campbell P. Clinical relevance of human leukocyte antigen antibodies in liver, heart, lung and intestine transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2013;18(4):463-9.
129. Tait BD, Susal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*. 2013;95(1):19-47.
130. Kato T, Mizutani K, Terasaki P, Quintini C, Selvaggi G, Thompson J, et al. Association of emergence of HLA antibody and acute rejection in intestinal transplant recipients: a possible evidence of acute humoral sensitization. *Transplantation proceedings*. 2006;38(6):1735-7.
131. Gonzalez-Pinto IM, Tzakis AG, Tsai HL, Chang JW, Tryphonopoulos P, Nishida S, et al. Association between panel reactive antibodies and acute small bowel rejection: analysis of a series of 324 intestinal transplants. *Transplantation proceedings*. 2010;42(10):4269-71.
132. Sindhi R, AshokKumar C, Mazariegos G, Nayyar N, Ningappa M, Soltys K, et al. Immune monitoring in small bowel transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2010;15(3):349-56.

133. Petit LM, Rabant M, Canioni D, Suberbielle-Boissel C, Goulet O, Chardot C, et al. Impacts of donor-specific anti-HLA antibodies and antibody-mediated rejection on outcomes after intestinal transplantation in children. *Pediatric transplantation*. 2017;21(2).
134. Mizutani K, Terasaki PI, Shih RN, Pei R, Ozawa M, Lee J. Frequency of MIC antibody in rejected renal transplant patients without HLA antibody. *Human immunology*. 2006;67(3):223-9.
135. Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *The New England journal of medicine*. 2007;357(13):1293-300.
136. Cox ST, Stephens HA, Fernando R, Karasu A, Harber M, Howie AJ, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A allele mismatching, antibodies, and rejection in renal transplantation. *Human immunology*. 2011;72(10):827-34.
137. Sanchez-Zapardiel E, Castro-Panete MJ, Castillo-Rama M, Morales P, Lora-Pablos D, Valero-Hervas D, et al. Harmful effect of preformed anti-MICA antibodies on renal allograft evolution in early posttransplantation period. *Transplantation*. 2013;96(1):70-8.
138. Risti M, Bicalho MD. MICA and NKG2D: Is There an Impact on Kidney Transplant Outcome? *Frontiers in immunology*. 2017;8:179.
139. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(22):12445-50.

140. Zwirner NW, Fernandez-Vina MA, Stastny P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics*. 1998;47(2):139-48.
141. Gerlach UA, Lachmann N, Ranucci G, Sawitzki B, Schoenemann C, Pratschke J, et al. Non-HLA Antibodies May Accelerate Immune Responses After Intestinal and Multivisceral Transplantation. *Transplantation*. 2017;101(1):141-9.
142. Talukdar AJ, Ashokkumar C, Wilson P, Gupta A, Sun Q, Boig L, et al. Lymphocyte subset reconstitution patterns in children with small bowel transplantation induced with steroid-free rabbit anti-human thymocyte globulin. *Pediatric transplantation*. 2009;13(3):353-9.
143. Ashokkumar C, Gupta A, Sun Q, Ningappa MB, Higgs BW, Mazariegos G, et al. Allospecific CD154+ T cells identify rejection-prone recipients after pediatric small-bowel transplantation. *Surgery*. 2009;146(2):166-73.
144. Zeevi A, Britz JA, Bentlejewski CA, Guaspari D, Tong W, Bond G, et al. Monitoring immune function during tacrolimus tapering in small bowel transplant recipients. *Transplant immunology*. 2005;15(1):17-24.
145. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):599-603.
146. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):603-6.

147. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S, et al. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet*. 2002;359(9318):1661-5.
148. Fishbein T, Novitskiy G, Mishra L, Matsumoto C, Kaufman S, Goyal S, et al. NOD2-expressing bone marrow-derived cells appear to regulate epithelial innate immunity of the transplanted human small intestine. *Gut*. 2008;57(3):323-30.
149. Lough D, Abdo J, Guerra-Castro JF, Matsumoto C, Kaufman S, Shetty K, et al. Abnormal CX3CR1(+) lamina propria myeloid cells from intestinal transplant recipients with NOD2 mutations. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12(4):992-1003.
150. Asaoka T, Island ER, Tryphonopoulos P, Selvaggi G, Moon J, Tekin A, et al. Characteristic immune, apoptosis and inflammatory gene profiles associated with intestinal acute cellular rejection in formalin-fixed paraffin-embedded mucosal biopsies. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2011;24(7):697-707.
151. Ashokkumar C, Ningappa M, Ranganathan S, Higgs BW, Sun Q, Schmitt L, et al. Increased expression of peripheral blood leukocyte genes implicate CD14+ tissue macrophages in cellular intestine allograft rejection. *The American journal of pathology*. 2011;179(4):1929-38.
152. Asaoka T, Sotolongo B, Island ER, Tryphonopoulos P, Selvaggi G, Moon J, et al. MicroRNA signature of intestinal acute cellular rejection in formalin-fixed paraffin-embedded mucosal biopsies. *American journal of transplantation : official journal of the American*

- Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2012;12(2):458-68.
153. Girlanda R, Cheema AK, Kaur P, Kwon Y, Li A, Guerra J, et al. Metabolomics of human intestinal transplant rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12 Suppl 4:S18-26.
154. Kroemer A, Elsabbagh AM, Matsumoto CS, Zasloff M, Fishbein TM. The microbiome and its implications in intestinal transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2016;21(2):135-9.
155. Alegre ML, Mannon RB, Mannon PJ. The microbiota, the immune system and the allograft. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2014;14(6):1236-48.
156. Oh PL, Martinez I, Sun Y, Walter J, Peterson DA, Mercer DF. Characterization of the ileal microbiota in rejecting and nonrejecting recipients of small bowel transplants. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12(3):753-62.
157. Ramos E. Resultados y complicaciones del trasplante intestinal del niño: Universidad Autónoma de Madrid; 2014.
158. Calvo Pulido J. Trasplante intestinal y multivisceral en adultos. Análisis de la primera experiencia en España.: Universidad Complutense de Madrid; 2011.
159. Walther A, Coots A, Nathan J, Kocoshis S, Tiao G. Physiology of the small intestine after resection and transplant. *Current opinion in gastroenterology*. 2013;29(2):153-8.

160. Kaufman SS, Magid MS, Tschernia A, LeLeiko NS, Fishbein TM. Discrimination between acute rejection and adenoviral enteritis in intestinal transplant recipients. *Transplantation proceedings*. 2002;34(3):943-5.
161. Apostolov R, Asadi K, Lokan J, Kam N, Testro A. Mycophenolate mofetil toxicity mimicking acute cellular rejection in a small intestinal transplant. *World journal of transplantation*. 2017;7(1):98-102.
162. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *The New England journal of medicine*. 2013;369(13):1215-26.
163. O'Leary JG, Kaneku H, Banuelos N, Jennings LW, Klintmalm GB, Terasaki PI. Impact of IgG3 subclass and C1q-fixing donor-specific HLA alloantibodies on rejection and survival in liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2015;15(4):1003-13.
164. Svobodova E, Gazdic T, Kubanek M, Vymetalova J, Voska L, Kment M, et al. Novel insights into pretransplant allosensitization in heart transplant recipients in the contemporary era of immunosuppression and rejection surveillance. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2016;29(1):63-72.
165. Smith JD, Ibrahim MW, Newell H, Danskine AJ, Soresi S, Burke MM, et al. Pre-transplant donor HLA-specific antibodies: characteristics causing detrimental effects on survival after lung transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2014;33(10):1074-82.

166. Rabant M, Racape M, Petit LM, Taupin JL, Aubert O, Bruneau J, et al. Antibody-mediated rejection in pediatric small bowel transplantation: Capillaritis is a major determinant of C4d positivity in intestinal transplant biopsies. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2018.
167. Troxell ML, Higgins JP, Kambham N. Evaluation of C4d staining in liver and small intestine allografts. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2006;130(10):1489-96.
168. Lopez-Garcia P, Calvo Pulido J, Colina F, Ballestin Carcavilla C, Jimenez-Romero C, Martinez Gonzalez MA, et al. Histologic evaluation of post-implantation immediate C4d deposition in 13 intestinal grafts: correlation with cell-based crossmatching, cold ischemia time, and preservation injury. *Transplantation proceedings*. 2014;46(6):2099-101.
169. Wu GS, Cruz RJ, Jr., Cai JC. Acute antibody-mediated rejection after intestinal transplantation. *World journal of transplantation*. 2016;6(4):719-28.
170. Smith JM, Weaver T, Skeans MA, Horslen SP, Harper AM, Snyder JJ, et al. OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Intestine. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2018;18 Suppl 1:254-90.
171. Wu G, Cruz RJ. Liver inclusion improves outcomes of intestinal retransplantation in adults. [Corrected]. *Transplantation*. 2015;99(6):1265-72.
172. Hidaka M, Nakamura M, Ohmichi Y, Itoh J, Fukuzawa K, Masuko T, et al. Involvement of intestinal intraepithelial lymphocytes in turnover of intestinal epithelial cells:

