




ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Mecanismos de cronificación de la respuesta autoinmune en la enfermedad de Graves-Basedow

Daniel Álvarez de la Sierra

Enero 2021



Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia
Programa de doctorat en Immunologia Avançada

Mecanismos de cronificación de la respuesta autoinmune en la enfermedad de Graves-Basedow

Autor: Daniel Álvarez de la Sierra
Director: Ricardo Pujol Borrell
Tutora: Dra. M^a Dolores Jaraquemada Pérez de Guzmán
Fecha de depósito: Enero 2021





Ricardo Pujol Borrell y M^a Dolores Jaraquemada Pérez de Guzmán, ambos doctores y docentes en la Universitat Autònoma de Barcelona

Certifican que:

La tesis titulada: **“Mecanismos de cronificación de la respuesta autoinmune en la enfermedad de Graves-Basedow”** ha sido realizada bajo su supervisión por Daniel Álvarez de la Sierra, y ha sido aprobada para ser presentada y defendida para optar al grado de Doctor en Inmunología por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Barcelona, a 20 de Enero de 2021

R
Pujol
Borrell

Digitally
signed by R
Pujol Borrell
Date:
2021.01.21
17:07:19
+01'00'

Dr. Ricardo Pujol Borrell
Director de la tesis

MARIA DOLORES
JARAQUEMADA
PEREZ DE GUZMAN

Firmado digitalmente por MARIA
DOLORES JARAQUEMADA PEREZ
DE GUZMAN
Fecha: 2021.01.21 17:39:26 +01'00'

Dra. M^a Dolores Jaraquemada Pérez de Guzmán
Tutora de la tesis

A mi madre,

Ya he terminado, deja de preguntarme todas las semanas, háblame de otras cosas más alegres cuando me llames por teléfono.

A mi padre,

Tú no me has dado tanta guerra, pero también te puedes quedar tranquilo ya.

AGRADECIMIENTOS

Escribir esta tesis ha sido un camino largo, mucho más de lo que hubiese imaginado en un principio, y lleno de altibajos que no hubiese podido superar sin el continuo apoyo de toda la gente que me ha acompañado durante estos años. Me gustaría poder dedicar un pequeño espacio aquí a todas esas personas, pero esta sección acabaría siendo aún más extensa que los propios resultados de mi trabajo.

En primer lugar, siempre estaré agradecido a Ricardo por haberme dado la oportunidad de hacer la tesis bajo su supervisión. Creo que poca gente ha tenido la suerte tener un director como él, no solo se ha preocupado de este proyecto y de mi trabajo, sino que día a día se ha esforzado en formarme y me ha ayudado a ser un mejor inmunólogo. Comenzó siendo mi jefe, pasó a ser mi director de tesis, y ha acabado siendo un amigo.

Gracias a Clara, Laura, Marina, Janire y Gemma, y al resto de amigos que he conocido en el hospital y con los que he tenido el placer de compartir la residencia. Porque sin vosotros no hubiese sido lo mismo, y aunque con los años acabe olvidándome de los tipos de linfocitos T que existen, no me olvidaré de vosotros.

Gracias a Manolo, Mónica, Roger, Ana, Paz, al resto de facultativos y a todos los técnicos, tanto los que están como los que ya se fueron. Llegué al laboratorio hace 7 años sin casi saber abotonarme la bata, y todo lo que he aprendido os lo debo a vosotros.

Gracias a todos mis amigos de Burgos, porque saber que siempre estoy a tiempo de escaparme un fin de semana para tomarnos unas cervezas juntos es suficiente para levantarme el ánimo en los peores días.

Gracias a mis padres, que siempre me han apoyado en todas mis aventuras y con todas mis decisiones, aunque no estuviesen de acuerdo. Me han dado tanto que, aunque me dejasen, nunca podría encontrar la manera de devolvérselo.

A Fran, puede que no seamos los hermanos más comunicativos, pero creo que no nos hace falta porque sabemos que siempre podremos contar con el uno con el otro. Gracias por preocuparte por mí.

Gracias a Elena, no podría haber hecho esto sin ti. Es difícil comprender lo duro que puede llegar a resultar una tesis, pero mucho peor tiene que ser convivir con un estudiante de doctorado. No solo has conseguido aguantarme en esta etapa final, sino que encima te han sobrado fuerzas para animarme todos y cada uno de los días que hemos estado juntos. No sé de dónde habrás sacado esa paciencia, pero por mi bien, espero que te dure muchos más años.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

7-AAD	7-aminoactinomicina D
BCR	Receptor de células B
BFS	Búfer fosfato salino
BMN	Bocio multinodular
CFSE	Diacetato de carboxifluoresceína
CFT	Célula folicular tiroidea
CMSP	Célula mononuclear de sangre periférica
DIT	diyodotirosina
DMEM	Medio mínimo esencial de Eagle
EAT	Enfermedad autoinmune tiroidea
EG	Enfermedad de Graves
ELI	Tiroides con infiltrados linfoides extensos (<i>Extended lymphoid infiltration</i>)
eLIT	Linfocito infiltrante de tiroides extraído enzimáticamente
GTE_x	Genome tissue expression
HBSS	Solución salina equilibrada de Hank
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
ID	Índice de división
LIT	Linfocito infiltrante del tiroides
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MIT	monoyodotirosina
mLIT	Linfocito infiltrante de tiroides extraído mecánicamente
NIT	Tiroides no infiltrado (<i>Not infiltrated thyroids</i>)
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death-ligand 1</i>
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SBF	Suero bovino fetal
SFI	Tiroides con pequeños infiltrados focales (<i>Small focal infiltrates</i>)
SNP	Single nucleotide polymorphisms
TCR	Receptor de células T
TG	Tiroglobulina
TH	Tiroiditis de Hashimoto
TIL	Linfocito infiltrante de tumor (<i>Tumor infiltrating lymphocyte</i>)
TPO	Tiroperoxidasa
TRH	hormona liberadora de TSH o tiotropina
TSH	Hormona estimulante de la tiroides o tiotropina
TSH-R	Receptor de la TSH

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
LA GLÁNDULA TIROIDES	2
1. Características generales	2
1.1. Anatomía e histología.....	2
1.1. Fisiología	2
2. Enfermedades autoinmunes del tiroides.....	5
2.1. Tiroiditis de Hashimoto (TH).....	6
2.2. Enfermedad de Graves (EG)	7
TOLERANCIA Y AUTOINMUNIDAD.....	11
1. Tolerancia central.....	12
1.1. Tolerancia central B.....	12
1.2. Tolerancia central T	13
2. Tolerancia periférica	14
2.1. Ignorancia inmunológica	15
2.2. Mecanismos antígeno específicos.....	17
2.2.1. Interacción con células presentadoras de antígeno tolerogénicas ..	17
2.2.2. Células T reguladoras (Treg).....	21
2.2.3. Exhaustion	23
2.3. Limitación de las interacciones T-B	25
FALLO DE LOS MECANISMOS DE TOLERANCIA Y AUTOINMUNIDAD	26
1. Enfermedades autoinmunes monogénicas	26
2. Enfermedades autoinmunes de herencia no mendeliana.....	27
ETIOPATOGENIA EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES (EG).....	29
1. Etiología de la enfermedad de Graves (EG)	29
2. PD-L1/PD-1: relación con manifestaciones autoinmunes en el tiroides	31
2.1. Descubrimiento y características generales.....	31
2.2. Inmunoterapia bloqueadora de la vía PD-1/PD-L1	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	35

HIPÓTESIS	36
OBJETIVOS GENERALES.....	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
PACIENTES	39
1. Enfermedades autoinmunitarias del tiroides (EAT).....	39
2. Controles	40
MUESTRAS	41
1. Tejido tiroideo	41
1.1. Criopreservación	41
1.2. Digestión enzimática	42
2. Leucocitos.....	43
2.1. Células mononucleares de sangre periférica (CMSPs).....	43
2.2. Linfocitos infiltrantes del tiroides obtenidos mediante disgregación mecánica (mLITs).....	44
2.3. Linfocitos infiltrantes de tiroides obtenidos mediante digestión enzimática (eLITs).....	45
3. Líneas celulares	45
3.1. HT93.....	45
3.2. TPC-1.....	46
3.3. HTH83	46
TINCIONES MEDIANTE INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA.....	47
1. Expresión de PD-1	48
2. Expresión de PD-L1.....	48
2.1. Distribución de PD-L1	48
2.2. Análisis de co-localización de PD-L1	49
3. Expresión de PD-L2.....	49
4. Expresión de CMTM4 y CMTM6.....	49
CULTIVOS CELULARES	50
1. Estimulación <i>in vitro</i> con IFN- γ	50
1.1. Células foliculares tiroideas (CFT)	50
1.2. Líneas celulares	50

2.	Cocultivos CFTs-CMSPs.....	51
2.1.	Preparación de las muestras	51
2.2.	Establecimiento del cocultivo.....	53
2.3.	Análisis del cocultivo	54
3.	Cocultivos línea TPC-1:CMSP.....	56
	CITOMETRÍA DE FLUJO	58
1.	Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en CMSPs y LITs	58
1.1.	Protocolo	59
1.2.	Estrategia para el análisis de citometría de flujo (gating)	59
2.	Expresión de PD-L1 y PD-L2 en CFTs y líneas celulares.....	60
2.1.	Protocolo	61
2.2.	Estrategia para el análisis de citometría de flujo (gating)	61
3.	Cocultivo de CMSPs con CFTs primarias o células transformadas TPC-1	62
3.1.	Protocolo	62
3.2.	Estrategia para el análisis de citometría de flujo.....	63
3.3.	Análisis estadístico	64
	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA	65
1.	Extracción de ARN	65
2.	RT-PCR	66
3.	qPCR	66
3.1.	Expresión de PD-L1 y PD-L2.....	67
3.2.	Expresión de genes de IFN de tipos I y II	67
	ANÁLISIS DE DATOS DE ARNseq - GTEx	67
1.	Clasificación histológica - GTEx	68
2.	Análisis de expresión génica - GTEx	69
2.1.	Control de calidad.....	69
2.2.	Análisis de la expresión diferencial	70
2.3.	Análisis de significación biológica	70
3.	Cibersort.....	71
	RESULTADOS.....	72
	EXPRESIÓN DE PD-1, PD-L1 Y PD-L2 EN PACIENTES CON EAT.....	73
1.	Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en CMSPs y LITs	73

1.1.	Subpoblaciones de memoria en LT periféricos e infiltrantes	73
1.2.	Expresión de PD-L1 y PD-L2 en CMSPs y LITs	75
1.3.	Expresión de PD-1 en CMSPs y LITs.....	75
1.4.	Análisis histológico de la expresión de PD-1.....	78
1.5.	Correlación de la expresión de PD-1 en linfocitos y parámetros analíticos	80
2.	Expresión de PD-L1 y PD-L2 en tiroides	81
2.1.	Expresión basal en suspensiones celulares.....	82
2.2.	Expresión en secciones de tejido congelado.....	82
2.2.1.	Expresión PD-L1 y PD-L2: IFI simple	83
2.2.2.	Distribución de PD-L1: IFI triple	85
3.	Expresión de CMTM4 y CMTM6 en tiroides	89
4.	Expresión de IFN de tipo I y II en tiroides	90
4.1.	Expresión génica relativa de IFNs tipo I y II.....	90
4.2.	Correlación con la expresión de PD-L1.....	91
5.	Inducción <i>in vitro</i> de la expresión de PD-L1 y PD-L2 por efecto de IFN- γ , cinética y relación con HLA de clase I y II	92
5.1.	Líneas celulares	92
5.2.	Cultivos primarios.....	97
ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE CMSPs Y CFTs		103
1.	Cocultivo autólogo de CMSPs y CFTs	103
1.1.	Efecto del cocultivo con células foliculares tiroideas (CFTs) sobre los linfocitos autólogos activados <i>in vitro</i>	104
1.2.	Efecto del cocultivo con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) sobre las células foliculares tiroideas (CFT) autólogas activados <i>in vitro</i>	110
2.	Cocultivo de CMSPs con la línea celular TPC-1	113
2.1.	Las células TPC-1 tienen un efecto negativo parcial sobre los linfocitos T autólogos activados <i>in vitro</i>	115
2.2.	Efecto del cocultivo sobre las células TPC-1	117
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE TIROIDES CON DIFERENTES GRADOS DE TIROIDITIS DE LA COLECCIÓN GTEx (<i>GENOTYPE TISSE EXPRESSION PROJECT</i>).....		119

1.	Clasificación histológica – GTEX.....	119
2.	Análisis de expresión génica – GTEX	121
2.1.	Control de calidad.....	121
2.2.	Análisis de la expresión diferencial	122
2.3.	Análisis de significación biológica	129
3.	Cibersort.....	140
	DISCUSIÓN	143
	CONCLUSIONES.....	156
	BIBLIOGRAFÍA	158
	ANEXOS.....	175
	FIGURAS SUPLEMENTARIAS	176
	TABLAS SUPLEMENTARIAS	212

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

LA GLÁNDULA TIROIDES

1. Características generales

1.1. Anatomía e histología

El tiroides es una glándula endocrina localizada en la parte anterior de la tráquea, justo por debajo de la prominencia laríngea. Formada por dos lóbulos, cada uno situado a un lado de la tráquea, y unidos por un istmo en la parte central (**Figura 1**). Las principales funciones de esta glándula son el control del metabolismo basal mediante la secreción de tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3), y la regulación del metabolismo del calcio mediante la secreción de calcitonina.

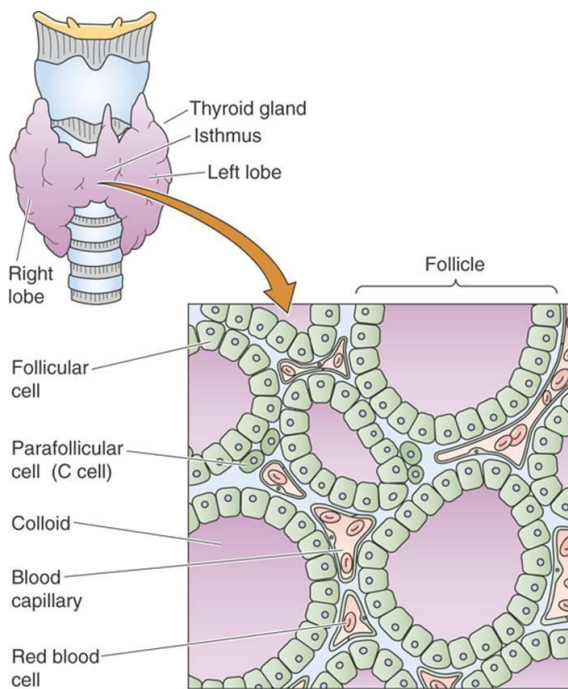


Figura 1. Representación de la posición de la glándula tiroides respecto a la tráquea e imagen representativa de una sección histológica de la misma.

Histológicamente es una glándula sólida, compuesta por multitud de folículos tiroideos de tamaño variable muy próximos entre sí. Estos folículos, son estructuras cerradas delimitadas por un epitelio simple cúbico formado por células foliculares tiroideas (CFTs). La luz de los folículos se encuentra ocupada por un coloide cuyo componente principal es una glucoproteína llamada tiroglobulina, y que actúa como reservorio de hormonas tiroideas. El escaso espacio interfolicular está ocupado por una combinación de abundantes capilares y vasos sanguíneos de pequeño tamaño, matriz extracelular, y un pequeño número de células C o células

parafoliculares, encargadas de la síntesis de calcitonina.

1.1. Fisiología

La hormonas T_4 y la T_3 son moléculas derivadas del aminoácido tirosina con un alto contenido en yodo, y cuya síntesis es llevada a cabo por las CFTs en un proceso que comienza con la captación de yodo por parte de las CFTs. El ion

INTRODUCCIÓN

yoduro (I^-) circulante en la sangre es transportado de forma activa al interior de estas células mediante la bomba de yoduro o simportador Na^+/I^- , este transporte libera al espacio extracelular dos iones sodio por cada ion yoduro captado. Una vez en el interior, este es transportado a la luz del folículo a través de la cara apical de las CFTs mediante un cotransportador Cl^-/I^- denominado pendrina. La tiroglobulina es a su vez sintetizada por las CFTs, y liberada a la luz folicular mediante vesículas secretoras. En el interior de los folículos el ion yoduro (I^-) es oxidado a yodo (I^0) por la acción de la tiroperoxidasa, en un proceso denominado organificación del yodo, el I^0 se une al anillo de benceno de los residuos de tirosina de la tiroglobulina, dando lugar a monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT). El acoplamiento de los residuos de tirosina yodados da lugar a la formación de T_3 , mediante un residuo de MIT y uno de DIT, o la formación de T_4 , que requiere de la unión de dos residuos de DIT. Tras la síntesis las hormonas tiroideas permanecen unidas a la tiroglobulina en el interior de los folículos tiroideos, actuando de reservorio. Para su secreción la tiroglobulina es endocitada, tras lo que es sometida a un proceso de proteólisis que libera las hormonas T_3 y T_4 , que pasan al torrente sanguíneo a través de la cara basal de las CFTs.

El principal regulador de la síntesis de T_3 y T_4 es la hormona estimulante del tiroides o tirotropina (TSH). Bajos niveles de hormonas tiroideas en el torrente sanguíneo estimulan el hipotálamo, el cual libera la hormona liberadora de TSH (TRH) que se transporta a través de los vasos porta hipotálamo-hipofisarios hasta la adenohipófisis, aumentando la liberación de tirotropina. La TSH cuyo receptor, TSH-R, se expresa en la cara basal de las CFTs, ejerce distintos efectos que son cruciales para el funcionamiento del tiroides:

- Eleva la proteólisis de la tiroglobulina almacenada en los folículos, aumentando así la liberación de hormonas tiroideas a la sangre.
- Incrementa la actividad de la bomba de yoduro.
- Incrementa la organificación del yodo, aumentando la síntesis de hormonas tiroideas unidas a moléculas de tiroglobulina.
- Induce la proliferación de los CFTs.

A su vez, el aumento de los niveles de T_3 y T_4 circulantes produce un efecto de retroalimentación negativa sobre la liberación de TRH en el hipotálamo y de TSH en la adenohipófisis (**Figura 2**).

INTRODUCCIÓN

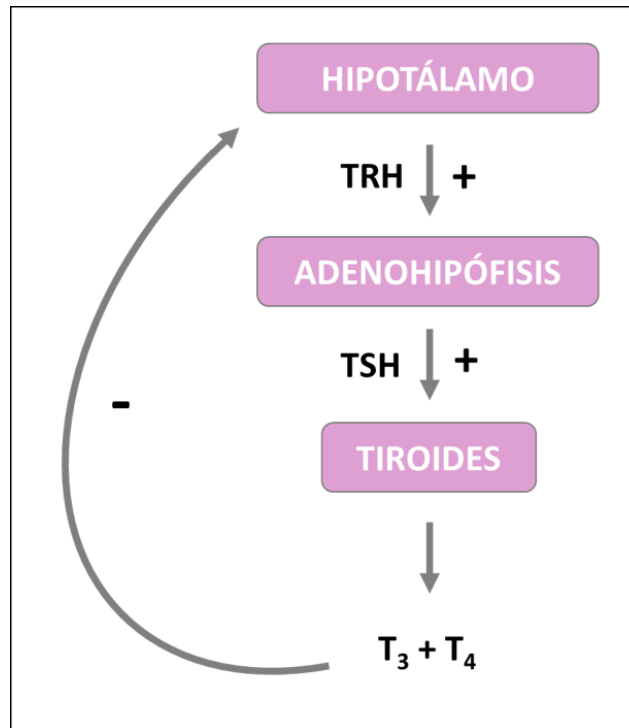


Figura 2. Representación del eje hipotálamo-hipofisario-tiroideo.

Hasta el 90% de las hormonas tiroideas liberadas al torrente sanguíneo se encuentran en forma de tiroxina, y solo una mínima parte como triyodotironina, a pesar de que es esta forma la más activa de las dos. Para su distribución a los tejidos periféricos estas hormonas se unen a proteínas plasmáticas inmediatamente después de su incorporación a la circulación, la principal proteína encargada de su transporte es la globulina fijadora de tiroxina (TBG), aunque también pueden unirse en menor medida a la prealbúmina o a la albúmina. La naturaleza lipofílica de la T_3 y la T_4 hace que estas puedan difundir a través de la membrana plasmática de las células cuando se encuentran en su forma libre, a pesar de ello existen distintos receptores de membrana que facilitan la acumulación de estas hormonas mediante un proceso de transporte activo hacia el interior celular.

Una vez las hormonas tiroideas han sido captadas, la mayor parte de la tiroxina pierde un átomo de yodo para pasar a triyodotironina en un proceso que está regulado por un grupo de enzimas llamadas desyodasas, y de las que existen hasta tres isoformas diferentes. Esta vía de catabolismo periférico es responsable del 80-85% de la producción de T_3 , mientras que tan solo el 10-15% se produce por

INTRODUCCIÓN

síntesis directa en el tiroides. Para ejercer su función las hormonas tiroideas se unen a los receptores de hormonas tiroideas (TRs), que pertenecen a una familia de factores de transcripción dependientes de ligando. Existen distintas isoformas de estos receptores, sin embargo, la T_3 es capaz de unirse a cada uno de ellos, y en todos los casos con una afinidad 50 veces superior a la observada para la T_4 , por ello se la considera la forma hormonalmente activa. Una vez formados los complejos hormona-receptor, estos se unen a secuencias específicas del ADN promoviendo su transcripción, y actuando sobre distintos procesos fisiológicos. Las principales consecuencias de la acción de las hormonas tiroideas son las siguientes:

- Aumento del metabolismo basal mediante el incremento del número y actividad de las mitocondrias.
- Aumenta el metabolismo de los hidratos de carbono al favorecer la captación de glucosa en el tubo digestivo, la glucólisis y al gluconeogénesis.
- Aumenta el metabolismo de los lípidos al inducir la movilización de las reservas del tejido adiposo.
- Aumento de la termogénesis al favorecer la acción de la termogenina en el tejido adiposo marrón.
- Aumento el flujo sanguíneo y el gasto cardíaco.
- Aumento de la frecuencia respiratoria.
- Participa en el desarrollo del SNC durante la vida intrauterina y comienzo de la lactancia.
- Presenta diversos efectos sobre el sistema nervioso adulto al aumentar la vigilia y la alerta, la respuesta a diversos estímulos, y puede como modificar la sensación de hambre, la memoria o la capacidad de aprendizaje.

2. Enfermedades autoinmunes del tiroides

Dentro del conjunto de patologías que pueden afectar a la glándula tiroidea, uno de los principales grupos es el de las enfermedades autoinmunes del tiroides (AITD). Aunque las AITD incluyen diversas patologías claramente diferenciadas, como la tiroiditis posparto o la tiroiditis inducida por fármacos, las formas

INTRODUCCIÓN

principales y con mayor incidencia son la enfermedad de Graves (EG) y la tiroiditis de Hashimoto (TH).