- morphological and functional alterations due to daily administration of FK506. Cellular immunology. 2012;279(2):124-33.
173. Weiner J, Zuber J, Shonts B, Yang S, Fu J, Martinez M, et al. Long-term Persistence of Innate Lymphoid Cells in the Gut After Intestinal Transplantation. Transplantation. 2017;101(10):2449-54.
174. Munneke JM, Bjorklund AT, Mjosberg JM, Garming-Legert K, Bernink JH, Blom B, et al. Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft-versus-host disease. Blood. 2014;124(5):812-21.
175. Vely F, Barlogis V, Vallentin B, Neven B, Piperoglou C, Ebbo M, et al. Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. Nature immunology. 2016;17(11):1291-9.
176. Li S, Yang D, Peng T, Wu Y, Tian Z, Ni B. Innate lymphoid cell-derived cytokines in autoimmune diseases. Journal of autoimmunity. 2017;83:62-72.
177. Kortekaas Krohn I, Shikhagaie MM, Golebski K, Bernink JH, Breynaert C, Creyns B, et al. Emerging roles of innate lymphoid cells in inflammatory diseases: Clinical implications. Allergy. 2018;73(4):837-50.
178. Vallentin B, Barlogis V, Piperoglou C, Cypowyj S, Zucchini N, Chene M, et al. Innate Lymphoid Cells in Cancer. Cancer immunology research. 2015;3(10):1109-14.
179. Flores-Borja F, Irshad S, Gordon P, Wong F, Sheriff I, Tutt A, et al. Crosstalk between Innate Lymphoid Cells and Other Immune Cells in the Tumor Microenvironment. Journal of immunology research. 2016;2016:7803091.
180. Ying L, Sarwal M. In praise of arrays. Pediatric nephrology. 2009;24(9):1643-59; quiz 55, 59.

181. Menon MC, Keung KL, Murphy B, O'Connell PJ. The Use of Genomics and Pathway Analysis in Our Understanding and Prediction of Clinical Renal Transplant Injury. *Transplantation*. 2016;100(7):1405-14.
182. Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G, et al. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006;6(1):150-60.
183. Pham MX, Teuteberg JJ, Kfoury AG, Starling RC, Deng MC, Cappola TP, et al. Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. *The New England journal of medicine*. 2010;362(20):1890-900.
184. Deng MC. The AlloMap genomic biomarker story: 10 years after. *Clinical transplantation*. 2017;31(3).
185. Roedder S, Sigdel T, Salomonis N, Hsieh S, Dai H, Bestard O, et al. The kSORT assay to detect renal transplant patients at high risk for acute rejection: results of the multicenter AART study. *PLoS medicine*. 2014;11(11):e1001759.
186. Molotkov A, Fan X, Deltour L, Foglio MH, Martras S, Farres J, et al. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(8):5337-42.
187. Rogler G. Mechanism of action of vedolizumab: do we really understand it? *Gut*. 2018.
188. Bernink JH, Krabbendam L, Germar K, de Jong E, Gronke K, Kofoed-Nielsen M, et al. Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity*. 2015;43(1):146-60.