Las AITD son el grupo de enfermedades autoinmunes más comunes en el ser humano, con una prevalencia de entre el 2% y el 5% de la población total que varía considerablemente en función de la zona geográfica. Del conjunto de las AITD, la TH es la entidad más común, con una incidencia hasta 5 veces superior a la EG. Adicionalmente, como en la mayor parte de las enfermedades autoinmunes, las mujeres tienen un riesgo 5-10 superior al de los hombres de sufrir cualquier tipo de AITD (1–3).

2.1. Tiroiditis de Hashimoto (TH)

También conocida como tiroiditis linfocítica crónica, es la forma más común de hipotiroidismo en países desarrollados, siendo además la primera enfermedad autoinmune órgano-específica identificada. Fue nombrada en reconocimiento al Dr. Hakaru Hashimoto, quien en 1912 fue primero describió sus síntomas característicos y los asoció a la presencia de grandes infiltrados linfocíticos en el tiroides.

Durante el curso de la enfermedad se produce un infiltrado linfocítico progresivo compuesto principalmente por linfocitos T, aunque con el tiempo se puede llegar a inducir la formación de tejido linfoide terciario con presencia de centros germinales y abundantes linfocitos B. Este infiltrado compuesto mayoritariamente por células autorreactivas es el responsable de la destrucción del tejido tiroideo y la inflamación crónica de la glándula, que a su vez puede inducir el desarrollo de fibrosis. Aunque inicialmente este proceso no produce síntomas, con el tiempo el tiroides puede aumentar de tamaño dando lugar a la aparición de bocio, y la destrucción del parénquima normal puede tener como consecuencia un déficit en la producción de hormonas tiroideas, lo que condiciona la aparición del hipotiroidismo. En algunos casos la enfermedad puede manifestarse en su etapa inicial con síntomas típicos de hipertiroidismo, este fenómeno estaría producido por el rápido aumento de la liberación de hormonas tiroideas a la circulación como consecuencia de la destrucción del tejido tiroideo, aunque esta fase es transitoria y evoluciona hacia el hipotiroidismo cuando la suficiente cantidad de parénquima endocrino ha sido destruido.

Esta patología se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos frente a distintos proteínas del tiroides, siendo los principales aquellos dirigidos contra la

INTRODUCCIÓN

tiroperoxidasa (anti-TPO), que se detectan en la mayor parte de los pacientes, aunque también pueden encontrarse autoanticuerpos contra la tiroglobulina (anti-TG) o autoanticuerpos con un efecto bloqueante del TSH-R, entre otros. A pesar de ello, el papel de estos autoanticuerpos en la destrucción de las CFTs no se conoce por completo, sin embargo, estos constituyen un marcador diagnóstico de la enfermedad, y sus niveles pueden correlacionarse con su actividad.

Las consecuencias del hipotiroidismo pueden afectar a la mayoría de los órganos y sistemas, por lo que sus síntomas son altamente inespecíficos, siendo bastante común la sensación de fatiga o de letargia, el estreñimiento, la intolerancia al frío, o la aparición de cuadros depresivos. Los casos más extremos pueden dar lugar a la aparición de mixedema, condición que se caracteriza por la acumulación de ácido hialurónico y sulfato de condroitina en los espacios intersticiales, lo cual aumenta la retención de líquido en estos compartimentos y da lugar a la aparición de un edema sin fovea.

El tratamiento en la mayor parte de los casos es la sustitución hormonal mediante levotiroxina. Un pequeño porcentaje de pacientes puede requerir un tratamiento quirúrgico mediante una tiroidectomía parcial o total cuando el desarrollo de bocio condiciona la respiración o la deglución.

2.2. Enfermedad de Graves (EG)

En países en los que no existe un déficit de yodo en la dieta, la enfermedad de Graves es la causa de hipertiroidismo más común entre la población adulta, con una incidencia de 20 a 50 casos por cada 100.000 personas al año y una prevalencia que varía entre el 0,5% y el 2% de la población. Debe su nombre al Dr. Robert James Graves, quien en 1835 publicó un artículo describiendo una serie de cuatro pacientes que presentaban taquicardia asociada a la presencia de bocio. En ocasiones esta entidad puede denominarse enfermedad de Graves-Basedow como reconocimiento al Dr. Carl Adolph Basedow, que estableció la relación entre esta patología y la aparición de exoftalmos en algunos de los pacientes afectados por ella.

Las manifestaciones de la EG dependen en gran medida de la edad del paciente en el momento de inicio de la enfermedad, y del tiempo transcurrido desde el comienzo de esta. Los síntomas y signos clínicos se deben principalmente al hipertiroidismo, y un pequeño número de ellos al propio proceso autoinmune (**Tabla 1**). Suelen presentarse de manera progresiva, siendo los más frecuentes la pérdida de peso, cansancio, intolerancia al calor, temblores, o palpitaciones.

INTRODUCCIÓN

Mientras que las manifestaciones cardíacas secundarias al hipertiroidismo, como la fibrilación atrial o la insuficiencia cardíaca congestiva, son más comunes en pacientes mayores de 60 años, estas son raras en pacientes jóvenes. Por otro lado, el desarrollo de un bocio palpable se observa en la mayor parte de los pacientes menores de 60 años, pero solo un 50% de las personas por encima de esta edad llegará a presentarlo durante el transcurso de la enfermedad (4).

Tabla 1. Síntomas y signos clínicos asociados a la enfermedad de Graves.

Síntomas
Pérdida de peso
Palpitaciones
Disnea
Temblores
Fatiga y debilidad muscular
Intolerancia al calor e incremento de la sudoración
Ansiedad, insomnio y alteraciones del comportamiento
Prurito
Polidipsia y poliuria
Oligomenorrea o amenorrea
Síntomas oculares: dolor, hinchazón, diplopia
Signos clínicos asociados al hipertiroidismo
Taquicardia
Hipertensión arterial
Fallo cardíaco
Pérdida de peso
Temblores
Hipertermia
Eritema palmar
Debilidad Muscular
Caída del pelo
Bocio difuso palpable
Alteraciones del comportamiento
Signos clínicos extratiroidales
Oftalmopatía: exoftalmos, diplopía, edema periorbital, neuropatía óptica
Demopatía localizada: mixedema pretibial
Acropatía

La EG es una enfermedad de origen autoinmune que presumiblemente comienza como consecuencia del reconocimiento de antígenos propios del tiroides por parte de linfocitos T autorreactivos. Estas células T interactuarán con linfocitos B autorreactivos induciendo una respuesta humoral, que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos frente a distintos antígenos tiroideos. Este proceso es especialmente importante en la EG, ya que el hipertiroidismo asociado

INTRODUCCIÓN

a esta patología es producido por el efecto de autoanticuerpos estimulantes contra el receptor de la TSH (TSAb), patognomónicos de la enfermedad. Estos autoanticuerpos se unen al receptor de la TSH emulando el efecto de esta hormona, y estimulan a las CFTs induciendo la síntesis de hormonas tiroideas. Actúan mediante un mecanismo de señalización que es independiente del eje de regulación hipotálamo-hipofisario, lo que tiene como consecuencia el desarrollo del hipertiroidismo que caracteriza a esta enfermedad. Los pacientes con EG también presentan autoanticuerpos frente a otras proteínas expresadas en el tiroides, siendo los más comunes los dirigidos contra la tiroglobulina y la tiroperoxidasa, aunque como en el caso de la TH no se ha demostrado que intervengan de forma directa en la patogenia de la enfermedad.

Es probable que las propias CFTs participen en el desarrollo o el mantenimiento de la enfermedad ya que se ha demostrado que estas células son capaces de liberar distintas quimiocinas y citocinas que podrían favorecer el reclutamiento y la actividad de células del sistema inmune (5–7). Así mismo en pacientes con EG estas células expresan en su superficie moléculas HLA de clase II, cuya expresión podía inducirse *in vitro* mediante la estimulación con IFN- γ en CFTs de pacientes con EG o tejido control obtenido de bocios multinodulares (8,9), y aunque se ha demostrado que bajo estas condiciones son capaces de coexpresar CD40, no se ha conseguido demostrar su papel en la presentación antigénica a células T (10). Un estudio transcriptómico posterior de glándulas tiroideas de pacientes con EG demostró la presencia de una firma de genes relacionados con la señalización con IFN- γ , lo que explicaría la expresión *in vivo* de estas moléculas en los CFTs de estos pacientes (11).

Histológicamente, y al igual que en la TH, el tiroides de pacientes con EG se caracteriza por la infiltración de la glándula por células del sistema inmune. Aunque en el caso de la EG la tiroiditis es generalmente de carácter difuso, según avanza el curso de la enfermedad también es habitual la presencia de tejido linfóide terciario y de centros germinales con abundancia de linfocitos B. Entre sus efectos los TSAb estimulan la proliferación de las CFTs, esto tiene como consecuencia un incremento de la celularidad del parénquima del tiroides y un aumento del tamaño de la glándula. Unido a la inducción de procesos de hiperplasia e hipertrofia de estas células, a nivel histológico los folículos pierden su estructura habitual, su epitelio pasa de tener una morfología plana o cúbica a una cilíndrica que está acompañada de un aumento del tamaño de las CFTs. Este proceso produce la aparición de invaginaciones del epitelio hacia el interior de los folículos y la disminución del espacio ocupado por la luz de los mismo.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de la EG se basa en los síntomas clínicos y en alteraciones de las pruebas bioquímicas. A nivel analítico el hipertiroidismo se caracteriza por un aumento de los niveles séricos de T_3 y T_4 y la disminución de los niveles de TSH. Los anticuerpos estimulantes del receptor de la TSH, patognomónicos de la enfermedad, se detectan en hasta el 98% de los pacientes afectados por esta patología. La presencia de oftalmopatía o de mixedema pretibial contribuirán a confirmar el diagnóstico de EG, por el contrario, en aquellos casos que no presenten estos signos clínicos una gammagrafía de la glándula permitirá diferenciar la EG de otras patologías del tiroides.

El tratamiento de primera línea es generalmente farmacológico mediante el uso de medicamentos antitiroideos, estos fármacos inhiben la síntesis, la liberación o la conversión periférica de las hormonas tiroideas. La terapia farmacológica tiene una baja tasa de remisión a largo plazo, por ello muchos pacientes con EG recurrente son sometidos a terapias más agresivas. Una de las opciones es la ablación de la glándula mediante la exposición a radioyodo, esta terapia reduce la actividad del tiroides y disminuye el hipertiroidismo y la recurrencia de este, sin embargo, se relaciona con la aparición o el empeoramiento de la oftalmopatía (12). La tiroidectomía totalizadora es otra alternativa para aquellos pacientes que no desean realizar un tratamiento mediante radioyodo, el riesgo de recurrencia tras este procedimiento es muy bajo y es proporcional a la cantidad de tejido residual tras la intervención. En la mayor parte de los pacientes sometidos a la ablación mediante radioyodo o al tratamiento quirúrgico se produce un hipotiroidismo secundario que requiere tratamiento sustitutivo, de forma análoga al recibido por pacientes con TH.

Se ha de considerar que, aunque la detección en suero de autoanticuerpos contra antígenos del tiroides, y la presencia de infiltrados linfoides en esta glándula son características altamente específicas de las AITD, estas pueden darse en un porcentaje variable de individuos eutiroideos. La presencia de infiltrados en el tiroides en ausencia de clínica asociada, denominada tiroiditis focal, es un fenómeno común en la población. Gracias al estudio histológico de tiroides en cadáveres se sabe que la incidencia de la tiroiditis focal aumenta con la edad, siendo rara en personas menores de veinte años pero llegando a presentarse en más del 15-20% de la población mayor de 60 años (13,14).

INTRODUCCIÓN

TOLERANCIA Y AUTOINMUNIDAD

El sistema inmune está compuesto por distintos tipos celulares, órganos y tejidos distribuidos por el cuerpo humano, y cuya función principal es la de protegernos frente a agentes infecciosos, aunque algunos de sus componentes participan además en otros procesos fisiológicos.

Como consecuencia del elevado número de microorganismos que pueden actuar como patógenos, y la alta capacidad de mutación y adaptación que estos poseen, el sistema inmune de los vertebrados ha evolucionado a lo largo del tiempo hasta obtener la capacidad de generar en cada individuo un repertorio extremadamente amplio de receptores específicos frente a antígenos. Estos receptores son el BCR en los linfocitos B, que a su vez da lugar a las inmunoglobulinas en su forma soluble cuando es secretado por las células plasmáticas, y el TCR en los linfocitos T. La enorme variabilidad en la especificidad de estos receptores se consigue mediante procesos de recombinación de segmentos génicos, generando en cada clon de linfocitos T y B una secuencia codificante única para su receptor de membrana. Además, los genes que codifican para el BCR, y que previamente fueron generados por recombinación en la médula ósea, pueden sufrir un proceso de hipermutación somática que tiene lugar en los centros germinales durante la respuesta inmune, y que contribuye a aumentar su afinidad frente a los antígenos. La aleatoriedad inherente a estos procesos hace que sea inevitable la aparición de receptores TCR y BCR autorreactivos que, bajo las condiciones adecuadas, son capaces de reconocer estructuras moleculares propias como ajenas, produciendo respuestas autoinmunes y el consecuente daño tisular asociado. Para eliminar, o reducir, la aparición y la funcionalidad de aquellas clonas que por su especificidad puedan ejercer un efecto pernicioso sobre el huésped, el sistema inmune posee distintos mecanismos de regulación que se engloban dentro del concepto de tolerancia inmunológica.

La tolerancia se define como la falta de respuesta del sistema inmune frente a un antígeno inducida por la exposición previa a este. Los mecanismos que dan lugar a ella pueden clasificarse en la tolerancia central y la tolerancia periférica en base a la localización anatómica donde se producen, y las fases madurativas de los linfocitos sobre las cuales actúan. La tolerancia central tiene lugar en la médula ósea y el timo, y su objetivo es la eliminación de las clonas autorreactivas de linfocitos B y T, respectivamente. Esta eliminación se lleva a cabo durante las etapas iniciales de su desarrollo, en las cuales se producen los principales fenómenos de reordenamiento genético que dan lugar a la generación de sus receptores específicos de antígeno. Sin embargo, los mecanismos implicados en

INTRODUCCIÓN

la tolerancia central no son totalmente efectivos, y en condiciones normales una pequeña proporción de células autorreactivas frente a distintos antígenos propios logran completar su maduración y salir de los órganos linfoides primarios (15). La tolerancia periférica tiene lugar en los órganos linfoides secundarios y en los tejidos periféricos, y su objetivo principal es evitar la activación de las células maduras autorreactivas que hayan sido capaces de abandonar los órganos linfoides primarios. Los principales procesos que componen la tolerancia periférica son la ignorancia inmunológica, la limitación en las interacciones T-B, y los mecanismos antígeno específicos.

1. Tolerancia central

La tolerancia central actúa eliminando la mayor parte de las células autorreactivas B y T durante las etapas iniciales de su maduración. El mecanismo principal implicado es la eliminación clonal, concepto que enunció Frank M. Burnet en 1957 en su hipótesis de la selección clonal. A pesar de que el objetivo de la eliminación clonal en linfocitos B y T es el mismo, los procesos que se desarrollan para conseguirlo en médula ósea y timo, respectivamente, difieren entre sí.

1.1. Tolerancia central B

Los precursores de los linfocitos B se generan en médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas (HSCs), y continúan su maduración en este órgano. Durante su desarrollo comienzan los procesos de reordenamiento genético que darán lugar a la expresión de un receptor B (BCR) único en cada una de estas células. Es en la fase madurativa de célula pre-B, en la cual los linfocitos expresan en superficie un primer BCR del isotipo IgM completamente funcional. En este momento las interacciones de alta afinidad del BCR con antígenos propios producen una cascada de señalización que lleva a dos posibles desenlaces, la muerte por apoptosis de la célula autorreactiva, o el inicio de un mecanismo de rescate denominado edición del receptor, que consiste en la generación de un nuevo receptor B mediante la recombinación de una cadena ligera alternativa. En el caso de producirse la edición del receptor, una vez finalizado el nuevo reordenamiento, esta célula pre-B interacciona de nuevo con antígenos propios, continuando su desarrollo en caso de haber perdido su autorreactividad (16). Durante esta fase de desarrollo hasta un 70% de las células pre-B pueden llegar a reconocer antígenos propios. Aunque este porcentaje desciende tras los procesos

INTRODUCCIÓN

de selección negativa y edición del receptor de las clonas autorreactivas, estudios en humanos demostraron que hasta un 40% de los linfocitos B que emigran de médula ósea poseen la capacidad de reconocer auto-antígenos, aunque el porcentaje de células autorreactivas se reduce nuevamente tras su paso a células B naïve maduras (17).

1.2. Tolerancia central T

Los timocitos, precursores de los linfocitos T, se generan en adultos en médula ósea, pero abandonan esta y se dirigen al timo para continuar allí su maduración (18). Estos migran a la zona cortical del timo, donde comienzan a dividirse dando lugar a un gran número de células inmaduras con un fenotipo CD3-CD4-CD8-TCR-, denominadas timocitos doble negativos (DN). Los timocitos DN sufren el reordenamiento de las cadenas codificantes del TCR en un proceso dependiente de las recombinasas RAG1 y RAG2, y expresan por primera un TCR funcional al mismo tiempo que coexpresan los correceptores del TCR CD4 y CD8, denominándose a partir de este momento timocitos doble positivos (DP). En este punto, los timocitos DP son sometidos a un proceso de selección positiva dependiente, principalmente, de su interacción con células epiteliales tímicas corticales (cTEC) a través de la presentación de antígenos propios mediante moléculas de HLA. Los timocitos que no sean capaces de reconocer el complejo péptido-HLA, o que lo reconozcan con muy baja afinidad, morirán por un mecanismo de ignorancia (*death by neglect*), proceso mediante el cual son eliminados el 80-90% de los timocitos producidos en el timo. Por otro lado, aquellos capaces de reconocer los complejos péptido-HLA con afinidad media continuarán el proceso madurativo, continuando su migración a la médula tímica al mismo tiempo que se diferencian en timocitos positivos simples (SP), CD4+ en el caso de aquellos capaces de reconocer adecuadamente péptidos unidos a moléculas HLA de clase II, o CD8+ si estos interaccionan a través de moléculas HLA de clase I.

En la médula tímica los timocitos SP son sometidos a un proceso de selección negativa o eliminación clonal, mediado principalmente por la interacción con las células epiteliales tímicas medulares (mTEC). El objetivo es la eliminación de los clones autorreactivos capaces de reconocer péptidos propios presentados a través de moléculas de HLA. Para ello las mTEC son capaces de expresar un gran número de antígenos inicialmente restringidos a otros tejidos periféricos en un proceso denominado expresión génica promiscua, y cuyos principales reguladores son los factores de transcripción AIRE (*autoimmune regulator*) y

INTRODUCCIÓN

FezF2. La mayoría de los timocitos SP capaces de reconocer péptidos propios presentados por las mTECs sufren un proceso de apoptosis, que tiene como consecuencia la eliminación de la mayor parte de las clonal autorreactivas. A pesar de ello, un pequeño número de timocitos con afinidad media-alta por los complejos péptido-HLA propios recibirán las señales necesarias para su diferenciación en células T reguladoras naturales (nTreg), que participan en el mantenimiento de la tolerancia periférica (19).

Es precisamente la capacidad de las mTECs de presentar múltiples péptidos restringidos a otros tejidos periféricos, lo que hace de la selección negativa tímica un proceso mucho más efectivo y exhaustivo que la delección clonal de linfocitos B en la médula ósea.

2. Tolerancia periférica

Los mecanismos de tolerancia central ya comentados limitan enormemente la salida a periferia de linfocitos B y T autorreactivos de alta afinidad desde los órganos linfoides primarios. Sin embargo, estos mecanismos no tienen una efectividad total, lo que permite en condiciones normales la presencia de células circulantes autorreactivas de baja afinidad. Estas células, bajo las condiciones adecuadas, pueden llegar a activarse de forma antígeno-específica, dando lugar a la aparición en última instancia de un amplio abanico de enfermedades autoinmunes. La tolerancia periférica está compuesta por diversos mecanismos que actúan en distintas etapas de la vida de las células del sistema inmune (**Figura 3**), y que están orientados al control de las clonas de linfocitos circulantes con capacidad para reconocer antígenos propios (20,21).

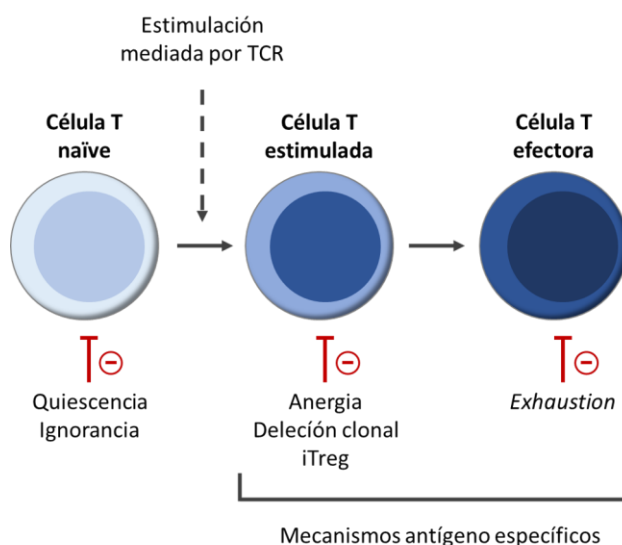


Figura 3. Esquema temporal que ilustra la acción de los distintos mecanismos de tolerancia periférica y las etapas del desarrollo de las células T sobre las cuales actúan preferentemente.

Figura adaptada de ElTanbouly, M. A., & Noelle, R. J. (2020). Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey. *Nature Reviews. Immunology*.

INTRODUCCIÓN

2.1. Ignorancia inmunológica

Este mecanismo está basado en la separación física entre los potenciales autoantígenos restringidos a tejidos periféricos y las células T naïve emergentes del timo. En condiciones normales, las células naïve circulan desde la sangre a los ganglios linfáticos, de los cuales salen a través de vasos linfáticos aferentes, pasando de nuevo a la sangre, en un proceso que las excluye de los tejidos periféricos no linfoides. Este fenómeno es consecuencia de la expresión, entre otras moléculas, de CCR7 y CD62L en la superficie de las células naïve que emigran del timo. Estas moléculas median la entrada de las células T en los ganglios linfáticos a través de las vénulas del endotelio alto, que contienen un epitelio especializado que favorece la extravasación de los linfocitos mediante la producción de la quimiocina CCL21, ligando del receptor CCR7, y la expresión en superficie de carbohidratos reconocidos por la molécula de adhesión CD62L (22,23). Una vez en el ganglio linfático, las células T naïve interactuarán con células presentadoras de antígeno (APC). Los linfocitos T que no reconozcan ningún antígeno y que no reciban señales de activación serán guiadas hacia las zonas de salida del ganglio siguiendo un gradiente creciente de esfingosina-1-P en un proceso mediado por la expresión en su superficie del receptor 1 de la esfingosina-1-P (S1PR1) (24), incorporándose de nuevo a la circulación y repitiendo el proceso. El perfil de expresión de moléculas de adhesión y de receptores de quimiocinas define el patrón de circulación de los linfocitos T naïve, y reduce las posibilidades de que linfocitos autorreactivos que hayan superado los mecanismos de tolerancia central entren en contacto con antígenos restringidos a tejidos periféricos.

El fenómeno de ignorancia inmunológica tiene una especial relevancia en los llamados tejidos inmunoprivilegiados. El privilegio inmune es una adaptación cuyo objetivo es restringir los procesos inflamatorios para reducir el daño tisular asociado, lo que adquiere una especial importancia en tejidos con una capacidad regenerativa reducida. Aunque muchas partes del cuerpo presentan grados variables de privilegio inmune, los tejidos que clásicamente asociados a esta cualidad, y que más se benefician de ella son el ojo, el sistema nervioso central, y el útero durante el embarazo. Mediante una circulación linfática reducida, y una expresión aumentada de distintas proteínas de superficie y solubles con capacidad proapoptótica y antiinflamatoria, como FasL, TRAIL o TGF- β , estos tejidos logran reducir la capacidad del sistema inmune para generar una respuesta inflamatoria local (25).

INTRODUCCIÓN

Otro aspecto que contribuye a la ignorancia inmunológica es la quiescencia, característica inherente a las células T naïve maduras cuyo objetivo es mantener en estas una baja tasa metabólica, atenuar las respuestas a señales tónicas y disminuir su umbral de activación.

Diversos estudios en ratones han logrado identificar y caracterizar muchas de las moléculas y mecanismos de señalización implicados en el establecimiento y mantenimiento del estado de quiescencia de las células T naïve. Así, tras su salida a periferia las células T recientes emigrantes tímicas (RTE) muestran una menor cantidad de mitocondrias y una disminución del área citoplasmática ocupado por estas comparadas con los timocitos SP maduros, como consecuencia, las RTE presentan además una reducción en el metabolismo oxidativo de las mitocondrias medido por la producción de especies reactivas del oxígeno en estas (mROS). Esta reducción del número y de la actividad mitocondrial en RTE es producido por un aumento de los niveles de autofagia, un proceso cuyo aumento es dependiente de la salida a periferia desde el timo de las RTE, y que es regulado en parte por una reducción de la señalización por mTOR1 y la activación de MAPK como JNK, ERK o ASK1 (26).

Las proteínas TGFβ1 y Tob1 se han identificado también como mediadores del estado de quiescencia en células T naïve, en las que actúan alterando la capacidad de activación. Ambas moléculas actúan a través de vías señalización dependientes de SMAD, que tiene como consecuencia un aumento en el umbral de activación, la inhibición de la proliferación dependiente de estimulación, y una reducción en la producción de citocinas como la IL-2, el IFN-γ, o la IL-4 (27,28). La activación de las células T naïve mediante estímulos TCR potentes acompañados de adecuadas señales de coestimulación tiene como consecuencia la reducción de la expresión en el receptor de TGFβ1, Tβ1R, y de la expresión de Tob1, favoreciendo la salida del estado de quiescencia mantenido por su efecto.

El factor transcripción KLF2 ha sido identificado en ratones como otro marcador de quiescencia en células T. Esta proteína actúa a varios niveles, por un lado suprime la proliferación celular al inhibir la síntesis de DNA, bloqueando la fase S del ciclo celular (29), pero también regula la salida de timocitos a periferia mediante la regulación transcripcional de CD62L y S1PR1 (30).

Alteraciones en la expresión de moléculas implicadas en el mantenimiento de la quiescencia como Tβ1R, Tob1 o KLF2 dan lugar en ratones al aumento de las células T efectoras y de memoria y a su activación, favoreciendo además el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes.

El estudio de la quiescencia de los linfocitos T en humanos esta menos desarrollado, a pesar de ello, varios factores que actúan como reguladores de este

INTRODUCCIÓN

proceso en ratones, como KLF2 o Tob1, se ha demostrado que se expresan en células T periféricas en humanos, y que su expresión disminuye tras su activación (31). Este hecho sugiere que algunos de los mecanismos encargados del mantenimiento de la quiescencia en células T naïve murinas se hayan conservado en humanos.

2.2. Mecanismos antígeno específicos

El estado de quiescencia característico de las células T naïve y la limitación de la circulación de estas células por los tejidos periféricos que contribuye al fenómeno de la ignorancia inmunológica, son mecanismos inespecíficos que no dependen de la interacción del TCR de los linfocitos implicados. Existen sin embargo otros mecanismos de tolerancia periférica que son capaces de inhibir de forma antígeno específica a las clonas autorreactivas, y que dependen de la señalización a través del TCR.

La activación de las células T requiere no solo la presentación de un antígeno a través de una molécula adecuada de HLA, sino que esta señal debe de ir acompañada de una serie de estímulos adicionales para que dé lugar a una respuesta productiva. Tanto la intensidad de la estimulación vía TCR como el tipo de señales accesorias necesarias dependerán a su vez del estado madurativo y funcional de la célula T diana, siendo estos requerimientos distintos, por ejemplo, en el caso de células naïve o efectoras.

La ausencia o variación de cualquiera de estas señales puede dar como resultado la inducción de distintos mecanismos de tolerancia periférica.

2.2.1. Interacción con células presentadoras de antígeno tolerogénicas

Las principales APC encargadas de la presentación de antígenos a las células T naïve son las células dendríticas (DC). Estas células circulan por los tejidos periféricos captando antígenos solubles o cuerpos apoptóticos y necróticos mediante procesos de macropinocitosis o fagocitosis, respectivamente. Las células dendríticas procesan estos antígenos y, en su paso por los órganos linfoides secundarios, presentan estos en superficie mediante moléculas HLA de clase I o de clase II, pudiendo activar así de forma antígeno específica a células T CD4 o CD8.

Si bien este mecanismo de procesamiento y presentación antigénica es constitutivo en las DC y se produce de forma continua sin necesidad de ser

INTRODUCCIÓN

inducido, en su estado basal estas carecen de la expresión de moléculas coestimuladoras necesarias para producir una respuesta efectiva por parte de los linfocitos T. Es necesario que el proceso de presentación antigénica se acompañe de la presencia de indicadores de infección (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) o daño tisular (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) que puedan unirse a sus respectivos receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors*, PRRs), lo cual desencadenará la maduración de las DC promoviendo la expresión de moléculas coestimuladoras, la secreción de citocinas proinflamatorias, y aumentará la migración a órganos linfoides secundarios, todo ello necesario para la correcta estimulación de células T de forma antígeno específica.

En ausencia de situaciones potencialmente patogénicas el procesamiento continuo por parte de las DC quedará limitado casi por completo a antígenos propios, por lo que las células T que sean capaces de reconocerlos cuando estos sean presentados a través de moléculas HLA serán, en la mayor parte de los casos, células autorreactivas. En estas situaciones se ha demostrado mediante diversos modelos animales que la presentación de antígenos por parte de DC inmaduras puede tener un efecto tolerogénico. Estas DC inmaduras son capaces de activar las células T de manera transitoria e incompleta, lo que se caracteriza por una inducción inicial de la proliferación que es rápidamente autolimitada, y una secreción deficiente de citocinas proinflamatorias. Además, a diferencia de la presentación antígeno específica llevada a cabo por DC maduras, las presentación mediada por DC tolerogénicas induce en las células T la incapacidad de responder de nuevo tras una reestimulación con el mismo antígeno (32,33).

La activación de linfocitos T mediada por DC tolerogénicas puede producir sobre los primeros tres posibles desenlaces: inducción de un estado anérgico, deleción clonal de las células estimuladas, o la diferenciación de estas a células T reguladoras inducibles (iTreg). A pesar de que las posibles consecuencias directas sobre las células implicadas son muy distintas, el fin último de todos ellos es el mantenimiento de la tolerancia periférica.

2.2.1.1. Anergia

El estado de anergia de las células T se define como el resultado directo de una activación antígeno específica en ausencia de señales adecuadas de coestimulación, lo que tiene como consecuencia en última instancia la pérdida de la capacidad de respuesta frente a una reestimulación. Durante los momentos iniciales de la estimulación tolerogénica la célula T sufre cambios propios de una

INTRODUCCIÓN

activación antígeno específica, como el aumento de expresión del receptor de la IL-2 o el aumento intracelular celular de calcio. Como ya comentamos anteriormente, a pesar de ello estas células se caracterizan por una producción deficiente de distintas citocinas, especialmente de IL-2, necesaria para el mantenimiento de la proliferación de los linfocitos y su diferenciación tras la estimulación. Este fenómeno parece ser dependiente de una transactivación inadecuada del factor de transcripción AP-1, que podría producirse como consecuencia de una señalización defectuosa de las vías JNK y ERK (34). La falta de respuesta causada por el estado de anergia puede ser mantenido en el tiempo, aunque la ausencia del antígeno desencadenante durante un período de tiempo suficiente, o la reestimulación bajo ciertas condiciones, como en presencia de cantidades adecuadas de IL-2, pueden favorecer la recuperación de la funcionalidad de estas células (35,36).

2.2.1.2. Delección clonal

La muerte celular es otra de las posibles consecuencias que pueden sufrir las células T naïve como resultado de una estimulación deficiente en señales coestimuladoras adecuadas. La delección clonal y la inducción de la anergia no son mecanismos mutuamente excluyentes, y normalmente ambos ocurren de forma simultánea sobre una población de células T sometidas al mismo estímulo tolerogénico. Una vez las células son activadas de forma antígeno específica, estas comienzan un proceso de proliferación autolimitado, tras un breve período de tiempo una pequeña proporción de las células inicialmente estimuladas entrarán en un estado anérgico, mientras que la mayoría de ellas sufrirán un proceso de delección clonal que contribuirá a la contracción de la respuesta celular T inicial. Aún se desconocen las condiciones exactas que determinarán que células iniciarán un proceso de muerte celular o cuales entrarán en un estado de anergia, sin embargo, uno de los factores implicados en la inducción de la muerte celular podría ser la señalización en las células T a través del receptor de membrana VISTA (*V-type immunoglobulin domain-containing suppressor of T-cell activation*). Esta molécula pertenece al grupo de los *negative checkpoint regulators* (NCRs), receptores que participan en la inhibición de las respuestas T. Mientras que el resto de las moléculas pertenecientes a este grupo se expresan principalmente en linfocitos T activados, VISTA se caracteriza por su expresión en las células T naïve. Modelos murinos deficientes para la expresión de VISTA mostraron un aumento basal del porcentaje de células T CD4 con fenotipo de efector y de memoria, además de un aumento de la proliferación en respuesta a

INTRODUCCIÓN

la estimulación antígeno específica o mediada por anticuerpo anti-CD3, lo que sugiere que esta molécula tiene un papel importante en el mantenimiento de la quiescencia que caracteriza a las células T naïve. Sin embargo, un trabajo reciente estudió la posible implicación de esta molécula en la susceptibilidad en linfocitos T a la muerte celular inducida por estímulos tolerogénicos. Células CD4 generadas en ratones *wild type* y en ratones VISTA^{-/-} fueron transferidas en proporción 1:1 a ratones Rag^{-/-}, a los que más tarde se les administró anticuerpo estimulante anti-CD3, que en ausencia de coestimulación emula la señalización tolerogénica antígeno específica, o un anticuerpo monoclonal de control. En ausencia de estimulación el ratio de células VISTA^{-/-} y *wild type* se mantuvo constante, sin embargo, tras la estimulación mediante anti-CD3 la mayor parte de las células CD4 recuperadas de estos animales eran VISTA^{-/-}. Estos resultados sugieren que VISTA tiene un papel importante en la susceptibilidad a la muerte celular inducida por la estimulación vía TCR (37).

2.2.1.3. Generación de células T reguladoras inducibles (iTreg)

El concepto de las células T con capacidad inmunosupresora se conoce desde la década de 1970. Estas células, más tarde denominadas células T reguladoras (Treg), se describieron inicialmente como una subpoblación de células CD4 de origen tímico que se caracterizaban por su capacidad para suprimir respuestas autoinmunes (19,38,39), sobre las que se entrará en detalle más adelante. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que se puede inducir en periferia la diferenciación de linfocitos T CD4 convencionales a células con capacidad inmunorreguladora (40), denominándose estas células T reguladoras inducibles (iTreg), para diferenciarlas aquellas originadas en el timo, y conocidas como células T reguladoras naturales (nTreg).

Mediante estudios en modelos animales se demostró que la diferenciación a células iTreg es otra de las posibles respuestas de las células CD4 naïve a la estimulación en condiciones tolerogénicas. La administración por vía intravenosa de OVA, pero no de OVA junto a LPS como adyuvante, en ratones transgénicos DO.11.10/RAG2^{-/-} produjo la aparición en periferia de una población de células CD4⁺CD25⁺ detectable durante las semanas posteriores a la estimulación. En cultivo, estas células CD4⁺CD25⁺ generadas mediante la administración tolerogénica de OVA tenían una capacidad reducida de producción de IL-2 en respuesta a la reexposición al antígeno, además de ser capaces de reducir la producción de IL-2 por parte de las células T convencionales en un proceso independiente de la especificidad de su TCR (41). Trabajos posteriores

demonstraron que la presentación antigénica por DC inmaduras en un contexto tolerogénico puede inducir la generación de iTreg *in vivo*, las cuales se caracterizaban por expresar CD25, CTLA-4 y FoxP3, y ser capaces de inhibir en cultivo la proliferación de linfocitos T convencionales (42,43).

2.2.2. Células T reguladoras (Treg)

Las Treg fueron inicialmente identificadas como células T CD4+CD25+ (39,44), aunque más adelante se demostró que esta subpoblación celular se caracterizaba además por la expresión de FoxP3 (45,46), un factor de transcripción imprescindible para su desarrollo, ya que mutaciones que afectan a esta proteína producen en humanos el síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía ligado al X (IPEX), en el cual un desarrollo defectuoso de las células T reguladoras da lugar a una clínica compleja que incluye múltiples manifestaciones autoinmunes (47,48).

Al contrario de las células iTreg cuyo desarrollo se explica más arriba, las células nTreg se originan en el timo. Estas células se originan a partir de los timocitos DP, aunque la mayor parte de las señales que favorecen su desarrollo como células Treg parecen darse principalmente durante su etapa como timocitos CD4 SP, siendo seleccionadas preferiblemente de entre aquellas células que presentan TCRs autorreactivos de alta afinidad (19,49). A pesar de las diferencias en su origen y mecanismos de desarrollo, tanto nTreg como iTreg poseen la capacidad de suprimir la activación de otros linfocitos a través de mecanismos comunes a ambas, y que se pueden agrupar en cuatro categorías: producción de citocinas antiinflamatorias, depleción de IL-2, supresión mediante citólisis, y supresión por modulación de la respuesta de DC. A pesar de que estos mecanismos actúan de forma parcialmente solapada, la delección o alteración de uno solo de ellos suele afectar de manera significativa a la actividad de las Treg (50).

El primero de los mecanismos de acción no dependiente de contacto es la producción de citocinas antiinflamatorias, las más comúnmente asociadas a la acción inmunosupresora de las Treg son la IL-10, el TGFβ y la IL-35. Aunque la relevancia de cada una de ellas se ha discutido ampliamente, y su importancia en el control de la respuesta inmune parece variar en función del contexto en el que estas se produzcan. Su capacidad inhibidora independiente de contacto directo parece no depender exclusivamente de la producción de citocinas, su alta expresión de CD25, el cual forma parte de los receptores de baja y alta afinidad de la IL-2, confiere a estas células una elevada capacidad para captar IL-2 que tiene como consecuencia una reducción de esta citocina en el medio. La

INTRODUCCIÓN

disminución de la disponibilidad de IL-2 en el medio que tiene como consecuencia parece favorecer la apoptosis de las células T convencionales. Mediante distintos cultivos se demostró que este proceso podría estar mediado por Bim, ya que células T convencionales deficientes para esta proteína eran resistentes a la muerte producida por la privación *in vitro* de IL-2 por células Treg (51).

Adicionalmente, mediante experimentos *in vitro* se ha demostrado que las Treg humanas son capaces de producir mediante citotoxicidad la muerte de otras células del sistema inmune de forma contacto dependiente. Mediante el uso de inhibidores específicos se pudo confirmar que esta capacidad citolítica es en ambos casos dependiente del efecto de perforina expresada por las Treg, pero independiente de la señalización FasL-Fas. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual este proceso se hace lleva a cabo y las células diana del mismo parecen diferir entre las dos poblaciones principales de Treg. Tras su activación *in vitro*, las células iTreg expresan GranzB pero no GranzA, y son capaces de ejercer un efecto citotóxico sobre células T previamente activadas, monocitos, y especialmente sobre DC inmaduras diferenciadas *ex vivo*. En el caso de células nTreg, tras su activación estas expresaban GranzA pero no GranzB, y aunque al igual que las iTreg son capaces de producir *in vitro* la citólisis de células T convencionales activadas y de monocitos, el número de células necesarias para alcanzar el mismo porcentaje de muerte celular en las células diana es mucho menor (52). La interacción dependiente de contacto de las Treg puede producir además la modulación de la respuesta de las DC mediante mecanismos que no requieren su eliminación mediante un efecto citotóxico. Mediante el uso de células de ratón se ha demostrado *in vitro* que la estimulación mediada por CTLA-4 en la superficie de las Treg al unirse a CD80 y CD86 expresado en DC aumenta la expresión en estas últimas de IDO, enzima limitante en el catabolismo del triptófano, y cuya acción tiene un efecto supresor sobre otras células del sistema inmune. La interacción Treg-DC mediada por CTLA-4 produce además cambios en la capacidad coestimuladora de las células dendríticas sobre células T convencionales, lo cual se relacionó con una disminución en la expresión de CD80/CD86 previa en las DC (53,54). En experimentos posteriores se demostró que la maduración de DC podía ser inhibida de forma contacto-dependiente por Tregs mediante la unión de LAG-3, altamente expresado en su superficie, a moléculas HLA de clase II en la superficie de células dendríticas. Este fenómeno dependía de la señalización producida por HLA de clase II en DC, pero era independiente de la señalización interna en Tregs por la unión de LAG-3, como se demostró utilizando células T LAG-3^{-/-} transfectadas con un retrovirus

INTRODUCCIÓN

portador de un gen codificante para LAG-3 truncado que carecía del dominio citoplasmático encargado de la señalización (55).

2.2.3. Exhaustion

El término de *exhaustion* hace referencia a un estado disfuncional, principalmente que afecta a las células T, y que se produce como consecuencia de una estimulación antígeno-específica prolongada en el tiempo (56,57). Este estado fue inicialmente descrito en un modelo de infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) en ratones, en el cual la inoculación de dos variantes distintas del virus denominadas Armstrong y Clone 13, producen una infección de curso agudo y crónico, respectivamente (58). Los ratones que sufrían una infección aguda fueron capaces de eliminar el virus, tras lo cual sus esplenocitos conservaron la capacidad citolítica y de producción de IFN- γ en respuesta a la reexposición a células infectadas por el LCMV. Por el contrario, ratones con un curso crónico de la infección fueron incapaces de eliminar el virus, y sus esplenocitos carecían de la capacidad de respuesta frente a células infectadas por LCMV. La ausencia de este tipo de respuesta, característica de células CD8, era además acentuada por la ausencia de células CD4 (59,60).

Estudios posteriores describieron la expresión de PD-1, y de otros receptores inhibidores entre los que se encuentran LAG-3, 2B4 o CD160, como marcadores de superficie característicos de células CD8 disfuncionales diferenciadas en un contexto de estimulación crónica (61,62). En pacientes infectados por VIH se demostró que las células T específicas frente a antígenos del virus presentaban una alta expresión de PD-1, y que estas presentaban una menor capacidad de proliferación. Se observó además que existía una correlación positiva entre la expresión de PD-1 en las células T y la carga viral. De forma adicional se demostró que la incubación *in vitro* de CMSPs procedentes de estos pacientes en presencia de péptidos virales y en combinación con anticuerpos bloqueantes de la señalización de PD-1 era capaz de aumentar la proporción de células CD8 antígeno específicas, así como la producción de IFN- γ por parte de ellas (63,64). A pesar de esto, los linfocitos T pueden expresar de forma transitoria receptores inhibidores en distintos momentos tras la activación antígeno-específica, incluso si esta se da en condiciones favorables para la generación de una correcta respuesta inmunitaria. La presencia de estos receptores no es exclusiva de un estado de *exhaustion*, pero la señalización a través de ellos puede promover su establecimiento y mantenimiento posterior (65,66).

INTRODUCCIÓN

La señalización por parte de ciertas citocinas solubles contribuye también al desarrollo de un estado de *exhaustion* en las células T. En ratones con infección crónica por la variante Clon 13 de LCMV se observó un aumento de la expresión esplénica de IL-10 en comparación con los ratones infectados con la cepa Armstrong. La deleción genética de la IL-10 en el modelo de infección crónica incrementaba el número de células CD4 y CD8 específicas frente a antígenos del virus, y estas mantenían además niveles de producción de TNF α e IL-2 y actividad citotóxica similares a los observados durante la infección aguda. En un estudio posterior se demostró que el efecto de la IL-10 sobre la generación de células con un fenotipo disfuncional era independiente de la señalización mediada por el receptor inhibidor PD-1, sin embargo sus efectos eran sinérgicos, y el bloqueo conjunto de ambas señales aumentaba significativamente el número de células antígeno específicas y su capacidad efectora (67,68). El TGF β también contribuiría a este proceso, empleando el mismo modelo animal se observó que ratones deficientes para la señalización mediada por esta citocina presentaban un mayor número de células T específicas frente al virus LCMV, lo permitió eliminar la infección de manera más precoz y efectiva (69).