189. Kikuta Y, Kusunose E, Kusunose M. Characterization of human liver leukotriene B(4) omega-hydroxylase P450 (CYP4F2). *Journal of biochemistry*. 2000;127(6):1047-52.
190. Subramanian BC, Majumdar R, Parent CA. The role of the LTB4-BLT1 axis in chemotactic gradient sensing and directed leukocyte migration. *Seminars in immunology*. 2017;33:16-29.
191. Flamand L, Tremblay MJ, Borgeat P. Leukotriene B4 triggers the in vitro and in vivo release of potent antimicrobial agents. *J Immunol*. 2007;178(12):8036-45.
192. Costea I, Mack DR, Israel D, Morgan K, Krupoves A, Seidman E, et al. Genes involved in the metabolism of poly-unsaturated fatty-acids (PUFA) and risk for Crohn's disease in children & young adults. *PloS one*. 2010;5(12):e15672.
193. Curley CR, Monsuur AJ, Wapenaar MC, Rioux JD, Wijmenga C. A functional candidate screen for coeliac disease genes. *European journal of human genetics : EJHG*. 2006;14(11):1215-22.
194. Zhang X, Hardwick JP. Regulation of CYP4F2 leukotriene B4 omega-hydroxylase by retinoic acids in HepG2 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;279(3):864-71.
195. Gisler SM, Pribanic S, Bacic D, Forrer P, Gantenbein A, Sabourin LA, et al. PDZK1: I. a major scaffold in brush borders of proximal tubular cells. *Kidney international*. 2003;64(5):1733-45.
196. Lenzen H, Lunnemann M, Bleich A, Manns MP, Seidler U, Jorns A. Downregulation of the NHE3-binding PDZ-adaptor protein PDZK1 expression during cytokine-induced inflammation in interleukin-10-deficient mice. *PloS one*. 2012;7(7):e40657.
197. Yeruva S, Chodiseti G, Luo M, Chen M, Cinar A, Ludolph L, et al. Evidence for a causal link between adaptor protein PDZK1 downregulation and Na(+)/H(+) exchanger NHE3

- dysfunction in human and murine colitis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2015;467(8):1795-807.
198. Kury S, Dreno B, Bezieau S, Giraudet S, Kharfi M, Kamoun R, et al. Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nature genetics*. 2002;31(3):239-40.
199. Venick RS, Farmer DG, Saikali D, Gordon S, Colangelo J, Reyen L, et al. Nutritional outcomes following pediatric intestinal transplantation. *Transplantation proceedings*. 2006;38(6):1718-9.
200. Venick RS, Wozniak LJ, Colangelo J, Beckwith P, Reyen L, Esmailian YA, et al. Long-term nutrition and predictors of growth and weight gain following pediatric intestinal transplantation. *Transplantation*. 2011;92(9):1058-62.
201. Ubesie AC, Cole CR, Nathan JD, Tiao GM, Alonso MH, Mezoff AG, et al. Micronutrient deficiencies in pediatric and young adult intestinal transplant patients. *Pediatric transplantation*. 2013;17(7):638-45.
202. Zhang Y, Bharadwaj U, Logsdon CD, Chen C, Yao Q, Li M. ZIP4 regulates pancreatic cancer cell growth by activating IL-6/STAT3 pathway through zinc finger transcription factor CREB. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(5):1423-30.
203. Weaver BP, Zhang Y, Hiscox S, Guo GL, Apte U, Taylor KM, et al. Zip4 (Slc39a4) expression is activated in hepatocellular carcinomas and functions to repress apoptosis, enhance cell cycle and increase migration. *PloS one*. 2010;5(10):e13158.
204. Ruiz P, Takahashi H, Delacruz V, Island E, Selvaggi G, Nishida S, et al. International grading scheme for acute cellular rejection in small-bowel transplantation: single-center experience. *Transplantation proceedings*. 2010;42(1):47-53.