A pesar de que inicialmente la investigación sobre este estado de disfuncionalidad se centró en las células CD8 por su papel en la eliminación y control de infecciones de origen vírico, estudios posteriores confirmaron que este mismo estado de “extenuación” puede inducirse de forma análoga en linfocitos CD4 sometidos a una estimulación crónica antígeno-específica (70,71). Múltiples estudios realizados durante los últimos años han contribuido a redefinir el conjunto de las células T *exhausted* (Tex) como una población fenotípica y funcionalmente diferenciada de las células T efectoras o T de memoria. Se ha demostrado que las células Tex se pueden diferenciarse por presentar una combinación única de características: (a) una pérdida progresiva de funciones efectoras y capacidad proliferativa, (b) alta expresión mantenida de múltiples receptores inhibidores, (c) respuesta deficiente a la señalización mediada por IL-7 e IL-15, y que es necesaria para el mantenimiento homeostático de las células T de memoria, (d) alteraciones del metabolismo, (e) patrón de expresión de factores de transcripción propio y diferenciado del presente en células T efectoras o de memoria, y (f) una regulación epigenética distinta de las células T efectoras y de memoria (72).

El estudio del estado de *exhaustion* tras su descripción inicial fue llevado a cabo principalmente en el contexto de infecciones víricas de carácter crónico tanto en modelos animales como en humanos, sin embargo, la disfuncionalidad característica de las células Tex se puede encontrar en otras situaciones. Se observó que uno de los mecanismos por los cuales distintos tipos de cáncer son

INTRODUCCIÓN

capaces de evadir el sistema inmune es la inducción de un estado de *exhaustion* en las células que infiltran el tumor (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) (73,74). Las células Tex en infecciones víricas crónicas y en el microambiente tumoral comparten la mayor parte de las características fenotípicas y funcionales, estas últimas también expresan de forma estable una gran variedad de correceptores inhibidores y presentan una disminución en su capacidad para producir citocinas proinflamatorias como IL-2, TNF α o IFN- γ . A pesar de ello las células Tex en ambas situaciones muestran ciertas diferencias, por ejemplo, en el patrón de expresión de sus correceptores inhibidores o en su perfil de factores de transcripción, lo que sugiere que el estado de *exhaustion* podría presentar cierta plasticidad influenciada por el microambiente (75).

Este mecanismo de tolerancia podría tener un papel importante en la prevención del daño tisular secundario a procesos inflamatorios, como se demuestra en un estudio en el cual ratones WT tratados con un anticuerpo bloqueante anti-PD-L1 o ratones KO Pcd1^{-/-}, pero no los correspondientes controles, morían como consecuencia de daño tisular sistémico días después de una infección por LCMV administrado por vía intravenosa (76).

2.3. Limitación de las interacciones T-B

Como ya comentamos anteriormente, debido a la eficacia parcial de los mecanismos de tolerancia central, hasta un 40% de los linfocitos B maduros que abandonan la médula ósea y se incorporan a la circulación periférica pueden llegar a reconocer antígenos propios. La activación de estos linfocitos autorreactivos en los centros germinales puede dar lugar a su diferenciación en células plasmáticas y a la producción de autoanticuerpos, que podrán participar en la aparición de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, esta activación requiere no solo el reconocimiento del antígeno a través de su BCR, sino la colaboración mediante señales coestimuladoras de células T activadas previamente también de forma antígeno específica.

Si bien los mecanismos de tolerancia periférica expuestos hasta el momento afectan principalmente a los linfocitos T, esto unido al hecho de que la tolerancia central a los que estos están sometidos tiene una mayor eficiencia en la eliminación clonal de células autorreactivas, supone un paso limitante en la activación de los linfocitos B en los órganos linfoides secundarios. De esta manera, debido a la existencia de múltiples mantienes la tolerancia T a diversos niveles, la mayor parte de los clones B autorreactivos que consigan evadir los

INTRODUCCIÓN

mecanismos de tolerancia central y que recirculen por los órganos linfoides secundarios, carecerán de los estímulos necesarios para su activación.

FALLO DE LOS MECANISMOS DE TOLERANCIA Y AUTOINMUNIDAD

Las enfermedades autoinmunes comprenden más de 80 patologías diferentes que afectan a aproximadamente el 5-9% de la población, y que tienen, por lo general, una mayor prevalencia en mujeres que en hombres (77). Estas enfermedades pueden afectar a la casi totalidad de los tejidos, y se clasifican según el tipo de afectación que producen en enfermedades sistémicas, como el lupus eritematoso (SLE), o la artritis reumatoide (RA), u órgano-específicas, como la diabetes tipo I (T1D), o la enfermedad de Graves.

La principal causa del desarrollo y perpetuación de estas enfermedades es la presencia de defectos en la eliminación y control de los linfocitos autorreactivos. Existe un pequeño número de entidades descritas en las que estos defectos están causados por mutaciones monogénicas, sin embargo, la mayor parte de las enfermedades autoinmunes son trastornos complejos que requieren de la combinación de múltiples factores genéticos y ambientales (78).

1. Enfermedades autoinmunes monogénicas

Este grupo comprende un pequeño número de patologías raras, pero que han resultado cruciales para entender algunos de los mecanismos implicados en la tolerancia inmunológica, y como fallos puntuales en estos pueden contribuir a la patogénesis de la autoinmunidad (79).

En este contexto, defectos en la regulación del sistema inmune innato tienden a producir síndromes autoinmunes de afectación predominantemente sistémica. Un claro ejemplo es el déficit de C1q, esta enfermedad de herencia autosómica recesiva se caracteriza por infecciones recurrentes por bacterias encapsuladas y la aparición de manifestaciones autoinmunes similares al SLE en la mayor parte de los pacientes (80). Se ha propuesto que defectos en C1q, que forma parte de la vía clásica del complemento, tendrían como consecuencia una eliminación inadecuada de material apoptótico y una acumulación de inmunocomplejos, lo que favorecería la disponibilidad de potenciales autoantígenos capaces de generar respuestas autorreactivas (81).

INTRODUCCIÓN

La alteración del sistema inmune adaptativo suele dar lugar a la aparición de manifestaciones órgano específicas. Dos de las enfermedades más representativas de este grupo son el síndrome poliglandular autoinmune tipo 1 (APECED) y el síndrome de inmunodeficiencia, poliendocrinopatía y enteropatía ligado a X (IPEX), en los cuales se ven afectadas principalmente la tolerancia central y periférica, respectivamente. El APECED se caracteriza por múltiples manifestaciones autoinmunes órgano-específicas, siendo las más comunes el hipoparatiroidismo, la insuficiencia adrenal, la diabetes tipo 1 o la tiroiditis, aunque el espectro clínico de la enfermedad puede ser muy variable incluso en hermanos portadores de la misma mutación (82). Este síndrome de herencia autosómica recesiva está causado por mutaciones en el gen AIRE (83), que regula la expresión promiscua de antígenos restringidos a tejidos en las mTECs presentes en el timo. Defectos en el factor de transcripción codificado por este gen que tienen como consecuencia un proceso de selección negativa de los timocitos defectuoso, lo que da lugar a un aumento de la cantidad de linfocitos T autorreactivos en circulación. En el caso del síndrome IPEX los síntomas más característicos son la diarrea, la diabetes tipo 1 y las manifestaciones cutáneas, aunque también es común la tiroiditis autoinmune (84). La causa de esta enfermedad son defectos en el gen que codifica para el factor de transcripción FoxP3, marcador de las células Treg y necesario para que estas ejerzan su papel inmunosupresor como parte de los mecanismos de tolerancia periférica (47,48).

2. Enfermedades autoinmunes de herencia no mendeliana

La existencia de enfermedades autoinmunes monogénicas demuestra que fallos en uno solo de los mecanismos implicados en el mantenimiento de la tolerancia es suficiente para desencadenar una respuesta autorreactiva frente a diferentes antígenos propios. Sin embargo, las enfermedades autoinmunes más frecuentes no pueden explicarse por mutaciones en un único gen, y se considera que su patogenia se debe a una combinación de factores genéticos y ambientales que afectarían a distintos mecanismos implicados en el mantenimiento de la tolerancia, dando lugar a un proceso acumulativo que tendría como última consecuencia la aparición de la autoinmunidad (85,86).

Los estudios de concordancia en gemelos idénticos (87), de segregación familiar, y los más recientes estudios de GWAS han demostrado que el factor que más contribuye a la etiología de las enfermedades autoinmunes es el genético (88). Sin embargo, el hecho de que múltiples polimorfismos puedan asociarse a distintas enfermedades autoinmunes, y que estas tienden a coexistir dentro de

INTRODUCCIÓN

núcleos familiares más frecuentemente de lo esperado por la prevalencia individual de cada una de ellas en la población general, indicaría que existen mecanismos patogénicos comunes entre distintas enfermedades autoinmunes (89,90).

Se han identificado cientos de loci de riesgo implicados en la patogenia de estas enfermedades, y en su mayoría los polimorfismos descritos afectan a la expresión de genes relacionados con el sistema inmune. La asociación más clara es la de los genes HLA, pudiendo atribuirse a algunos de sus haplotipos hasta un 50% de la heredabilidad de las enfermedades autoinmunes, como es el caso del haplotipo 8.1 (HLA-B8, DR3, DQ2), que se asocia a diabetes tipo 1, celiaquía, SLE y enfermedad de Graves. Otros genes comúnmente asociados a diversas patologías son PTPN22, CTLA4, IL23R y TYK2. Se considera que los polimorfismos asociados a las enfermedades autoinmunes podrían actuar a distintos niveles, por ejemplo, disminuyendo la eficacia de los procesos de selección negativa a determinados antígenos o alterando los umbrales de respuesta de los linfocitos a distintas vías de señalización. Sin embargo, debido a que el riesgo asociado a la mayoría de las variantes conocidas es muy reducido, es difícil saber con exactitud como contribuye cada una de ellas a la pérdida de tolerancia frente a antígenos propios.

Entre los factores ambientales que se sospecha pueden intervenir en la patogenia de las enfermedades autoinmunes, el más estudiado es la infección por distintos microorganismos. En muy pocos casos se ha podido demostrar la relación de causalidad entre una determinada infección y la aparición de una patología autoinmune, como es el caso de las infecciones por *Streptococcus pyogenes* y la fiebre reumática. Distintas infecciones se han asociado con la aparición de determinadas enfermedades autoinmunes, como las infecciones víricas crónicas por CMV y la diabetes de tipo 1, o las infecciones por EBV y el lupus eritematoso sistémico (SLE), la artritis reumatoide (AR) o la esclerosis múltiple (MS). Aunque en la mayoría de estos casos no se ha podido establecer una relación directa en humanos, y las pruebas empíricas obtenidas hasta la fecha provienen de modelos animales. Las infecciones causadas por estos patógenos podrían contribuir a la aparición de respuestas autorreactivas mediante distintos mecanismos. Entre estos se encuentran el mimetismo molecular, mediante el cual linfocitos activados de forma específica frente al patógeno presentan reactividad cruzada con antígenos propios; el *epitope spreading*, proceso en el que el daño tisular producido directa o indirectamente por la infección liberaría antígenos propios que podrían ser captados y presentados por APCs; o la *bystander activation*, en el que el microambiente proinflamatorio produciría una activación inespecífica de células autorreactivas (91,92). Adicionalmente se ha descrito una posible

INTRODUCCIÓN

asociación entre determinadas alteraciones de la microbiota normal con la aparición de ciertas enfermedades como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn o la diabetes de tipo 1 (93). En relación con este hecho se enunció la hipótesis de la higiene, según la cual una reducción en la exposición a agentes infecciosos unida a la mejora en la calidad de vida favorecería los procesos de disbiosis asociados a determinadas enfermedades autoinmunes, lo que explicaría el aumento de su incidencia en los países occidentales (94). Otros factores ambientales se han relacionado con un aumento de la incidencia de algunas enfermedades autoinmunes, como el consumo de tabaco y el desarrollo de LES o AR, o la exposición a la luz UV con el LES o la AR (95).

La incidencia de la mayor parte de las enfermedades autoinmunes presenta además un claro dimorfismo sexual (96). El efecto de las hormonas sexuales sobre el sistema inmune sería uno de los factores principales. Se sabe que los estrógenos tienen la capacidad de modificar la expresión de diversas proteínas del sistema inmune como citocinas inflamatorias, moléculas implicadas en la señalización de los TLRs, o incluso el factor de transcripción AIRE, reduciendo su expresión en el epitelio tímico. Esta hipótesis está apoyada por diversos estudios en los cuales se ha observado que las diferencias entre sexos en la incidencia de determinadas enfermedades autoinmunes como la MS o el SLE aparecen tras la pubertad, pero son muchos menores o no existen antes de esta etapa del desarrollo (97,98). El efecto directo de la carga genética presente en el cromosoma X podría ser otro factor determinante. Este efecto podría explicarse por defectos en la inactivación del segundo cromosoma X en las mujeres o la pérdida de mosaicismo posterior, lo que podría tener como consecuencia cambios en la expresión de genes codificados en esta región y relacionados con el sistema inmune como aquellos que codifican para el TLR7, BTK, CD40L, o el factor de transcripción FoxP3.

ETIOPATOGENIA EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES (EG)

1. Etiología de la enfermedad de Graves (EG)

La enfermedad de Graves presenta de forma general los principales componentes etiológicos antes expuestos para el conjunto de las enfermedades autoinmunes (99). La combinación de factores ambientales y genéticos contribuye a una

INTRODUCCIÓN

pérdida de tolerancia frente a antígenos propios que da lugar a la aparición de esta enfermedad.

En el caso particular de esta patología algunos de los factores ambientales relacionados con ella hasta la fecha son el tabaco, el estrés, la ingesta de yodo en la dieta, o el uso de ciertos fármacos como la amiodarona o el IFN α (100–103). Sin embargo, uno de los factores ambientales más estudiados es la infección por distintos patógenos como desencadenante de la enfermedad (104). Un estudio poblacional realizado en Reino Unido observó una tendencia a la estacionalidad en el diagnóstico y la aparición de los primeros síntomas en pacientes con la EG, lo que podría apoyar la hipótesis de la contribución de determinadas infecciones como desencadenantes (105). Las patógenos que se han relacionado con la aparición de la EG son la *Yersinia enterocolitica*, el *Helicobacter pylori*, el Coxsackie B, o el virus de la hepatitis C (VHC). Como ya se comentó anteriormente para el resto de las enfermedades autoinmunes, los principales mecanismos por los cuales se piensa que estas infecciones pueden llegar a desencadenar la EG son el mimetismo molecular y la *bystander activation*, aunque no se ha podido demostrar para ninguna de ellas.

Mediante el estudio de la incidencia de la EG en hermanos gemelos de un cohorte danés se ha calculado que en el caso de esta patología el componente genético es responsable de aproximadamente el 80% de la heredabilidad, mientras que solo el 20% depende de los factores ambientales antes citados (106). La principal región génica asociada a la susceptibilidad a esta enfermedad es la correspondiente a los genes MHC, siendo el alelo HLA-DR3 el que otorga un mayor riesgo, presentando un *odds ratio* de 4 (107). El mecanismo por el que un determinado alelo predispone a la aparición de alguna enfermedad autoinmune parece estar relacionado con la secuencia de aminoácidos que codifica para el surco encargado de alojar el péptido que va a ser presentado a las células T durante una respuesta inmune. Cambios específicos en determinados aminoácidos favorecerían una mejor presentación de autoantígenos concretos, aumentando la activación periférica de células autorreactivas. Existen otros genes que participan directamente en vías de señalización implicadas en la activación de los linfocitos, como los que codifican para CD40, CTLA-4 o la fosfatasa LYP (*lymphoid tyrosine phosphatase*), y que se han asociado a la aparición de la EG (108–110). Los polimorfismos de riesgo también favorecerían la activación de los linfocitos autorreactivos, bien por una disminución de su umbral de activación, o por una inhibición deficiente de esta tras la presentación antigénica. Otro grupo de genes asociados a la EG son aquellos específicos del tiroides, que incluye los genes codificantes para el TSH-R y la tiroglobulina. De ellos dos, el gen de la TSHR es el que determina una mayor susceptibilidad a la

INTRODUCCIÓN

enfermedad, la cual depende principalmente de la presencia del alelo de riesgo rs179247 localizado en el intrón 1 (111). Aunque el mecanismo mediante el cual este polimorfismo confiere una mayor susceptibilidad a la EG se desconoce, existen dos hipótesis al respecto. Se ha demostrado que la presencia del SNP de riesgo determina una menor expresión de TSHR en el timo, pero no en el tiroides, por lo que podría disminuir el proceso de tolerancia central frente al receptor de la TSH, favoreciendo así el desarrollo de la EG. La segunda teoría propone que la presencia de este alelo incrementaría la transcripción de las isoformas solubles ST4 y ST5 de la proteína. Estas isoformas tendrían una capacidad inmunogénica superior a la proteína completa, lo que incrementaría la activación de células autorreactivas, disminuyendo la eficacia de los mecanismos de tolerancia periférica (112,113).

Además de los citados hasta el momento, existen distintos genes asociados a la EG cuya contribución a la susceptibilidad genética es bastante menor, como es el caso de los polimorfismos presentes en los genes que codifican para PD-L1 (OR = 1,46-2,79, según la población), y para su receptor, PD-1 (OR = 1,14) (114–116).

Como ya hemos comentado, las enfermedades autoinmunes son entidades complejas, en las que se desconoce en la mayor parte de las ocasiones el agente desencadenante y como los distintos polimorfismos afectan a los mecanismos de tolerancia implicados. En el caso concreto de las EAT, estudios recientes sugieren un papel destacado del eje de señalización formado por PD-1 y por sus ligandos en la etiopatogenia de estas enfermedades.

2. PD-L1/PD-1: relación con manifestaciones autoinmunes en el tiroides

2.1. Descubrimiento y características generales

La expresión del mRNA de PD-1 se describió inicialmente en líneas celulares de origen linfóide y en timocitos de ratón asociada a la inducción de muerte celular programada producida como consecuencia de la estimulación *in vitro* (117). Experimentos posteriores demostraron que dicho mRNA codificaba para un receptor de superficie perteneciente a la familia del CD28. Su estructura estaba compuesta por un dominio extracelular perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, una región transmembrana, y una cola citoplasmática que contiene un dominio inhibitorio ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) y un dominio ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*), y que este se expresaba principalmente en la superficie de linfocitos B y T de tras su activación, siendo su expresión mínima en ausencia de estimulación.

INTRODUCCIÓN

Mediante el uso de cepas de ratón deficientes para PD-1 se confirmó el papel supresor de la respuesta inmune de esta molécula, presumiblemente dependiente de los motivos ITIM e ITSM presentes en su región citoplasmática. La delección de PD-1 producía la infiltración de linfocitos con fenotipo de memoria en los tejidos, y la aparición de diversas manifestaciones autoinmunes. El déficit de PD-1 no afectaba al proceso de selección negativa en el timo, lo que indicaba que su función inmunomoduladora se producía preferentemente en periferia (118,119).

Los ligandos naturales para PD-1 descritos hasta el momento son PD-L1 y PD-L2, ambos pertenecientes a la familia de ligandos B7 y denominados también B7-H1 y B7-DC, respectivamente. Debido a su homología con los ligandos CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) el estudio de la expresión de PD-L1, primer ligando de PD-1 descubierto, se realizó inicialmente en monocitos y células dendríticas humanas. PD-L1 no se expresaba en ninguna de estas subpoblaciones celulares en ausencia de estimulación, sin embargo, esta era inducida tras el tratamiento con IFN- γ . Se observó además que la unión de PD-L1 a su receptor en la superficie de células T era capaz de inhibir la proliferación y la producción de citocinas mediada por la estimulación *in vitro* con anticuerpos anti-CD3, confirmando así el papel inhibidor de PD-1 en la señalización mediada por TCR en linfocitos T (120). De forma similar, PD-L2 se expresaba en monocitos estimulados con IFN- γ , y la señalización mediada por su unión inhibía la proliferación y la producción de citocinas en linfocitos T previamente estimulados. La unión de cualquiera de sus ligandos a PD-1 produce la fosforilación de su dominio ITSM, que a su vez recluta y activa a las fosfatasas SHP-1 y SHP-2, cuyo acción produce la inhibición de la señalización iniciada por el complejo del TCR (121–123). En tejidos periféricos la mayor expresión de ambos ligandos se observó en órganos linfoides como el timo, el bazo o ganglios linfáticos, aunque también se detectaron niveles menores de expresión en otros órganos no linfoides como riñón, páncreas, hígado o corazón.

2.2. Inmunoterapia bloqueadora de la vía PD-1/PD-L1

Inicialmente PD-1 se asoció a las etapas tempranas de la activación tras la estimulación vía TCR en linfocitos T, pero como ya se comentó anteriormente, en años posteriores una alta expresión mantenida de este receptor también se asoció en células CD4 y CD8 a un estado “exhaustion”, que se caracteriza por una reducción de sus funciones efectoras y de su capacidad proliferativa. Ya el trabajo de Latchman et al., en el que describieron por primera vez PD-L2, sugería un posible papel de esta vía de señalización en la inmunidad tumoral al detectar la expresión de ambos ligandos de PD-1 en distintas líneas tumorales (121). Sin

INTRODUCCIÓN

embargo, no fue hasta unos años después cuando su estudio adquirió gran relevancia tras observarse que las poblaciones de linfocitos T que infiltraban multitud de tumores, y cuyo fenotipo coincidía con el estado de “extenuación” descrito previamente, solían presentar una alta expresión de PD-1 (124,125). Muchos de estos tumores destacan por la expresión de los ligandos de PD-1, principalmente PD-L1, no solo por los macrófagos o células dendríticas infiltrantes, sino por las propias células tumorales, lo que sugería que podía tratarse de un mecanismo de evasión del sistema inmune en algunas neoplasias (126,127). Estos hallazgos, junto a los trabajos que demostraron la reversibilidad del estado de “exhaustion” en células T (63), llevaron a evaluar la viabilidad del uso de PD-1 y sus ligandos, PD-L1 y PD-L2, como dianas terapéuticas para promover la respuesta inmune antitumoral (128).

La actuación farmacológica sobre receptores moduladores del sistema inmune en cáncer no resultaba un concepto nuevo, ya que anteriormente se había aprobado el uso de anticuerpos anti-CTLA-4 para aumentar la respuesta inmune frente a algunos tumores como el melanoma (129). Sin embargo, el uso de anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 supuso uno de los mayores avances en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer en los años siguientes debido a su mayor eficacia y menor incidencia de efectos adversos (130). Estos fármacos inhiben en los linfocitos T infiltrantes del tumor la señalización mediada por PD-1, revirtiendo el estado de “extenuación” y reactivando la respuesta del sistema inmune frente a las células tumorales (131,132). Debido a su mecanismo de acción la efectividad de los anticuerpos bloqueantes anti-PD-1 y anti-PD-L1 dependen en gran medida de la presencia previa de infiltrados linfoides en el tumor (133).