205. Slowicka K, van Loo G. Optineurin Functions for Optimal Immunity. *Frontiers in immunology*. 2018;9:769.
206. Zhu G, Wu CJ, Zhao Y, Ashwell JD. Optineurin negatively regulates TNF α - induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Current biology : CB*. 2007;17(16):1438-43.
207. Tanishima M, Takashima S, Honda A, Yasuda D, Tanikawa T, Ishii S, et al. Identification of optineurin as an interleukin-1 receptor-associated kinase 1-binding protein and its role in regulation of MyD88-dependent signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(42):17250-7.
208. Outlioua A, Pourcelot M, Arnoult D. The Role of Optineurin in Antiviral Type I Interferon Production. *Frontiers in immunology*. 2018;9:853.
209. Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, et al. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science*. 2011;333(6039):228-33.
210. Slowicka K, Vereecke L, Mc Guire C, Sze M, Maelfait J, Kolpe A, et al. Optineurin deficiency in mice is associated with increased sensitivity to Salmonella but does not affect proinflammatory NF-kappaB signaling. *European journal of immunology*. 2016;46(4):971-80.
211. Chew TS, O'Shea NR, Sewell GW, Oehlers SH, Mulvey CM, Crosier PS, et al. Optineurin deficiency in mice contributes to impaired cytokine secretion and neutrophil recruitment in bacteria-driven colitis. *Disease models & mechanisms*. 2015;8(8):817-29.
212. Smith AM, Sewell GW, Levine AP, Chew TS, Dunne J, O'Shea NR, et al. Disruption of macrophage pro-inflammatory cytokine release in Crohn's disease is associated with reduced optineurin expression in a subset of patients. *Immunology*. 2015;144(1):45-55.

213. Flechner SM, Kurian SM, Head SR, Sharp SM, Whisenant TC, Zhang J, et al. Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2004;4(9):1475-89.
214. Halloran PF, Reeve J, Akalin E, Aubert O, Bohmig GA, Brennan D, et al. Real Time Central Assessment of Kidney Transplant Indication Biopsies by Microarrays: The INTERCOMEX Study. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2017;17(11):2851-62.
215. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Chang J, Hidalgo LG, Beuscart T, et al. Molecular microscope strategy to improve risk stratification in early antibody-mediated kidney allograft rejection. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2014;25(10):2267-77.
216. Halloran PF, Famulski KS, Reeve J. Molecular assessment of disease states in kidney transplant biopsy samples. *Nature reviews Nephrology*. 2016;12(9):534-48.
217. Halloran PF, Potena L, Van Huyen JD, Bruneval P, Leone O, Kim DH, et al. Building a tissue-based molecular diagnostic system in heart transplant rejection: The heart Molecular Microscope Diagnostic (MMDx) System. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2017;36(11):1192-200.

ANEXOS

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 27, 2018

This Agreement between Mrs. Paloma Talayero ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

| | |
|-------------------------------------|--|
| License Number | 4417190740885 |
| License date | Aug 27, 2018 |
| Licensed Content Publisher | John Wiley and Sons |
| Licensed Content Publication | Liver Transplantation |
| Licensed Content Title | Donor-specific antibodies in pediatric intestinal and multivisceral transplantation: the role of liver and HLA mismatching |
| Licensed Content Author | Paloma Talayero, Esther Ramos Boluda, Elena Gómez Massa, et al |
| Licensed Content Date | Aug 16, 2018 |
| Licensed Content Volume | 0 |
| Licensed Content Issue | ja |
| Licensed Content Pages | 26 |
| Type of Use | Dissertation/Thesis |
| Requestor type | Author of this Wiley article |
| Format | Print and electronic |
| Portion | Full article |
| Will you be translating? | No |
| Title of your thesis / dissertation | ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE LOCAL Y PERIFÉRICA EN EL TRASPLANTE INTESTINAL |
| Expected completion date | Dec 2018 |
| Expected size (number of pages) | 200 |
| Requestor Location | Mrs. Paloma Talayero Avenida de Cordoba s/n Madrid, 28041 Spain Attn: Mrs. Paloma Talayero |
| Publisher Tax ID | EU826007151 |
| Total | 0.00 EUR |
| Terms and Conditions | |

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and

limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License \(CC-BY-NC-ND\)](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 28, 2017

This Agreement between Mrs. Paloma Talayero ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

| | |
|-------------------------------------|--|
| License Number | 4177580323727 |
| License date | Aug 28, 2017 |
| Licensed Content Publisher | John Wiley and Sons |
| Licensed Content Publication | American Journal of Transplantation |
| Licensed Content Title | Innate Lymphoid Cells Groups 1 and 3 in the Epithelial Compartment of Functional Human Intestinal Allografts |
| Licensed Content Author | P. Talayero, E. Mancebo, J. Calvo-Pulido, S. Rodríguez-Muñoz, I. Bernardo, R. Laguna-Goya, F. L. Cano-Romero, A. García-Sesma, C. Loinaz, C. Jiménez, I. Justo, E. Paz-Artal |
| Licensed Content Date | Aug 28, 2015 |
| Licensed Content Pages | 11 |
| Type of Use | Dissertation/Thesis |
| Requestor type | Author of this Wiley article |
| Format | Print and electronic |
| Portion | Full article |
| Will you be translating? | No |
| Title of your thesis / dissertation | ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE LOCAL Y PERIFÉRICA EN EL TRASPLANTE INTESTINAL |
| Expected completion date | Dec 2017 |
| Expected size (number of pages) | 200 |
| Requestor Location | Mrs. Paloma Talayero Avenida de Cordoba s/n Madrid, 28041 Spain Attn: Mrs. Paloma Talayero |
| Publisher Tax ID | EU826007151 |
| Billing Type | Invoice |
| Billing Address | Mrs. Paloma Talayero Avenida de Cordoba s/n Madrid, Spain 28041 Attn: Mrs. Paloma Talayero |
| Total | 0.00 EUR |

[Terms and Conditions](#)

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be

construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License \(CC-BY-NC-ND\)](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 28, 2017

This Agreement between Mrs. Paloma Talayero ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|---|
| License Number | 4197670907820 |
| License date | Sep 28, 2017 |
| Licensed Content Publisher | Elsevier |
| Licensed Content Publication | Experimental and Molecular Pathology |
| Licensed Content Title | 5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts |
| Licensed Content Author | Paloma Talayero,Lola Alonso-Guirado,Guillermo Padilla,Haydee Artaza,Ana Dopazo,Fátima Sánchez-Cabo,Sarbelio Rodríguez-Muñoz,Jorge Calvo-Pulido,Esther Mancebo,Mario García de Lacoba,Estela Paz-Artal |
| Licensed Content Date | Oct 1, 2017 |
| Licensed Content Volume | 103 |
| Licensed Content Issue | 2 |
| Licensed Content Pages | 9 |
| Start Page | 163 |
| End Page | 171 |
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Portion | full article |
| Format | print |
| Are you the author of this Elsevier article? | Yes |
| Will you be translating? | No |
| Title of your thesis/dissertation | ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE LOCAL Y PERIFÉRICA EN EL TRASPLANTE INTESTINAL |
| Expected completion date | Dec 2017 |
| Estimated size (number of pages) | 200 |
| Requestor Location | Mrs. Paloma Talayero Avenida de Cordoba s/n Madrid, 28041 Spain Attn: Mrs. Paloma Talayero |
| Publisher Tax ID | GB 494 6272 12 |
| Total | 0.00 EUR |
| Terms and Conditions | |

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.
5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.
6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.
7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.
14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.
16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.
Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.9

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Doña Estela Paz Artal, con NIF 25131880X,

MANIFIESTO QUE:

como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

Relación de artículos:

Título: *Donor-specific antibodies in pediatric intestinal and multivisceral transplantation: the role of liver and HLA mismatching.*

Revista: Liver Transplantation, 2018 Aug 16.

DOI: 10.1002/lt.25323

Título: *Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts.*

Revista: American Journal of Transplantation 2016 Jan;16(1):72-82

DOI: 10.1111/ajt.13435

Título: *5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts.*

Revista: Experimental and Molecular Pathology 103 (2017) 163–171

DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.08.008

Madrid a 27 de agosto de 2018.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Estela Paz', with a horizontal line extending to the right.

Firmado: Estela Paz

Doña Esther Mancebo Sierra, con NIF 70801228Y,

MANIFIESTO QUE:

como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

Relación de artículos:

Título: *Donor-specific antibodies in pediatric intestinal and multivisceral transplantation: the role of liver and HLA mismatching.*

Revista: Liver Transplantation, 2018 Aug 16.

DOI: 10.1002/lt.25323

Título: *Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts.*

Revista: American Journal of Transplantation 2016 Jan;16(1):72-82

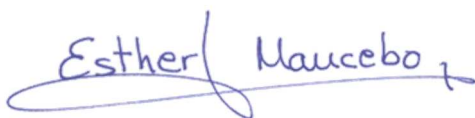
DOI: 10.1111/ajt.13435

Título: *5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts.*

Revista: Experimental and Molecular Pathology 103 (2017) 163–171

DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.08.008

Madrid a 27 de agosto de 2018.