Estas terapias han aumentado notablemente las tasas de supervivencia y de curación en distintos tipos de neoplasias como el cáncer de pulmón o el melanoma (134). Sin embargo, numerosos estudios han asociado el uso de estos anticuerpos a episodios de inflamación y a la aparición de distintas manifestaciones autoinmunes denominadas IRAEs (*immuno-related adverse events*), siendo la tiroiditis autoinmune una de las más comunes tras el tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1. La incidencia de esta varía en función de la serie y del fármaco empleado, pudiendo presentarse en un 7-15% de los pacientes (135–137). Las alteraciones del tiroides suelen presentarse durante los primeros 60 días desde el inicio del tratamiento. La mayor parte de los pacientes debutan con un cuadro de hipotiroidismo, aunque en algunos casos los pueden sufrir un período inicial de hipertiroidismo autolimitado que no suele requerir tratamiento, y que evoluciona rápidamente hasta un estado de hipotiroidismo. Es necesario destacar que, en ausencia de tiroiditis subclínica o de enfermedad autoinmune del tiroides, la presencia al inicio del tratamiento de

INTRODUCCIÓN

autoanticuerpos frente a antígenos tiroideos en el suero de estos pacientes predispone a sufrir esta clase de alteraciones tiroideas secundarias (138,139).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La enfermedad de Graves se caracteriza, además de por la generación de anticuerpos contra el TSH-R y otros antígenos tiroideos, por una infiltración progresiva de células del sistema inmune. Este proceso genera un microambiente proinflamatorio caracterizado por una firma de IFNs de tipo I y tipo II (11), a pesar de cual la enfermedad presenta una progresión lenta y una mínima destrucción del parénquima del tiroides. Al igual que en otras enfermedades autoinmunes, la destrucción del tejido diana es inferior a lo que esperable como consecuencia de una respuesta inmune plenamente funcional, lo que apunta a una atenuación de la misma mediante la intervención de distintos mecanismos de tolerancia periférica.

La alta incidencia de tiroiditis autoinmune secundaria a la inmunoterapia anti-PD-1 y anti-PD-L1 en cáncer (135–137), la presencia de un microambiente rico en inductores de su expresión como los IFNs, y la asociación de determinados SNP en sus correspondientes genes a la susceptibilidad a la enfermedad de Graves (114–116), sugieren que el eje de señalización formado por ambas podría tener un papel particularmente relevante en el control de las AITD. En este contexto podría participar en el control del daño tisular de una forma análoga a lo ya descrito en infecciones crónicas al modular la magnitud de la respuesta inmune (76).

Se postula por tanto que los correceptores del TCR en general y el eje PD-1/PD-L1 en particular, juegan un papel clave en el mantenimiento de la tolerancia a los tirocitos y que en la autoinmunidad tiroidea se produce una inducción insuficiente para frenar la respuesta autoinmune contra los antígenos tiroideos.

OBJETIVOS GENERALES

Determinar el papel del eje PD-1/PD-L1 en la patogenia de las enfermedades autoinmunes tiroideas como paradigma de los correceptores posiblemente implicados en autoinmunidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión de PD-1 en los linfocitos T circulantes e intratiroides de pacientes afectados de EG, así como en sus correspondientes controles.
2. Determinar el nivel de expresión de PD-L1 y PD-L2 en los tirocitos de glándulas afectas de tiroidopatías autoinmunes y en los correspondientes controles.
3. Relacionar la expresión de PD-1 y PD-L1 con la presencia y extensión de los infiltrados linfocíticos y los niveles de citocinas en glándulas afectas de tiroidopatías autoinmunes y en los correspondientes controles.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4. Determinar si el IFN- γ puede inducir la expresión de PD-L1 y PD-L2 en tirocitos, su cinética y comparación con la inducción de HLA clase II.
5. Generar un sistema de cocultivo que permita valorar los efectos de la interacción de los ligandos de correceptores expresados en los tirocitos sobre linfocitos T en un sistema autólogo que emule la interacción en las glándulas afectas de enfermedad de Graves.
6. Identificar otros ejes de correceptor/ligando posiblemente implicados en las enfermedades autoinmunes tiroideas explotando la base de datos de expresión génica de libre acceso GTEX y herramientas bioinformáticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES

En el presente estudio se utilizaron muestras de tejido tiroideo obtenidas de pacientes que, bien por indicación por su patología de base o por su colaboración en el estudio mediante el programa de donación de órganos, se hayan sometido a una tiroidectomía total o parcial. Las muestras de tejido fresco de pacientes con EAT o BMN fueron recogidas en colaboración con los servicios de Cirugía Endocrina y Endocrinología del Hospital Universitario Vall d'Hebron y el Hospital Universitario de Bellvitge; las muestras control obtenidas de donantes de órganos fueron obtenidas en colaboración con la unidad de Coordinación de Trasplantes y el servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario Vall d'Hebron; además, bloques de tejido tiroideo criopreservado de controles y pacientes con EAT fueron cedidos por Biobanco del Instituto de Investigación en Ciencias de la salud Germans Trias i Pujol (IGTP). Este proyecto ha sido aprobado por los comités éticos de los hospitales implicados, y todos los pacientes o sus familiares, según correspondiese, fueron debidamente informados y firmaron su consentimiento antes de la donación de tejido tiroideo u otro tipo de muestras biológicas (Referencia CEIC PR(AG)77/2018).

Durante la realización del proyecto se utilizaron distintos grupos de muestras según su disponibilidad y el diseño experimental planificado para cada objetivo concreto, la composición, origen, y características particulares de cada grupo de muestras se definen más adelante en los apartados correspondientes.

1. Enfermedades autoinmunitarias del tiroides (EAT)

Este grupo está en su mayor parte formado por muestras obtenidas de pacientes con enfermedad de Graves-Basedow (EGB), esto se debe principalmente a dos razones ya comentadas anteriormente, primero el especial interés que suscita la existencia de los anticuerpos receptor de la tirotropina (anti-TSH-R) cuyo efecto emula el de la propia tirotropina (TSH), y la segunda, la disponibilidad de tejido humano fresco debido a que el tratamiento quirúrgico mediante tiroidectomía total es la elección en un porcentaje de los pacientes en los que fracasa la terapia farmacológica. En el caso de los pacientes con tiroiditis de Hashimoto (HT), si bien es cierto que la tiroidectomía parcial o total no está indicada como tratamiento de esta patología *per se*, este procedimiento puede llegar a realizarse en algunos pacientes en los que la deglución o la respiración se ven

MATERIAL Y MÉTODOS

comprometidas por el desarrollo de bocios de gran tamaño, con o sin aparición de nódulos concomitantes. Es por ello, que un pequeño número de estos pacientes han sido incluidos en algunas partes del presente proyecto. Las glándulas recuperadas tras la cirugía eran trasladadas al servicio de Anatomía Patológica, donde el facultativo especialista correspondiente revisaba el tejido y seleccionaba el fragmento destinado para su uso en este proyecto.

Todos los pacientes con EAT incluidos en este estudio fueron diagnosticados por los servicios de Endocrinología del hospital correspondiente, siendo excluidos todos aquellos pacientes con serologías positivas para el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VHI) y el virus de la hepatitis C (VHC). De forma adicional, fueron descartadas todas aquellas muestras que, tras el estudio anatomopatológico, presentasen indicios de malignidad.

2. Controles

En el caso del estudio del tiroides, no existe ninguna intervención o procedimiento cuya realización permita la obtención de tejido fresco procedente de pacientes sin patologías que afecten a esta glándula, y prácticamente cualquiera de estos procesos induce cierto grado de tiroiditis, histológicamente similar a la tiroiditis focal, también de origen autoinmune. Es por ello que la disponibilidad de controles para esta clase de estudios es muy limitada.

Durante la realización de este proyecto se han utilizado dos fuentes diferentes de tejido como control. Durante las primeras fases experimentales, se obtuvieron muestras de tejido tiroideo de pacientes con bocios multinodulares (BMN), en estos casos la tiroidectomía parcial o total está indicada en los casos en los que las vías respiratorias quedan comprometidas por un crecimiento excesivo de la glándula, o bien la combinación del examen radiológico e histológico de las lesiones determinan la existencia de malignidad. Como controles se utilizaron muestras en las que el estudio previo de las lesiones más características mediante PAAF descartó la presencia de indicios de malignidad. La glándula recuperada tras la intervención fue revisada por el facultativo especialista correspondiente del servicio de Anatomía Patológica, quien seleccionó en los casos en los que fuese posible, tejido macroscópicamente normal de zonas adyacentes a las lesiones.

En una segunda fase del proyecto, y en colaboración con la unidad de Coordinación de Trasplantes y el servicio de Cirugía Torácica, se sustituyó el uso de muestras de pacientes con BMN por muestras de tiroides obtenidas de

MATERIAL Y MÉTODOS

donantes de órganos. En estos casos la historia clínica era revisada para excluir previamente cualquier posible donante que presentase algún tipo de patología tiroidea previa.

Tanto en el caso de los pacientes con BMN, como en el caso de los tiroides obtenidos de donantes de órganos, se comprobó la ausencia de anticuerpos anti-tiroperoxidasa (anti-TPO) y anti-tiroglobulina (anti-TG), principales autoanticuerpos presentes en pacientes con alguna forma de EAT, excluyendo así individuos que pudiesen padecer algún tipo de respuesta autoinmune subclínica frente al tejido tiroideo.

MUESTRAS

1. Tejido tiroideo

Las muestras se transportaban al laboratorio en un contenedor cerrado estéril con solución salina de Hank (HBSS) en el interior de una caja termoaislante con hielo. Durante el intervalo de tiempo entre la tiroidectomía y el inicio del procesamiento de las muestras se conservaron en todo momento a 4°C, con el objetivo de evitar la degradación del tejido este período de tiempo nunca superó las 2 horas. El tejido obtenido se divide en dos fragmentos, el primero se congela para su utilización en estudios histológicos, y el segundo se somete a digestión enzimática, obteniendo una suspensión celular para cultivos primarios.

1.1. Criopreservación

Se prepara un vaso de precipitados con 5-10mL de isopentano, este se sumerge a su vez en un recipiente metálico al que se añade una mezcla de acetona y hielo hasta igualar el nivel del isopentano. Mientras la temperatura entre la mezcla de hielo seco/acetona e isopentano se iguala, el tejido se corta en fragmentos cúbicos de aproximadamente 5mm de lado, estos son introducidos separadamente en el isopentano. Pasado medio minuto los fragmentos ya congelados son colocados sobre papel de aluminio dentro de un recipiente con hielo seco, donde se mantendrán durante al menos 20 minutos, esto permitirá la evaporación del isopentano restante que impregna cada fragmento, el cual podría dificultar la posterior inclusión en OCT para su corte en criostato. Los fragmentos son introducidos en criotubos, rotulados y conservados a -80°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.2. Digestión enzimática

El objetivo es la obtención de una suspensión celular formada mayoritariamente por CFTs, que podrá ser utilizada más adelante para realizar cultivos primarios o análisis mediante citometría de flujo. Para ello se utiliza una solución de Colagenasa IV, enzima proteolítica que actuará principalmente sobre la matriz extracelular del tejido, y ADNsa I, cuya actividad eliminará el ADN que en ocasiones se libera como consecuencia del daño celular, y que aumenta la viscosidad del medio afectando negativamente al rendimiento de la digestión y a la viabilidad de las células obtenidas. Para evitar la contaminación de las muestras todo el proceso es llevado a cabo en una campana de flujo laminar, y solo se utilizan materiales y reactivos estériles.

Se preparan 20mL medio de digestión con Colagenasa IV a una concentración de 3mg/mL y ADNsa I a una concentración de 0,1mg/mL en HBSS, esta solución se precalienta a 37°C en un baño termostático de agua hasta el momento de su uso. Sobre una placa de Petri, y utilizando pinzas y tijeras quirúrgicas, se eliminan los restos de tejido conjuntivo denso que forman la cápsula del tiroides, la muestra es entonces cortada en fragmentos de 2-3mm de lado, el tejido debe de estar durante el proceso impregnado de una pequeña cantidad de HBBS para evitar que se seque y disminuya la viabilidad de las células. Los fragmentos se traspasan a un tubo estéril de 15mL al que se añaden 10mL de HBSS, el contenido se agita manualmente durante 1 minuto y se dejan sedimentar los fragmentos durante unos segundos para retirar el sobrenadante, este lavado se realiza un total de 3 veces, y sirve principalmente para eliminar el suero sanguíneo, cuyos inhibidores de proteasas pueden actuar sobre la colagenasa impidiendo su actividad. Tras el tercer lavado los fragmentos de tejido se resuspenden en el medio de digestión, y se traspasan a un Erlenmeyer de 50mL con una barra magnética. El Erlenmeyer se introduce en el baño de agua sobre un agitador magnético sumergible, y la digestión se realiza a 37°C y 200rpm hasta la dispersión completa del tejido, o un máximo de 2 horas para evitar un daño excesivo a las células obtenidas. Los restos de tejido no digeridos son eliminados al pasar la muestra a través de una malla con poros de 500µm de diámetro, la suspensión celular resultante se centrifuga a 1000rpm durante 5 minutos. Si el botón celular obtenido presenta un color rojo intenso que indica la presencia de abundantes hematíes se realiza un paso de lisis de eritrocitos, para ello se disgrega el botón y se incuba a 37°C durante 10 minutos en medio de lisis ACK, tras lo que se realizan al menos dos lavados con

MATERIAL Y MÉTODOS

RPMI + 10% SBF para eliminarlo. La suspensión resultante se centrifuga de nuevo a 1000rpm durante 5 minutos, el botón celular se resuspende de nuevo en 5-10mL de RPMI + 10% SBF, y mediante una cámara Neubauer y azul de tripán se calcula el número de células obtenidas y su viabilidad, descartándose aquellas muestras en las que esta sea inferior al 90%.

La composición de esta suspensión celular dependerá principalmente del tipo de tejido empleado, las muestras control estarán formadas principalmente por CFTs, mientras que los tejidos obtenidos de pacientes con EAT presentarán grados variables de tiroiditis, y por tanto la suspensión celular puede contener gran cantidad de leucocitos infiltrantes, en algunos casos representando más del 50% de las células viables obtenidas. Cabe destacar que la Colagenasa IV es especialmente efectiva en la digestión de la matriz extracelular, pero no en la disociación de las uniones célula-célula entre CFTs, por lo que la mayor parte de estos no se liberan como células individuales, sino formando parte de fragmentos de folículos tiroideos de tamaño variable, que pueden estar formados desde unas pocas a varios cientos de células.

2. Leucocitos

Para los experimentos de cultivo celular y de estudio mediante citometría de flujo se aíslan leucocitos de dos fuentes distintas: sangre periférica y células del sistema inmune que infiltran los tiroides de algunos pacientes. La obtención y posteriores cultivos celulares se realizan siempre en campana de flujo laminar y bajo condiciones de esterilidad.

2.1. Células mononucleares de sangre periférica (CMSPs)

Obtenidos tanto de controles como de pacientes con EAT a partir de 5-10mL sangre total conservada en heparina sódica como anticoagulante, tras la extracción de sangre la muestra se conservaba a temperatura ambiente y se procesaba en un tiempo inferior a 4 horas. Los CMSPs son aislados mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Lymphoprep® (Alere Technologies AS, Oslo, Noruega) según las indicaciones del fabricante, para ello la sangre se diluye en proporción 1:2 con suero fisiológico y se traspasa a un tubo cónico de 15mL al que previamente se han añadido 3mL de Lymphoprep®, la muestras se centrifuga a 2000rpm durante 20 minutos haciendo que el contenido

MATERIAL Y MÉTODOS

del tubo se distribuya en varias fases diferenciadas en función de su densidad. Los CMSPs se obtienen entonces del anillo formado entre la fase superior compuesta por el suero sanguíneo y la intermedia formada por el Lymphoprep®. Se realizan dos lavados a las células obtenidas utilizando RPMI + 10% SBF y centrifugando la muestra a 1500rpm durante 5 minutos, tras lo que el botón celular obtenido se resuspende de nuevo en 5mL de RPMI + 10% SBF. El número de células y su viabilidad se calculan mediante el uso de una cámara Neubauer y azul de tripán como colorante vital, descartándose aquellas muestras en las que esta sea inferior al 90%.

Los pacientes con EAT presentan en su mayoría grados variables de tiroiditis, esto permite que durante el proceso de digestión enzimática del tejido se puedan extraer las células del sistema inmune que infiltran estas glándulas. En función de la cantidad de tejido procesado y de su grado de infiltración es posible obtener un número suficiente de leucocitos infiltrantes para realizar experimentos de cultivo y análisis mediante citometría de flujo sin necesidad de ser expandidos previamente *in vitro*, conservando así lo máximo posible las características fenotípicas que presentaban *in vivo*. En presencia de tiroiditis la mayor parte de las células del sistema inmune que infiltran el tiroides son linfocitos, es por ello que a estas muestras se les denomina desde este momento Linfocitos infiltrantes del tiroides (LITs), que pueden ser de dos tipos en función de la etapa de la digestión enzimática del tejido tiroideo en la que se obtengan:

2.2. Linfocitos infiltrantes del tiroides obtenidos mediante disgregación mecánica (mLITs)

Estas células se obtienen durante el protocolo de digestión de tejido explicado anteriormente, concretamente durante la fase de disgregación mecánica del mismo. Durante los 3 lavados con HBSS que se realizan al tejido una vez cortado en fragmentos de 2-3mm de lado, se liberan aquellos leucocitos infiltrantes más superficiales y que menos fuertemente están unidos a la matriz extracelular o a otras células del tejido. El sobrenadante obtenido de estos lavados se centrifuga, y el botón celular obtenido se resuspende en 10mL de suero fisiológico, de esta suspensión se aíslan las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad siguiendo el mismo protocolo empleado para la obtención de CMSPs. Las células obtenidas mediante este procedimiento se denominan mLITs.

2.3. Linfocitos infiltrantes de tiroides obtenidos mediante digestión enzimática (eLITs)

Los lavados de la muestra mediante HBSS tras la disgregación mecánica no son suficientes para extraer la totalidad de leucocitos infiltrantes, y una proporción de estos quedan retenidos en estos fragmentos de tejido, presumiblemente aquellas células que se encuentran en zonas más internas de los fragmentos o que están más fuertemente unidas a la estructura del propio tejido. Estas células serán liberadas junto a los CFTs durante la digestión enzimática, basándose el primer paso para su separación en la capacidad de los CFTs para adherirse a superficies plásticas una vez cultivados. La suspensión celular obtenida tras la digestión enzimática del tejido tiroideo se cultiva en frascos de 75cm² de superficie en presencia de RPMI + 10% SBF a una concentración máxima de 10⁷ células/frasco durante un mínimo de 8 horas. Tras comprobar que la mayor parte de los CFTs se han adherido al fondo del frasco se recupera el sobrenadante, que se centrifuga a 1500rpm durante 5 minutos, el botón celular obtenido es entonces resuspendido en 10mL de suero fisiológico. Esta suspensión se somete a una centrifugación en gradiente de densidad siguiendo el mismo protocolo empleado para la obtención de CMSPs para obtener las células mononucleares. Las células obtenidas mediante este procedimiento se denominan eLITs.

3. Líneas celulares

Durante el proyecto se utilizaron tres líneas celulares diferentes, todas ellas derivadas de tiroides, pero con distintas características. Para la realización de los experimentos correspondientes las líneas se mantuvieron en cultivo durante un máximo de 20 pases, tras lo cual eran desechadas y el cultivo era iniciado de nuevo utilizando alícuotas criopreservadas a -170°C.

3.1. HT93

Línea obtenida mediante la transformación de CFTs transfectadas con el antígeno T del papilomavirus SV-40. Esta línea fue generada por el Dr. Antonino Belfiore y el Dr. Ricardo Pujol en el laboratorio del Dr. Franco Bottazzo del Departamento de Inmunología del University College de Londres (140), y cedida por el laboratorio de la Dra. Jaraquemada, del Departamento de Biología Celular de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

3.2. TPC-1

Línea tumoral derivada de carcinoma papilar de tiroides, un tipo de carcinoma de células diferenciadas (141). Esta línea fue cedida por la Dra. Mireia Jordà del grupo de tumores endocrinos del Instituto de Investigación del Hospital Germans Trias i Pujol (IGTP).

3.3. HTH83

Línea tumoral derivada de carcinoma anaplásico de tiroides, a diferencia del carcinoma papilar, el anaplásico es altamente indiferenciado (142). Esta línea fue cedida por la Dra. Mireia Jordà del grupo de tumores endocrinos del Instituto de Investigación del Hospital Germans Trias i Pujol (IGTP).

El mantenimiento de los cultivos se realizaba en un incubador a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂, para ello las tres líneas se siembran en frascos de 25cm² de superficie a una concentración de 2x10⁵ células/frasco utilizando como medio de cultivo DMEM complementado con 2mM L-glutamina (Gibco, Waltham, Massachusetts, EEUU), 600 U/mL penicilina, 0,5 mg/mL estreptomicina, 10mM HEPES (Lonza, Basilea, Suiza) y 10% SBF (HyClone, Chicago, Illinois, EEUU). Los pases se realizaban en todos los casos una vez alcanzada una confluencia del 70-80%, llegado este momento el medio de cultivo es descartado y, tras el lavado de la monocapa celular con buffer fosfato salino (BFS), esta se desprende del fondo del frasco incubando durante 5 minutos con una solución de tripsina (0,05%) y EDTA a temperatura ambiente. Las células recuperadas se lavan 2 veces con medio de cultivo con 10% SBF, lo que contribuye a eliminar la tripsina e inhibir las trazas que puedan quedar en el medio, tras esto las células son cultivadas en un nuevo frasco a la concentración anteriormente indicada.

MATERIAL Y MÉTODOS

TINCIONES MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

El objetivo de estos experimentos es el estudio de la expresión de PD-L1, PD-L2, PD-1, CMTM4 y CMTM6 en secciones de tiroides de pacientes con EGB y HT, y de BMN como control. El listado de tejidos y los experimentos de inmunofluorescencia indirecta en los que fueron empleados se detalla en la **Tabla suplementaria 1**. Parte de estas muestras pertenecen a la colección C.001878 del Registro Nacional de Biobancos, cuyo responsable es el Dr. Pujol Borrell, y fueron cedidas por el Servicio de Inmunología del Hospital Germans Trias i Pujol (IGTP).

Para la preparación de las muestras, fragmentos congelados de tejido se incluyeron en bloques de OCT de los que se obtuvieron secciones de 5-7µm de grosor mediante un criostato Leica CM3050 (Leica, Wetzlar, Alemania). Las secciones obtenidas se depositan en portaobjetos de vidrio y se mantienen a temperatura ambiente durante un mínimo de 6 horas para permitir el secado y fijado del tejido, tras lo que se conservaron a -80°C hasta su uso.

Todos los anticuerpos empleados fueron previamente titulados utilizando como controles secciones de distintos tejidos de origen linfóide: timo, ganglio linfático, o bazo, según se considerase necesario en función de la bibliografía consultada para cada uno. El listado completo de los anticuerpos empleados junto a las diluciones de uso se encuentra en la **Tabla suplementaria 2**.

El protocolo general para la preparación de las muestras fue común a las distintas tinciones de inmunofluorescencia indirecta realizadas, durante este, todos los pasos de incubación se llevaron a cabo en una cámara húmeda para evitar la evaporación de las soluciones de anticuerpos durante el proceso. Las secciones de tejido cortadas anteriormente se descongelaban y se secaban a temperatura ambiente durante 1 hora, las muestras eran entonces fijadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con 2% de paraformaldehído (PFA) en BFS, tras lo que se realizaban 3 lavados en BFS a temperatura ambiente durante 5 minutos; se continuaba con un paso de bloqueo de 1 hora a temperatura ambiente utilizando suero normal de cabra al 6%. Una vez eliminado el exceso de solución de bloqueo, se dispensaban 100µL del anticuerpo primario diluido en BFS + 2% SBF en cada pocillo correspondiente y las muestras eran incubadas durante toda la noche a 4°C, una vez terminada la incubación el exceso de anticuerpo era eliminado

MATERIAL Y MÉTODOS

mediante 3 lavados en BFS. A continuación, se añadían 100µL del anticuerpo secundario diluido en BFS + 2% SBF a los pocillos correspondientes, incubándose las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente, tras lo que se realizaban 3 lavados en BFS. Como contratinción nuclear se realizó una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente utilizando 100µL de DAPI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) diluido a 0,1µg/mL, eliminándose el exceso mediante un lavado con BFS. Finalmente, el portaobjetos era preparado utilizando medio de montaje y laca de uñas para sellar el cubreobjetos. Para evaluar la posible señal de fondo producida por la unión inespecífica de los anticuerpos secundarios, cada muestra incluía su propio control negativo, en el que una sección del tejido era marcada en ausencia de anticuerpo primario.

1. Expresión de PD-1

El objetivo fue evaluar la expresión de PD-1 en células T CD4 y CD8 infiltrantes en glándulas de pacientes con EAT y tejidos control. Se realizaron dos tinciones dobles de cada muestra utilizando secciones consecutivas del tejido, en cada una de ellas se utilizó el anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón anti-PD1, junto a su anticuerpo secundario correspondiente cabra anti-ratón IgG1 conjugado con Cy5, en combinación con un anticuerpo primario monoclonal de ratón IgG2a anti CD4 o anti-CD8, junto a su anticuerpo secundario correspondiente, AF488 Go anti-Ms IgG2a. Las muestras fueron visualizadas mediante un microscopio de fluorescencia Olympus BX61. Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software ImageJ (143), cuyo módulo Cell Counter fue empleado para cuantificar la expresión de PD-1 en las células infiltrantes CD4+ y CD8+, en una media de 5 ± 1 campos ópticos por cada muestra evaluada.

2. Expresión de PD-L1

2.1. Distribución de PD-L1

La tinción para PD-L1 en glándulas de pacientes con EAT y controles se valoró en primer lugar mediante tinción simple, para ello se emplearon dos anticuerpos anti-PD-L1 distintos, un anticuerpo monoclonal de conejo IgG y anticuerpo monoclonal de ratón IgG2b, junto a sus respectivos anticuerpos secundarios, anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de conejo conjugado con AF594 y anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con AF488. Las muestras se examinaron mediante un microscopio de fluorescencia Olympus BX61, y la

MATERIAL Y MÉTODOS

valoración de la expresión corrió a cargo de dos observadores independientes (Daniel Álvarez de la Sierra y Paloma Ruiz Blázquez), los cuales asignaban una puntuación dentro de una escala semicuantitativa basada en el número de folículos con CFTs PD-L1+ observados en cada muestra. La identificación de CFTs PD-L1+ se realizó en base a la morfología celular.

2.2. Análisis de co-localización de PD-L1

Tras el estudio de los niveles de expresión general de PD-L1 las muestras más representativas fueron seleccionadas. Mediante diversos protocolos de tinción triple estas muestras fueron empleadas para confirmar la expresión de PD-L1 por parte de CFTs, y la relación de su expresión con zonas de infiltración linfóide o de inflamación. Las secciones fueron visualizadas empleando un microscopio confocal espectral FV1000, realizándose posteriormente un análisis descriptivo de las mismas.

3. Expresión de PD-L2

La expresión de PD-L2 en glándulas de pacientes con EAT y controles se valoró mediante tinción simple. Para ello se emplearon dos anticuerpos anti-PD-L2 distintos, un anticuerpo policlonal de conejo anti-PD-L2 y un anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 anti-PD-L2, junto a sus anticuerpos secundarios, anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de conejo conjugado con AF594 y anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con, respectivamente. Las muestras fueron visualizadas mediante un microscopio de fluorescencia Olympus BX61.

4. Expresión de CMTM4 y CMTM6

La expresión de las proteínas producto de los genes CMTM4 (*CKLF like Marvel Transmembrane domain containing 4*) y CMTM6 (*CKLF like Marvel Transmembrane domain containing 6*) en glándulas de pacientes con EAT y controles se evaluó mediante tinción simple de IFI. Se realizaron ambas tinciones de cada muestra en secciones consecutivas del tejido, utilizándose en cada una de ellas un anticuerpo policlonal IgG de conejo anti-CMTM4 o un anticuerpo policlonal IgG de conejo anti-CMTM6, en ambos casos en combinación con un anticuerpo secundario de burro anti-IgG (H+L) de conejo conjugado con

MATERIAL Y MÉTODOS

DyLight550. Las muestras fueron visualizadas mediante el microscopio de fluorescencia.

CULTIVOS CELULARES

1. Estimulación *in vitro* con IFN- γ

El objetivo es evaluar la respuesta de los CFTS en cultivos primarios y de líneas celulares derivadas de tiroides a la estimulación con distintas concentraciones de IFN- γ , y comprobar si esta citocina tiene algún efecto sobre la expresión de PD-L1 o PD-L2 en células epiteliales de origen tiroideo.

1.1. Células foliculares tiroideas (CFT)

Suspensiones celulares de CFTs obtenidas mediante digestión enzimática de muestras de pacientes con EGB (n=3) y BMN (n=4) se ajustaron a una concentración de 10^6 células/mL con medio RPMI GlutaMAX™ (Gibco, Waltham, Massachusetts, EEUU) suplementado con 600U/mL de penicilina, 0,5mg/mL estreptomicina, 10mM HEPES (Lonza, Basilea, Suiza) y 10% SBF (HyClone, Chicago, Illinois, EEUU). A continuación, se sembraron 0,5-1mL de esta suspensión, según disponibilidad, en 8 frascos de cultivo de 25cm² de superficie y se añadió medio de cultivo hasta un volumen final de 5mL. Los frascos se mantuvieron durante un mínimo de 8 horas en un incubador a 37°C en presencia de 5% de CO₂ para permitir la adhesión de los CFTs al plástico, una vez transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo para eliminar las células no adherentes y otros restos celulares. Para reemplazarlo se añadieron a cada frasco 5mL de medio de cultivo previamente suplementados con 0, 25, 50, o 100U/mL de IFN- γ (Roche, Basilea, Suiza); se prepararon dos frascos por cada concentración de IFN- γ , uno de ellos fue estimulado durante 24 horas y otro durante 48 horas.

1.2. Líneas celulares

Las células de las líneas celulares HT93, TPC-1 y HTh83 se despegaron de las monocapas mediante tripsinización durante la fase logarítmica de crecimiento

MATERIAL Y MÉTODOS

siguiendo el protocolo explicado anteriormente. Tras comprobar que la viabilidad de las células era superior al 90% se contaron y sembraron en frascos de 25cm² de superficie a una concentración de 3×10^5 células/frasco utilizando como medio de cultivo DMEM GlutaMAX™ suplementado con 600U/mL penicilina, 0,5mg/mL estreptomicina, 10mM HEPES y 10% SBF. Los frascos se cultivaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Durante los siguientes días se comprobó que el crecimiento y la densidad celular fuesen comparables en todos los frascos, y tras alcanzar una confluencia del 60-70% se reemplazó el medio cultivo y los frascos se estimularon siguiendo el esquema descrito para los cultivos primarios.

Para el análisis mediante citometría de flujo o qPCR, las células de las líneas celulares se recuperaron tras el tiempo de cultivo correspondiente. Para ello, el medio de cultivo se retiró de los frascos y se realizó un lavado con BFS del contenido de estos, tras el cual las monocapas celulares fueron despegadas mediante incubación en una solución de tripsina (0,05%) + EDTA durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células obtenidas fueron lavadas mediante centrifugación a 1500rpm durante 5 minutos, y el botón celular resuspendido en 5mL de RPMI o DMEM + 10% SBF para inhibir las posibles trazas de tripsina.

2. Cocultivos CFTs-CMSPs

El objetivo es valorar si los CFTs poseen *in vitro* la capacidad de suprimir la capacidad proliferativa de CMSPs previamente estimulados. Para ello se realizaron una serie de cultivos autólogos CFTs:CMSPs a distintos ratios y sometidos a diferentes condiciones experimentales. La configuración general del experimento seguía el siguiente esquema:

2.1. Preparación de las muestras

Se seleccionaron 3 pacientes con EGB, y como controles, 3 donantes de órganos sin antecedentes patológicos de alteraciones de la función tiroidea, y negativos para las pruebas de autoanticuerpos anti-TPO y anti-TG. De cada uno de ellos se obtuvieron muestras de tejido tiroideo y sangre periférica, de los que se aislaron, mediante digestión enzimática y centrifugación en gradiente de densidad respectivamente, CFTs y CMSPs según los protocolos detallados anteriormente.

Los CMSPs se contaron, tras lo cual una alícuota con $0,5 \times 10^4$ - 10^5 células se reservó para determinar la proporción basal de células T CD4 y CD8, y su

MATERIAL Y MÉTODOS

expresión de PD-1 mediante citometría de flujo. El resto de CMSPs fueron resuspendidas a una concentración de $10^6/\text{mL}$ en RPMI GlutaMAX™ suplementado con 600U/mL de penicilina, 0,5mg/mL estreptomicina, 10mM HEPES y 10% SBF. Esta suspensión celular se sembró en frascos de 25cm² de superficie, no superando los 5mL/frasco, y mantenidos en un incubador a 37°C y en atmósfera de 5% de CO₂ hasta el momento del cocultivo.

Los CFTs se contaron y se resuspendieron en RPMI GlutaMAX™ suplementado con 600U/mL de penicilina, 0,5mg/mL estreptomicina, 10mM HEPES y 10% SBF; y una pequeña alícuota con 0.5×10^4 - 10^5 células se reservó para establecer la expresión basal de HLA-DR y PD-L1 mediante citometría de flujo. Para el cultivo mixto se separaron 10^6 CFTs que fueron lavados por centrifugación a 1000rpm durante 5 minutos, y resuspendidas en 4mL de RPMI completo suplementado adicionalmente con 5mU/mL h-TSH obteniendo una suspensión de $2,5 \times 10^5$ CFTs/mL, a partir de la cual se prepararon 3 diluciones seriadas 1:2, de concentraciones finales $1,25 \times 10^6$, $6,25 \times 10^4$, y $3,1 \times 10^4$ CFTs/mL respectivamente. De cada una de estas suspensiones celulares se dispensan 200μL en los pocillos correspondientes de una placa de 96 pocillos de fondo plano según la distribución que se muestra en el esquema de la **Figura 4**. Los CFTs se incuban a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ hasta el día siguiente para permitir su adhesión al fondo de los pocillos y la formación de una monocapa celular.

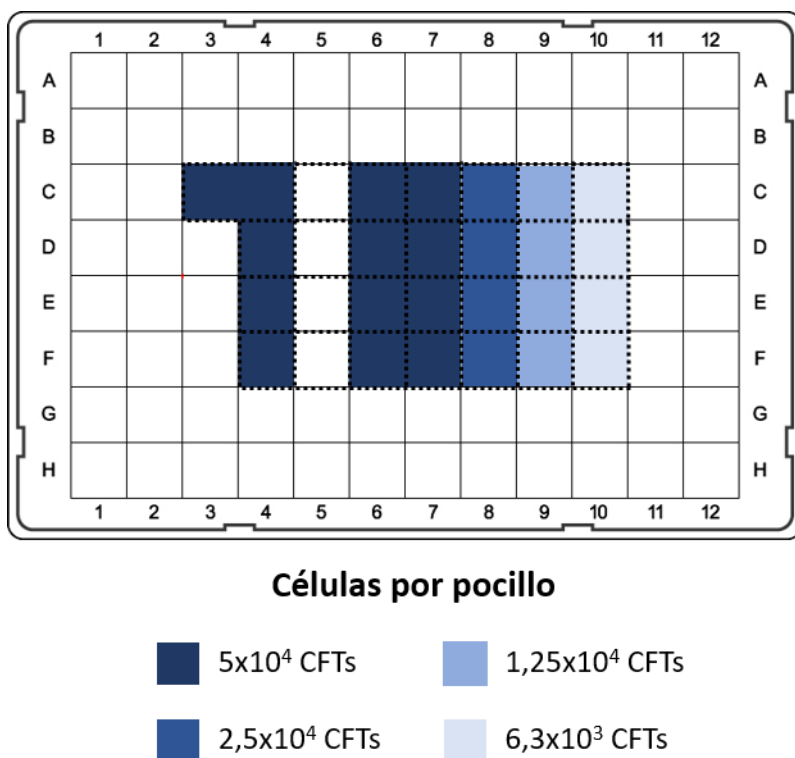


Figura 4. Cocultivos autólogos CFT:CMSP. Esquema que muestra la distribución de los pocillos y la cantidad inicial de tirocitos sembrada en cada uno de ellos durante el día -1 del cocultivo.

2.2. Establecimiento del cocultivo

Se recuperan en un tubo estéril los CMSPs en cultivo desde el día anterior y se realiza un primer lavado con RPMI completo, tras contar el número de CMSPs obtenidos estos se marcan con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EEUU). El CFSE es un compuesto fluorescente que es capaz de difundir a través de las membranas celulares y formar enlaces covalentes con grupos aminos presentes en proteínas u otras moléculas, al producirse la división celular cada célula hija mantendrá aproximadamente la mitad del CFSE contenido en la célula madre, permitiendo la identificación de distintas generaciones celulares mediante citometría de flujo en función a la MFI correspondiente al CFSE. Para ello se resuspenden en RPMI completo a una concentración de 10^6 CMSPs/mL y se añaden $0,8\mu\text{L}$ de CFSE, previamente reconstituido siguiendo las indicaciones del fabricante, por cada mililitro de suspensión celular. El contenido del tubo es mezclado por inversión durante 5 minutos, tras lo cual se realizan 3 lavados con 10mL de RPMI completo para eliminar los restos de CFSE. Se rotulan 4 tubos estériles como “Sin estímulo”, “Anti-IFN- γ ”, “Anti-CD3/CD28 + IL-2” y “Anti-CD3/CD28 + IL-2 + Anti-IFN- γ ”. A cada uno de estos tubos se añaden 10^6 CMSPs previamente marcados con CFSE, se realiza un lavado, y el pellet celular se resuspende en 2mL de RPMI completo suplementado con 5mU/mL de h-TSH, obteniendo una concentración de $2,5 \times 10^6$ CMSPs/mL. Se preparan 4 tubos rotulados de forma similar que no contienen CMSPs, y que sirven como controles internos.

A los tubos marcados como Anti-CD3/CD28 se añaden $25\mu\text{L}$ de ImmunoCult™ Human CD3/CD28 T Cell Activator (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) por cada 10^6 células siguiendo el protocolo del fabricante, y $1,7\mu\text{L}$ de una solución de IL-2 (Proleukin®, Novartis, Basilea, Suiza) de concentración $1,8 \times 10^5\text{U/mL}$, obteniendo una concentración final de 150U/mL . A los tubos marcados como Anti-IFN- γ se les añade un anticuerpo bloqueante de IFN- γ humano (Biolegend, San Diego, California, EEUU) a una concentración final de $10\mu\text{g/mL}$, cantidad que se comprobó experimental era capaz de inhibir *in vitro* el efecto de hasta 50U/mL de IFN- γ exógeno sobre un cultivo primario de CFTs. A los tubos que contienen solo RPMI se les añade la cantidad necesaria de cada reactivo para obtener una concentración igual a sus equivalentes con CMSPs. Todas las muestras se incuban a 37°C en presencia de 5% de CO_2 durante 2 horas antes de su cultivo en placa. La composición final de cada tubo queda resumida en la **Tabla suplementaria 3**.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tras haber comprobado la correcta adhesión de los CFTs al fondo de los pocillos de la placa sembrada el día anterior, el contenido de todos ellos se retira con una pipeta cuidando de no dañar la monocapa celular del fondo. A cada pocillo se le añaden 200µL de la muestra según corresponda, obteniendo para la placa de cocultivo la configuración que se muestra en la **Figura 5**. La placa se incuba durante 72 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ hasta el momento de su lectura.

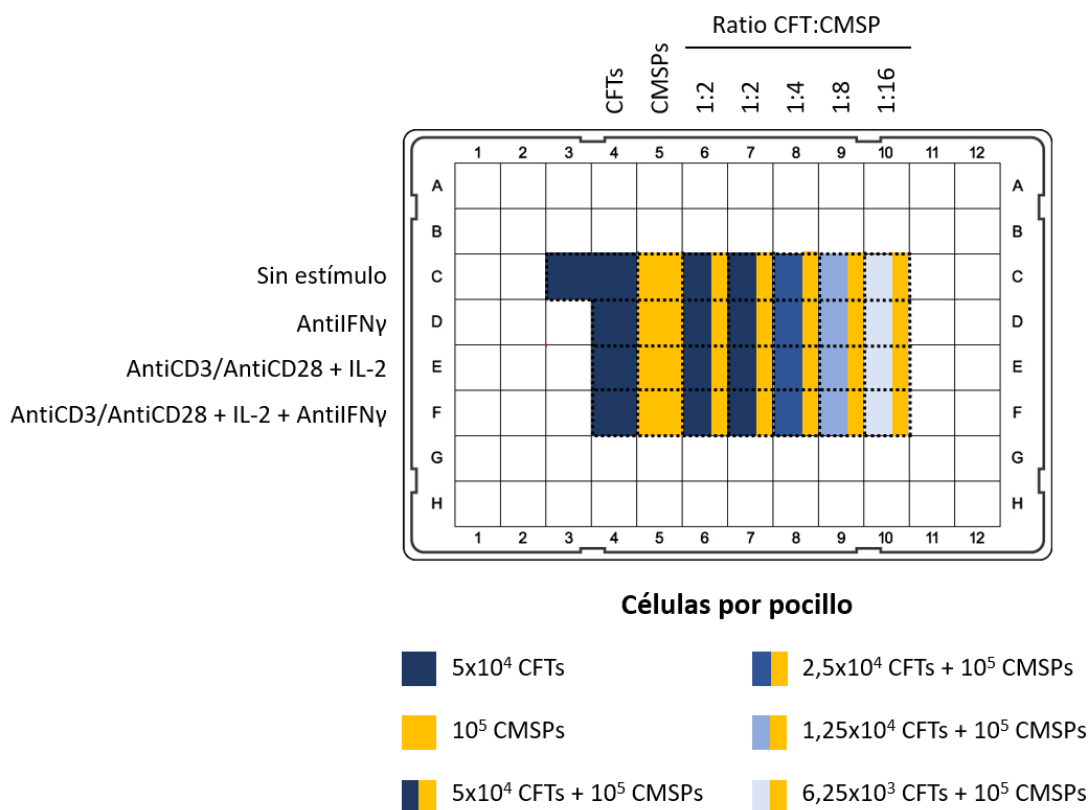


Figura 5. Esquema de la placa cocultivo CFT:CMSP autólogos en el día 0. El código de colores y el margen superior muestran el número y composición de las células en cada pocillo al inicio del cocultivo. En el lateral izquierdo se indica la condición experimental correspondiente a cada fila de pocillos de la placa.

2.3. Análisis del cocultivo

Una vez transcurridas 72 horas de cultivo se comprueba la correcta proliferación de los controles positivos que contienen exclusivamente CMSPs en un microscopio invertido de contraste de fases. Se rotula entonces un tubo de 1,5mL con tapa y un tubo de poliestireno para citometría por cada pocillo del cocultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El contenido de cada pocillo se traspasa a un tubo de poliestireno según su rotulación, estos tubos son centrifugados a 1500rpm durante 5 minutos, de cada uno de ellos, y con cuidado de no perturbar el botón celular, se transfieren 100μL del sobrenadante al tubo de 1,5mL correspondiente. Cada pocillo es lavado con 200μL de BFS, y el resto de las células adheridas al fondo de cada tubo es recuperado mediante su incubación durante 10 minutos y a temperatura ambiente con una solución de tripsina (0,05%) + EDTA. Tanto el BFS como la solución de tripsina + EDTA de cada pocillo se recuperan y añaden a los tubos de poliestireno correspondientes para obtener el máximo número de células posibles. Se añaden a cada tubo 2mL de BFS y se centrifugan a 1500rpm durante 5 minutos para eliminar los restos de medio de cultivo y de tripsina, el botón celular es resuspendido en 100μL de BFS.

Siguiendo el esquema de la **Figura 6**, las muestras obtenidas de los pocillos que contienen solo CFTs y de cada uno de los duplicados del cocultivo a ratio 1:2 serán utilizadas para estudio de la expresión de HLA-DR y PD-L1 en los CFTs, mientras que los pocillos que contienen solo CMSPs y los pocillos de cocultivo con ratio 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 restantes se emplean para el estudio de la proliferación de linfocitos T y la expresión de PD-1. El protocolo de preparación, procesamiento y análisis de estas muestras se detalla más adelante.