Firmado: Esther Mancebo

Don Jorge Calvo Pulido, con NIF 71630517F,

MANIFIESTO QUE:

como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

Título: *Donor-specific antibodies in pediatric intestinal and multivisceral transplantation: the role of liver and HLA mismatching.*

Revista: Liver Transplantation, 2018 Aug 16.

DOI: 10.1002/lt.25323

Título: *Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts.*

Revista: American Journal of Transplantation 2016 Jan;16(1):72-82

DOI: 10.1111/ajt.13435

Título: *5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts.*

Revista: Experimental and Molecular Pathology 103 (2017) 163–171

DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.08.008

Madrid a 27 de agosto de 2018.



Firmado: Jorge Calvo

Doña Esther Ramos Boluda, con NIF 05400891P

MANIFIESTO QUE:

como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

Relación de artículos:

Título: *Donor-specific antibodies in pediatric intestinal and multivisceral transplantation: the role of liver and HLA mismatching.*

Revista: Liver Transplantation, 2018 Aug 16.

DOI: 10.1002/lt.25323

Madrid a 28 de agosto de 2018.

Firmado:

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'E. Ramos Boluda', written over a horizontal line.

Doña Elena Gómez Massa, con NIF 45832943S,

MANIFIESTO QUE:

como coautora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *Donor-specific antibodies in pediatric intestinal and multivisceral transplantation: the role of liver and HLA mismatching.*

Revista: Liver Transplantation, 2018 Aug 16.

DOI: 10.1002/lt.25323

Madrid a 28 de agosto de 2018.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Elena', with a horizontal line underneath.

Firmado: Elena Gómez Massa

Doña M^a José Castro Panete, con NIF 76358614V,

MANIFIESTO QUE:

como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

Relación de artículos:


Título: *Donor-specific antibodies in pediatric intestinal and multivisceral transplantation: the role of liver and HLA mismatching.*

Revista: Liver Transplantation, 2018 Aug 16.

DOI: 10.1002/lt.25323

Madrid a 28 de agosto de 2018.

Firmado:

A handwritten signature in blue ink, consisting of a series of fluid, connected strokes that form a stylized, somewhat abstract shape, likely representing the initials of the signatory.

Don Gerardo Prieto Bozano, con NIF 11683099L

MANIFIESTO QUE:

como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

Título: *Donor-specific antibodies in pediatric intestinal and multivisceral transplantation: the role of liver and HLA mismatching.*

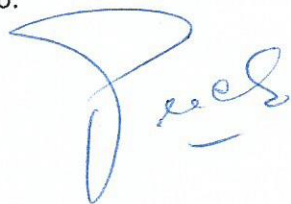
Revista: *Liver Transplantation*, 2018 Aug 16.

DOI: 10.1002/lt.25323

Madrid a 28 de agosto de 2018.

Gerardo Prieto Bozano
NIF 11.683.099L

Firmado:



Don Iván Bernardo González, con NIF 53535529Q,

MANIFIESTO QUE:

como coautor NO DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts.*

Revista: American Journal of Transplantation 2016 Jan;16(1):72-82

DOI: 10.1111/ajt.13435

Madrid a 31 de Agosto de 2018.

Firmado: Iván Bernardo González

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Iván', is written over a horizontal line. The signature is stylized and includes a large loop at the end.

Doña Rocío Laguna Goya, con NIF 74665583Q,

MANIFIESTO QUE:

como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

Relación de artículos:

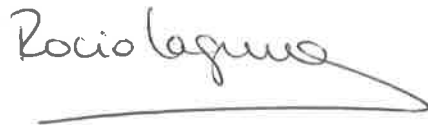
Título: *Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts.*

Revista: American Journal of Transplantation 2016 Jan;16(1):72-82

DOI: 10.1111/ajt.13435

Madrid a 3 de Octubre de 2017.

Firmado

A handwritten signature in black ink that reads "Rocio Laguna". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal stroke.

Don Francisco Luis Cano Romero, con NIF 75121370N,

MANIFIESTO QUE:

como coautor NO DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts.*

Revista: American Journal of Transplantation 2016 Jan;16(1):72-82

DOI: 10.1111/ajt.13435

Madrid a 03 de Octubre de 2017.