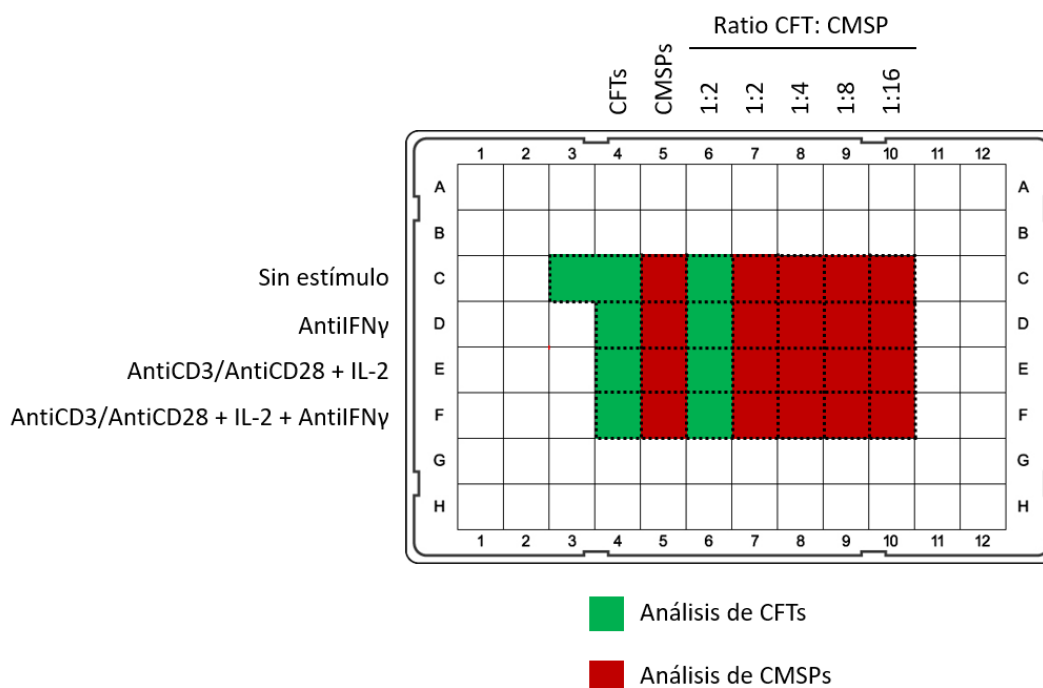


Figura 6. Esquema de la placa cocultivo CFT:CMSP autólogos en el que se muestra que pocillos se emplearán para el análisis mediante citometría de flujo de las CFTs o de CMSPs, respectivamente.

3. Cocultivos línea TPC-1:CMSP

De forma análoga a lo descrito en la sección anterior para el cocultivo autólogo de CFTs:CMSPs, se realizan cultivos entre la línea celular TPC-1, derivada de carcinoma papilar de tiroides, y CMSPs obtenidas de donantes de sangre. El objetivo, de nuevo, es evaluar si la línea TPC-1 tiene la capacidad de inhibir la proliferación de CMSPs previamente estimulados. Para ello se realiza un protocolo basado en el ya descrito para los cocultivos autólogos de CFTs:CMSPs con las modificaciones que aquí se describen.

En primer lugar, y en contra de lo descrito en la sección correspondiente a las líneas celulares, para este experimento el cultivo de la línea TPC-1 es mantenida utilizando el mismo medio empleado para los cultivos primarios de CFTs y CMSPs, RPMI GlutaMAX™ suplementado con 600U/mL de penicilina, 0,5mg/mL estreptomina, 10mM HEPES y 10% SBF.

Para la preparación de la placa de cocultivo se tuvo en consideración que, el sobrecrecimiento de la línea celular durante la duración del experimento podría alterar los resultados al producir la muerte de los CMSPs de forma secundaria a la depleción de los nutrientes del medio. Para evitar esto, y conseguir además establecer un sistema de cocultivo a distintos ratios CMSP:TPC-1, se calculó empíricamente la cantidad mínima de células TPC-1 que debían de sembrarse en pocillos de 96 pocillos de fondo plano para obtener, tras la duración establecida para este experimento, una monocapa celular de 80-90% de confluencia. En base a estos resultados se diseñó el protocolo de preparación de la línea TPC-1 para el cocultivo.

Partiendo de un cultivo ya establecido de la línea TPC-1 se recuperan las células mediante tripsinización, estas se cuentan, y se prepara una primera suspensión celular con 40.000 células/mL. A partir de esta primera suspensión celular se realizan diluciones seriadas 1:2 para obtener suspensiones celulares de concentraciones decrecientes. Siguiendo el esquema de la **Figura 7**, se siembran en una placa de 96 pocillos de fondo plano 200μL por pocillo de las suspensiones celulares de concentración final 10.000, 5.000, 2.500, y 1.250 células/mL. Usando estas concentraciones iniciales se consigue que, tras 72 horas desde el comienzo del cocultivo, los pocillos en los que se sembró inicialmente la suspensión con 10.000 TPC-1/mL alcancen aproximadamente un 80-90% de confluencia, reduciéndose esta con las diluciones seriadas posteriores, y consiguiendo de esta manera distintos ratios de cultivo TPC-1:CMSPs a la vez que se evita un sobrecrecimiento de la línea celular.

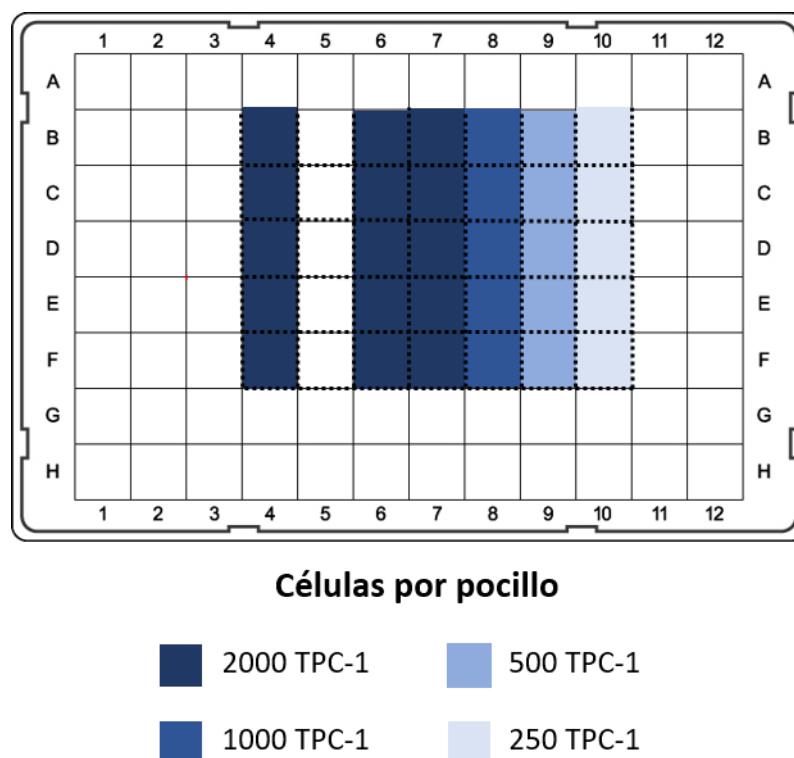


Figura 7. Cocultivos autólogos TPC-1:CMSP. Esquema que muestra la distribución de los pocillos y la cantidad inicial de células TPC-1 sembradas en cada uno de ellos durante el día -1 del cocultivo.

A diferencia de los experimentos con CFTs, se siembra una primera fila de pocillos con concentraciones decrecientes de TPC-1 a los que no se añadirán posteriormente CMSPs, y que servirán para confirmar que la confluencia alcanzada por cada suspensión de células TPC-1 una vez transcurridas las 72 horas desde el inicio del cocultivo se encuentra dentro de los márgenes esperados.

Además, al considerarse que el fenotipo de la línea TPC-1 se mantendrá estable durante la duración del cultivo, en estos experimentos no se realiza una tinción basal para determinar la expresión de HLA-DR y PD-L1, ya que estos se determinarán utilizando el pocillo en el que se cultiven en ausencia de CMSPs y otros estímulos.

Los procesos de establecimiento del cocultivo y de recuperación de las células y sobrenadantes una vez transcurridas 72 horas, son comunes a los ya explicados anteriormente para los experimentos de cocultivos autólogos entre CFTs y CMSPs.

MATERIAL Y MÉTODOS

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo se empleó en distintos experimentos para el estudio de expresión de proteínas en superficie en distintos tipos celulares, y adicionalmente para el análisis de la proliferación de linfocitos T en los ensayos de supresión de la proliferación en cocultivos de CMSPs y CFTs. El listado completo de los anticuerpos utilizados en cada uno de los protocolos y sus características técnicas se detallan en la **Tabla suplementaria 4**.

1. Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en CMSPs y LITs

Se analizó la expresión de PD-1 en las subpoblaciones de memoria de linfocitos T en muestras de CMSPs de donantes de sangre y de pacientes con EGB, y en el caso de estos últimos, en muestras apareadas de mLITs obtenidas de tejido tiroideo. Las distintas muestras fueron obtenidas según los protocolos previamente descritos en el apartado correspondiente de la sección Muestras. Los datos demográficos y analíticos de estos pacientes se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Resumen de los datos demográficos y analíticos en el momento del diagnóstico de los pacientes con enfermedad de Graves en los que se realizó la determinación de PD-1 mediante citometría de flujo en CMSPs y eLITs.

Muestra	Edad	Sexo	Evolución ¹ (Meses)	TSH (mU/L)	T3 libre (pg/mL)	T4 libre (ng/dL)	Ac anti- TG (UI/mL)	Ac anti- TPO (UI/mL)	Ac anti- TSH-R (UI/L)
THV-33	25	M	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
THV-34	26	M	18	<0,008 ↓	>20 ↑	7,63	240 ↑	187 ↑	8.3 ↑
THV-35	26	M	36	<0,008 ↓	7,01 ↑	2,2	ND	ND	5.2 ↑
THV-36	37	M	12	<0,008 ↓	14,15 ↑	3,5	<15	>1300 ↑	11.2 ↑
THV-37	61	V	24	<0,008 ↓	7,17 ↑	2,22	25	237 ↑	58.0 ↑
THV-38	43	V	60	<0,008 ↓	ND	3,58	255 ↑	91 ↑	55.4 ↑
THV-40	47	V	24	0.01 ↓	>20 ↑	4,74	1130 ↑	<6500 ↑	14.5 ↑
THV-41	51	M	180	<0,008 ↓	5,43 ↑	1,76	73.60 ↑	>6500 ↑	23.5 ↑
THV-49	52	M	18	<0,008 ↓	>20 ↑	5,53	32	>6500 ↑	9.3 ↑
THV-51	48	M	48	<0,008 ↓	ND	6,92	<20	22.20	7.2 ↑

M: mujer; V: varón; ND: no disponible; ↑: superior al rango de referencia; ↓: inferior al rango de referencia.

¹Evolución: tiempo transcurrido entre el diagnóstico clínico y la tiroidectomía.

Valores de referencia: TSH 0,55-4,78 mU/L; T3 libre 2,3-4,2 pg/mL; T4 libre 0,8-1,76 ng/dL; Ac anti-TPO 0-60 UI/mL; Ac anti-TG 0-60 UI/mL; Ac anti-TSH-R 0-1,8 UI/L.

1.1. Protocolo

Las células obtenidas se contaron y tras ajustar la concentración a 10^6 células/mL en RPMI + 10% SBF, 100µL se traspasaron a un tubo de poliestireno para citometría. En el caso de muestras con muy baja celularidad, principalmente de eLITs por existir poca infiltración del tejido obtenido, el total de las células eran resuspendidas en 100µL de BFS. Cada muestra es marcada con una mezcla que contiene 2µL de cada uno de los siguientes anticuerpos: anti-CD3 (Pacific Blue), anti-CD4 (FITC) y anti-CD8 (PerCP) para la identificación de linfocitos T, anti-CD45RA (PE-Cy7) y anti-CCR7 (PE) para diferenciar las subpoblaciones de memoria, y anti-PD-1 (APC), anti-PD-L1 (APC), o anti-PD-L2, para el análisis de su expresión en cada población celular. Las muestras se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras lo cual se realizó un lavado con 2mL de BFS para eliminar el exceso de anticuerpos y se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos. Empleando un vortex se disgregó el botón celular, y se añadieron 2mL de solución BD Phosflow™ Lyse/Fix (BD, Nueva Jersey, EEUU) para fijar las células, las muestras se incubaron entonces a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 minutos, seguidamente las muestras se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos para eliminar el exceso de solución de fijado. Se realizó un nuevo lavado con 2mL de BFS, tras la centrifugación el botón celular es resuspendido en 500µL de BFS, y la muestra procesada utilizando un equipo BD FACSCanto™ II. Se adquirieron al menos 10^5 CMSPs o 5×10^4 eLITs para su análisis en cada caso.

1.2. Estrategia para el análisis de citometría de flujo (gating)

Los datos obtenidos tras el procesamiento de las muestras se analizaron mediante el programa FlowJo™ v10 (BD). En primer lugar, se eliminaron los dobletes de células mediante la combinación de las señales FSC-A y FSC-H. Las dos poblaciones principales de linfocitos T fueron identificadas como las células CD3+CD4+ (Th) y CD3+CD8+ (Tc) respectivamente; la expresión de los marcadores CD45RA y CCR7 se emplearon para la diferenciación, en linfocitos T CD4 y CD8, de las distintas subpoblaciones de memoria: naïve (CD45RA+CCR7+), efectoras de memoria CD45RA+ (CD45RA+CCR7-), efectoras (CD45RA-CCR7-), y memoria central (CD45RA-CCR7+). La expresión de PD-1 se analizó en todas las poblaciones definidas por los anteriores marcadores. Para establecer el punto de corte entre las células positivas y

MATERIAL Y MÉTODOS

negativas se emplearon como controles internos las poblaciones CD3-, compuestas por linfocitos B y células NK, que en su gran mayoría no expresan PD-1 en condiciones normales. La estrategia de análisis empleada se detalla en la **Figura 8**.

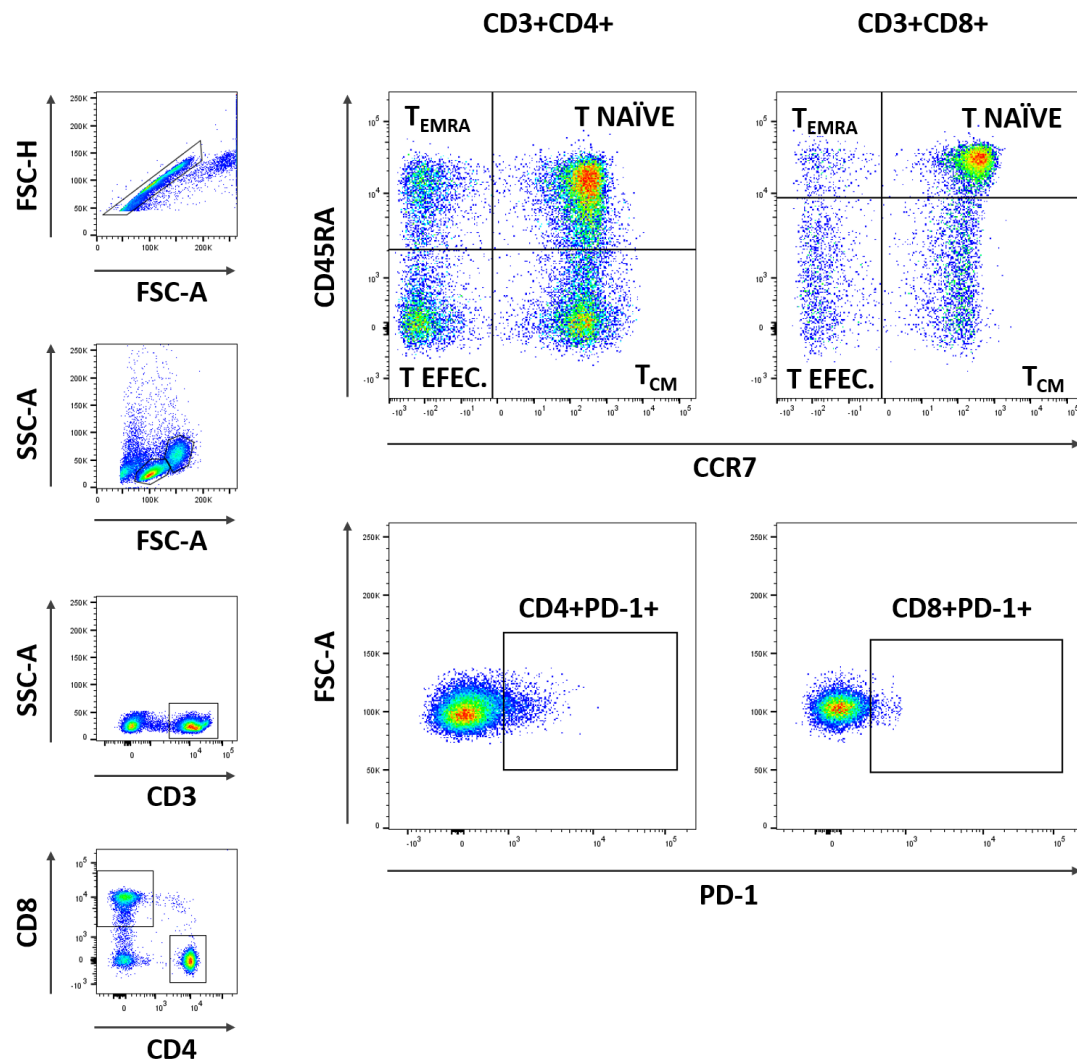


Figura 8. Estrategia de análisis de las subpoblaciones de memoria T y la expresión de PD-1 en muestras de CMSPs y mLITs. Tras la eliminación de agregados celulares se seleccionan los linfocitos por su morfología, y se identifican las células T CD3+. Las subpoblaciones de memoria en linfocitos T CD4 y CD8 se diferencian en base a la expresión de CCR7 y CD45RA.

2. Expresión de PD-L1 y PD-L2 en CFTs y líneas celulares

El objetivo es analizar la expresión de PD-L1 y PD-L2 en cultivos primarios de CFTs y cultivos de las líneas celulares HT93, TPC-1, y HTh83 en respuesta a la

MATERIAL Y MÉTODOS

estimulación con IFN- γ a distintas dosis a 24 y 48 horas, tal y como se describe en el apartado correspondiente de la sección Cultivos celulares. En el caso de las muestras de CFTs, y siempre que fuese posible, la expresión de PD-L1 y PD-L2 también fue analizada en la situación basal tras la digestión enzimática del tejido, y antes de realizar el cultivo.

2.1. Protocolo

Tras la obtención por tripsinización de las células cultivadas y estimuladas con IFN- γ , se rotulan dos tubos de poliestireno para citometría por cada frasco y se dispensan en cada uno de ellos 10^5 células de la muestra correspondiente. En el caso de las muestras basales y sin estimular se preparan cuatro tubos, dos de ellos para estudiar la expresión de PD-L1 y PD-L2, y dos para emplear como controles al sustituir los anticuerpos específicos anti-PD-L1/L2 por sus respectivos controles de isotipo. Se dispensan en cada tubo 2 μ L de anticuerpo anti-HLA-DR (PE) y anti-HLA clase I (FITC), además de 2 μ L de anticuerpo Ms IgG2b anti-PD-L1 (APC), Ms IgG1 anti-PD-L2 (APC), control de isotipo Ms IgG1 (APC), o control de isotipo Ms IgG2b (APC) según corresponda. Las muestras se incuban durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se realiza un lavado con 2 mL de BFS para eliminar el exceso de anticuerpos y se centrifugan a 1500rpm durante 5 minutos. Empleando un vortex se resuspende el botón celular, y se añaden 2 mL de solución BD Phosflow™ Lyse/Fix (BD, Nueva Jersey, EEUU) para fijar las células, las muestras son incubadas a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 minutos, seguidamente las muestras se centrifugan a 1500rpm durante 5 minutos para eliminar el exceso de solución de fijado. Se realiza un nuevo lavado con 2 mL de BFS, tras la centrifugación el botón celular se resuspende en 500 μ L de BFS, y la muestra se adquiere utilizando un equipo BD FACSCanto™ II.

2.2. Estrategia para el análisis de citometría de flujo (gating)

Los datos obtenidos tras el procesamiento de las muestras se analizaron mediante el programa FlowJo™ v10 (BD). En primer lugar, se eliminaron los dobletes de células mediante la combinación de las señales FSC-A y FSC-H, seguidamente CFTs o las células correspondientes a las líneas celulares fueron identificados en base a su tamaño (FSC-A) y complejidad interna (SSC-A). La expresión de HLA-DR, HLA clase I, PD-L1 y PD-L2 se analizó en función a dos parámetros: el porcentaje de células positivas para cada uno de ellos, y la media de intensidad

MATERIAL Y MÉTODOS

de fluorescencia (MFI) de la población de interés. Los controles de isotipo sirvieron para establecer el punto de corte entre una expresión negativa y positiva para PD-L1 y PD-L2. La estrategia de análisis empleada se detalla en la **Figura 9**.

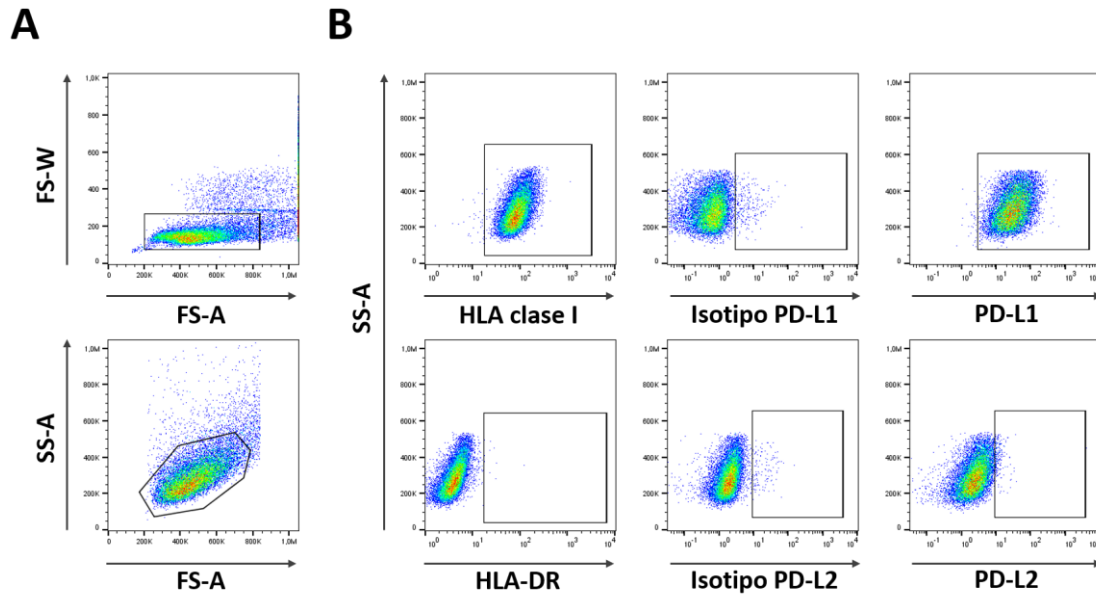


Figura 9. Inducción de PD-L1 y PD-L2 en CFTs y líneas celulares. Análisis representativo de la expresión basal de PD-L1 y PD-L2 en la línea celular HTh83. (A) Selección de la población de células de interés, (B) expresión de HLA de clase I, HLA-DR, PD-L1, PD-L2, y sus respectivos controles de isotipo.