Firmado

Francisco Cano Romero



Don Álvaro García-Sesma Pérez-Fuentes, con NIF 00834911-B

MANIFIESTO QUE:

como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

Título: *Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts.*

Revista: American Journal of Transplantation 2016 Jan;16(1):72-82

DOI: 10.1111/ajt.13435

Madrid a 27 de OCTUBRE de 2017.

Firmado 

Don Carmelo Loinaz Seguro, con NIF 15962031P,

MANIFIESTO QUE:

como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

Título: *Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts.*

Revista: *American Journal of Transplantation* 2016 Jan;16(1):72-82

DOI: 10.1111/ajt.13435

Madrid a 26 de Octubre de 2017.



Firmado

Don Carlos Jiménez Romero, con NIF 04.537.200 J

MANIFIESTO QUE:

como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

Título: *Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts.*

Revista: American Journal of Transplantation 2016 Jan;16(1):72-82

DOI: 10.1111/ajt.13435

Madrid a 27 de Octubre de 2017.

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a stylized representation of the name.

Firmado (firma original)

Don Iago Justo Alonso, con NIF 77406247-T

MANIFIESTO QUE:

como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

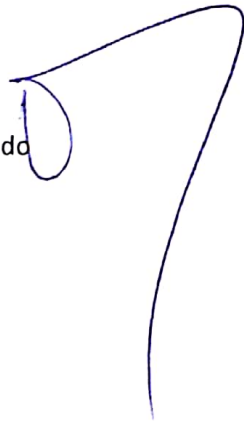
Título: *Innate lymphoid cells groups 1 and 3 in the epithelial compartment of functional human intestinal allografts.*

Revista: American Journal of Transplantation 2016 Jan;16(1):72-82

DOI: 10.1111/ajt.13435

Madrid a 30 de Octubre de 2017.

Firmado



Doña Lola Alonso Guirado, con NIF 508731517D,

MANIFIESTO QUE:

como coautora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts.*

Revista: *Experimental and Molecular Pathology* 103 (2017) 163–171

DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.08.008

Madrid a 03 de Octubre de 2017.

Firmado:

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Lola Alonso Guirado', written in a cursive style.

Don Guillermo Padilla, con NIF 51413154N,

MANIFIESTO QUE:

como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

Título: *5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts.*

Revista: *Experimental and Molecular Pathology* 103 (2017) 163-171

DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.08.008

Madrid a 4 de Octubre de 2017.

Firmado

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Doña Haydee Artaza, con NIF 54401137L

MANIFIESTO QUE:

como coautora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts.*

Revista: *Experimental and Molecular Pathology* 103 (2017) 163-171

DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.08.008

Madrid a 5 de octubre de 2017.

Firmado

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'Haydee Artaza', with a long horizontal line extending to the right.

Doña Ana Dopazo, con NIF 50300516E

MANIFIESTO QUE:

como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

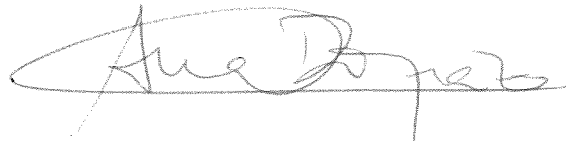
Relación de artículos:

Título: *5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts.*

Revista: *Experimental and Molecular Pathology* 103 (2017) 163–171

DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.08.008

Madrid a 2 de octubre de 2017.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ana Dopazo', written over a horizontal line.

Firmado: Ana Dopazo

Doña Fátima Sánchez Cabo, con NIF 46886157J

MANIFIESTO QUE:

como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

Relación de artículos:

Título: *5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts.*

Revista: Experimental and Molecular Pathology 103 (2017) 163–171

DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.08.008

Madrid a 12 de marzo de 2018.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fátima Sánchez Cabo', with a stylized flourish extending to the right.

Firmado: Fátima Sánchez Cabo

Don Mario García de Lacoba, con NIF 50052379D,

MANIFIESTO QUE:

como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Paloma Talayero Giménez de Azcárate**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y por lo tanto autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

Título: *5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts.*

Revista: Experimental and Molecular Pathology 103 (2017) 163–171

DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.08.008

Madrid, a 3 de Octubre de 2017.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'MGL', written in a cursive style.

Firmado: Mario García de Lacoba