3. Cocultivo de CMSPs con CFTs primarias o células transformadas TPC-1

Se utiliza la citometría de flujo para estudiar la proliferación de linfocitos T en respuesta al cocultivo con CFTs autólogos o células transformadas TPC-1 en presencia de diversos estímulos según se detalla en el apartado correspondiente de la sección Cultivos celulares. La cuantificación de la proliferación celular se realiza mediante el marcaje de las CMSPs con CFSE.

3.1. Protocolo

Las muestras obtenidas de los experimentos de cocultivo se pueden emplear para el estudio de las células de origen tiroideo o de los CMSPs contenidos en cada pocillo según se detalla anteriormente en las **Figura 6**, esto depende de los anticuerpos que se usen en cada caso. A las muestras destinadas al análisis de

MATERIAL Y MÉTODOS

CFTs se les añade 10µL de 7-AAD como marcador de muerte celular, 2µL de anticuerpo anti-CD45 (FITC), 2µL de anti-HLA-DR (PE) y 2µL de anti-PD-L1 (APC), con la excepción del duplicado para el monocultivo de CFTs sin estimular, que servirá como control, y en el que el anticuerpos anti-PD-L1 se sustituye por 2µL de control de isotipo IgG2b (APC). En el caso de las muestras que se utilicen para el estudio de la proliferación de los linfocitos T se añaden a cada tubo 10µL de 7-AAD, 2µL de anticuerpo anti-CD45 (PE), 2µL de anti-CD4 (PE-Cy7), 2µL de anti-CD8 (APC-Cy7), y 2µL de anti-PD-1. Todas las muestras se incuban durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. El exceso de anticuerpos se elimina mediante un lavado con 2mL de búfer fosfato salino (BFS). Las muestras se centrifugan, el botón celular es resuspendido en 500µL de BFS y se adquieren empleado un equipo Navios EX (Beckman Coulter).

3.2. Estrategia para el análisis de citometría de flujo

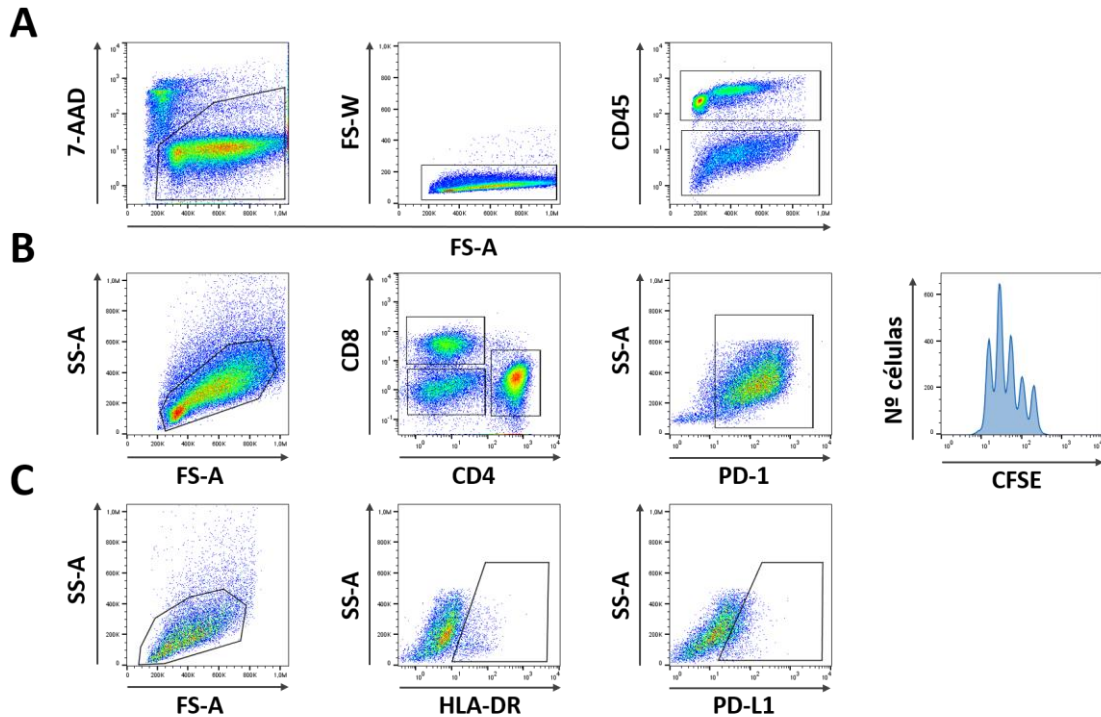
Los datos obtenidos tras el procesamiento de las muestras se analizaron mediante el programa FlowJo™ v10 (BD). En ambos casos los dobletes celulares se eliminaron para el posterior análisis mediante la combinación de las señales FS INT y FS TOF. En las muestras empleadas para el análisis de los CMSPs se identificaron estos como las células CD45+, descartando así los CFTs, dentro de estas se seleccionan a su vez los linfocitos en base a su morfología dada por los parámetros FS INT y SS INT. Se definen las poblaciones de linfocitos Th y Tc por su expresión de CD4 y CD8, respectivamente, y la expresión de PD-1 se expresa como el porcentaje de linfocitos T CD4+ o CD8+ positivos. El análisis de la proliferación celular de las poblaciones CD4+ y CD8+ se realiza empleando el módulo de análisis de proliferación del software FlowJo™ v10, expresándose el resultado mediante el índice de división (ID) celular que se calcula empleando la siguiente fórmula:

$$ID = \frac{\sum_0^i i \times \frac{N_i}{2^i}}{\sum_0^i \frac{N_i}{2^i}}$$

En el análisis de CFTs y células TPC-1 estos se identifican como las células CD45- con morfología compatible. Se analiza en esta población el porcentaje de células positivas y el MFI de la población total para HLA-DR y PD-L1, en el caso de este último se utiliza como referencia la muestra sin estimular marcada con un control

MATERIAL Y MÉTODOS

de isotipo para establecer el punto de corte entre las células positivas y negativas. Las estrategias de análisis se detallan en la **Figura 10**.



3.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizan mediante ANOVA de dos vías para conocer el efecto de los factores Tratamiento y Ratio de cocultivo sobre cada situación experimental. Para cada tipo de tratamiento - sin estímulo, anti-IFN- γ , anti-CD3/CD28, y anti-CD3+anti-IFN- γ - se realiza además un test posterior de comparaciones múltiples entre las medias según el ratio de cocultivo, aplicando la corrección de Tukey para comparaciones múltiples.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA

1. Extracción de ARN

Para la extracción de las muestras de ARN se emplea el kit RNeasy de Qiagen (Hilden, Alemania) para purificación de ARN total según las instrucciones del fabricante, el protocolo utilizado varía en su primer paso en función de la muestra de partida. En la extracción de ARN a partir de un cultivo celular, se realizan dos lavados con BFS de las células recuperadas mediante tripsinización para eliminar los restos de enzima digestiva y de medio de cultivo, ya que estos podrían interferir con el proceso de extracción. Tras el último lavado se aspira el BFS restante, y a continuación, el botón celular se resuspende en 350µL de solución de lisis RLT, y seguidamente se vortea la muestra es para su homogeneización. Cuando la muestra de partida es tejido congelado, una pequeña muestra de peso inferior a 30mg es cortada e introducida en un tubo con 600µL de solución de lisis RLT, el tejido es homogeneizado y las células lisadas empleando un homogeneizador eléctrico. Tras la homogeneización de la muestra se añade a cada una de ellas un volumen equivalente de etanol al 70% al empleado de solución RLT, y la mezcla se homogeneiza de nuevo mediante pipeteo. Se traspasan 700µL de cada muestra a una columna de extracción, se centrifugan a 10000rpm durante 1 minuto y se descarta el filtrado, si el volumen inicial fuese superior a 700µL este paso se repetiría de nuevo. Se añaden 350µL de solución RW1 a cada columna, se centrifugan a 10000rpm durante 1 minuto y se descarta el filtrado. Para la eliminación del ADN genómico se emplea el kit de ADNsa libre de ARNasas de Qiagen, se procede dispensando directamente sobre la membrana de la columna 80µL de ADNsa I previamente diluida 1:8 con solución RDD siguiendo las instrucciones del fabricante, y se incuban las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añaden 350µL de solución RW1 a cada columna, se centrifugan a 10000rpm durante 1 minuto y se descarta el filtrado. Se realizan dos lavados de la columna utilizando 500µL de buffer RPE para cada uno, descartándose en cada ocasión el filtrado tras centrifugarlas a 10000rpm durante 2 minutos. Para eliminar el exceso de solución RPE, que podría inhibir la elución del ARN, se realiza una nueva centrifugación de un minuto a 10000rpm utilizando un tubo nuevo para la columna, y descartándolo junto al filtrado. Las columnas se colocan sobre tubos de 1,5mL para recoger la muestra de ARN, para ello se añaden a cada una 30µL de H₂O libre de ARNasas, y se centrifugan a 10000rpm durante 1 minuto. Los datos de concentración y calidad de las muestras se comprueban utilizando un espectrofotómetro, y se detallan en las **Tablas suplementarias 5-7**.

MATERIAL Y MÉTODOS

2. RT-PCR

Todas las muestras de ARN se retrotranscriben a cADN empleando Transcriptor High Fidelity cADN Synthesis Kit de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante. Los reactivos y las muestras se descongelan manteniéndolos a 4°C en hielo, exceptuando la retrotranscriptasa y el inhibidor de ARNasas, que se mantienen a -20°C hasta el momento de su uso. En primer lugar, todas las muestras de un mismo experimentos se diluyen a una misma concentración de ARN utilizando agua libre de ARNasas. Se dispensan en tubos de PCR 10,4µL de cada muestra diluida junto a 1µL de oligo(dT)₁₈ como primers, y se realiza un paso de desnaturalización durante 10 minutos a 65°C en un termociclador, introduciéndose inmediatamente en hielo una vez terminado. A cada tubo se añaden 8,6µL de una mezcla preparada anteriormente que contiene el resto de los reactivos para el proceso de retrotranscripción:

4µL Transcriptor High Fidelity Reaction Buffer (x5)

2µL Deoxynucleotide mix

1,1µL Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase

1µL de dithiothreitol (DTT)

0,5µL Protector ARNse Inhibitor

Las muestras se someten a una incubación a 50°C durante 30 minutos en un termociclador durante el cual tiene lugar la retrotranscripción del ARN a cADN, seguida de un paso de 5 minutos a 85°C para inactivar la retrotranscriptasa. Los tubos son recogidos en hielo, y utilizados inmediatamente para la cuantificación mediante qPCR, o guardados a -80°C hasta el momento de su uso.

3. qPCR

Se emplea la PCR a tiempo real para cuantificar la expresión relativa de los genes de interés empleando para su normalización la expresión de genes de referencia y la expresión en muestras control. En una placa de 96 pocillos compatible con el termociclador LightCycler® (Roche) se dispensan por pocillo 2µL de cADN y 13µL de una mezcla previamente preparada que contiene 7,5µL de TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher), 4,5µL de agua destilada, y 0,75µL de la sonda correspondiente. Las sondas utilizadas se detallan en la **Tabla**

MATERIAL Y MÉTODOS

suplementaria 8. En todos los casos, la reacción de amplificación por cada muestra y gen se realizó por triplicado, empleándose el Ct medio para el cálculo de la expresión relativa.

3.1. Expresión de PD-L1 y PD-L2

La expresión relativa de PD-L1 y PD-L2 se estudia en muestras de cultivos primarios y cultivos de líneas celulares estimulados con IFN- γ , estas muestras se obtienen según los procedimientos descritos anteriormente en la sección correspondiente de Cultivos celulares. Se estudia además la expresión de HLA-DRA como control de la estimulación con IFN- γ , ya que esta describe el aumento de su expresión en respuesta a esta citocina, y GAPDH como gen de referencia. La abundancia relativa de PD-L1, PD-L2 y HLA-DRA se calculan mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ empleando la expresión de GAPDH para su normalización, y expresándose en unidades arbitrarias.

3.2. Expresión de genes de IFN de tipos I y II

Se calculó la expresión relativa de los genes IFNA1, IFNA4, IFNB1, IFNG y SOCS1 en las muestras de tejido congeladas empleadas anteriormente para el estudio de la expresión de PD-L1 y PD-L2 mediante tinción de inmunofluorescencia indirecta, tal y como se describe en la sección correspondiente. Se empleó GAPDH como gen de referencia. La expresión relativa de IFNA1, IFNA4, IFNB1, IFNG y SOCS1 se calcula para cada muestra como el ΔCt con respecto al Ct medio del gen de referencia GAPDH, expresándose en unidades arbitrarias.

ANÁLISIS DE DATOS DE ARNseq - GTEx

El programa Genome Tissue Expresión (GTEx) ha sido creado por el National Institute of Health (NIH) estadounidense y financiado a través del NIH Common Fund (144). El objetivo principal del proyecto es el de crear una base de datos que permita a investigadores de todo el mundo el estudio de la expresión y regulación génica, y su relación con las distintas variables genéticas presentes en la población. Para ello se han recogido muestras de distintos tejidos humanos obtenidos de cientos de donantes de órganos. El genotipado de estos individuos

MATERIAL Y MÉTODOS

ha permitido el estudio de la relación entre las variantes genéticas y a la expresión de ARN en cada uno de los tejidos. El proyecto GTEx, a través de su página web (<https://www.gtexportal.org/home/>), ha hecho públicos los análisis de expresión génica y la asociación con las variantes genéticas en los tejidos estudiados. Esta página contiene además un repositorio de imágenes histológicas de cada uno de los tejidos recogidos y analizados. El proyecto GTEx contempla, además, la cesión de datos en crudo a otros grupos de investigación externos para la realización de estudios adicionales que puedan considerarse de interés.

Con el objetivo de estudiar la relación entre el grado de infiltración linfocitaria y los cambios en la expresión génica en las muestras recogidas por este proyecto, se realizó una solicitud al NIH mediante la cual se obtuvo acceso a los datos de ARNseq para su análisis.

1. Clasificación histológica - GTEx

El protocolo elaborado para la recolección de las muestras indica que el tejido tiroideo debía de ser preferiblemente seleccionado, siempre que fuese posible, de aquellas zonas de la glándula que al examen macroscópico presentasen ausencia de nódulos y un aspecto normal. Las secciones eran teñidas para su análisis utilizando hematoxilina-eosina. Una de las muestras recuperadas de esta manera era incluida en parafina, que era utilizada para la preparación de secciones de hematoxilina-eosina para el análisis del tejido por el patólogo responsable. Las imágenes histológicas obtenidas de todos los tejidos obtenidos durante la fase de reclutamiento de donantes de órganos del proyecto GTEx son de libre acceso y pueden consultarse en <https://gtexportal.org>.

En colaboración con la Dra. Carmela Iglesias del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron, se revisaron las imágenes histológicas de 336 muestras de tiroides del repositorio del proyecto GTEx. Las muestras se clasificaron en función del grado de tiroiditis observada (**Figura 11**) en tres grupos distintos:

- Grupo 1 — Not infiltrated tissues (NIT): tejidos con ausencia de infiltrados linfoides y considerados como grupo control
- Grupo 2 — Small focal infiltrates (SFI): tejidos donde se evidencian infiltrados linfoides de pequeño tamaño bien delimitados
- Grupo 3 — Extensive lymphoid infiltrates (ELI): tejidos en los que una parte significativa del parénquima tiroideo ha sido sustituido por

MATERIAL Y MÉTODOS

infiltrados linfoides con presencia de tejido linfoide terciario y centros germinales. El estudio histopatológico de estos tejidos sería compatible con un diagnóstico de tiroiditis subclínica o tiroiditis de Hashimoto.

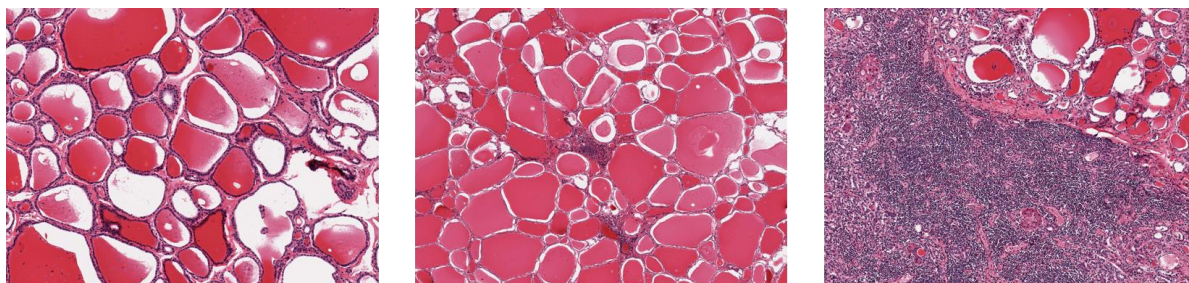


Figura 11. Imágenes representativas de tejidos pertenecientes a las tres categorías establecidas en función del grado de infiltración linfocitaria observado. De izquierda a derecha: tejido con ausencia de infiltraciones focales (NIT), tejido con presencia de pequeños infiltrados linfoides (SFI), tejido con infiltrados linfoides extensos (ELI).

2. Análisis de expresión génica - GTE_x

Para la realización del estudio comparativo de expresión génica entre los grupos de muestras previamente definidos se contó con la colaboración de la Unidad de Bioinformática y Estadística (UEB) del VHIR.

En un primer filtro se descartan todas aquellas muestras con examen histológico de las que se carezca de datos crudos de su estudio mediante ARNseq, obteniéndose un total de 292 muestras: 236 NIT, 42 SFI, y 14 ELI.

2.1. Control de calidad

Previamente al análisis de expresión diferencial entre muestras, se realizó un control de calidad de los datos obtenidos, para ello se aplicó el método Variance Stabilizing Transformation (VST) para la estabilización de la varianza. Se continuó con el estudio la similitud de las muestras mediante el cálculo de la distancia Euclídea entre ellas, y mediante un análisis de componentes principales (PCA).

MATERIAL Y MÉTODOS

2.2. Análisis de la expresión diferencial

Mediante el paquete DESeq2 v.1.18.1 de Bioconductor (145) se realizó un análisis de la expresión diferencial entre muestras. Se eliminaron todos aquellos genes sin una entrada válida en la base de datos Entrez, o con una profundidad de lectura insuficiente para la realización del análisis estadístico, estudiándose un número total de 20.948 genes. Los resultados se expresan como la magnitud de las diferencias de expresión para cada uno de los genes entre los dos grupos comparados, estos cambios se expresan como el logaritmo en base 2 de las diferencias entre ambas situaciones. Para corregir las tasas de falsos positivos debidos al elevado número de test realizados se utilizó el método de Benjamini-Hochberg para ajustar el p-valor de cada una de las comparaciones.

2.3. Análisis de significación biológica

El significado biológico de los genes diferencialmente expresados entre los distintos grupos definidos se estudió mediante la comparación con las bases de datos Gene Ontology (GO) (146,147) y Reactome Pathway KnowledgeBase (148). El objetivo de este análisis es determinar que vías de señalización o procesos biológicos están más representados en las muestras analizadas en base su expresión génica, para lo cual estos resultados son comparados con grupos de genes de referencia ya establecidos.

En el caso de la base Gene Ontology (GO), por cada una de las comparaciones realizadas se obtiene un listado de los términos más prevalentes en cada una de las tres categorías GO definidas: Molecular Function (MF), Biological Process (BP), y Cellular Component (CC). También proporciona varias representaciones de los datos obtenidos para facilitar su interpretación, como figuras con redes que contienen la relación entre los genes más representados en cada una de las categorías GO por cada comparación, o un mapa con los términos más representados por cada categoría y comparación.

La base Reactome Pathway proporciona un listado de las vías de señalización más representadas en cada una de las comparaciones realizadas, así como varias representaciones gráficas de los resultados que permiten visualizar la red de genes encontrados en las vías más representadas, o un mapa de enriquecimiento con estas vías relacionadas en base a su semejanza.

3. Cibersort

Cibersort es una herramienta analítica *in silico* que permite la cuantificación de distintos tipos celulares dentro de una mezcla compleja a partir de datos de expresión génica obtenidos mediante arrays o ARNseq (149). Los tipos celulares que este software es capaz de identificar vienen determinados por un archivo de referencia, que contiene datos de expresión génica generados individualmente para cada subpoblación de interés.

Con el objetivo de conocer la composición de los infiltrados presentes en las glándulas del proyecto GTEx, se analizaron los datos de expresión obtenidos utilizando como muestra de referencia el archivo LM22 facilitado por el grupo responsable del desarrollo de Cibersort, y que contiene información para la identificación de 22 subpoblaciones diferentes de leucocitos (**Tabla 3**).

Tabla 3. Poblaciones de células hematopoyéticas reconocidas por el software Cibersort empleando el archivo de referencia LM22.

Linfocitos T	Linfocitos B	Células NK	Monocitos y macrófagos	Células dendríticas	Mastocitos	Eosinófilos
LT CD4 naïve	B cells naive	En reposo	Monocitos	CD en reposo	En reposo	En reposo
LT CD4 mem en reposo	B cells memory	Activadas	Macrófagos M0	CD activadas	Activados	Activados
LT CD4 mem activadas	Plasma cells		Macrófagos M1			
LT CD4 foliculares	T cells CD8		Macrófagos M2			
LT TCRγδ						
LTreg						
LT CD8						

RESULTADOS

RESULTADOS

EXPRESIÓN DE PD-1, PD-L1 Y PD-L2 EN PACIENTES EN PACIENTES CON EAT

1. Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en CMSPs y LITs

El análisis de la expresión de PD-1, y de sus ligandos, PD-L1 y PD-L2 se llevó a cabo en un primer momento mediante citometría de flujo. Para ello se utilizaron muestras de CMSPs obtenidas de donantes de sangre (n=10), y muestras apareadas de CMSPs (n=10) y mLITs (n=10) obtenidas de pacientes con EGB. En un experimento previo se comprobó que el fenotipo de los linfocitos T de muestras de mLITs y eLITs es similar, la única diferencia que se observó entre ambos tipos de muestra fue una expresión ligeramente superior de PD-1 en células CD4 de eLITs comparadas con mLITs (Datos no mostrados). La principal razón para la utilización de mLITs en vez de eLITs se debe a que su obtención es menos laboriosa, y permite además el procesamiento de las muestras de CMSPs y mLITs en paralelo el mismo día de su obtención, ya que no es necesario realizar un paso previo de cultivo de la suspensión celular obtenida mediante digestión enzimática.

1.1. Subpoblaciones de memoria en LT periféricos e infiltrantes

Mediante la expresión de CD45RA y CCR7 se analizó la composición de los compartimentos naïve y de memoria de las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8. En nuestra serie se observó una ligera disminución de la subpoblación CD4 naïve en CMSPs de pacientes con EGB frente a CMSPs de controles sanos, también se da de forma paralela un aumento de la subpoblación de células CD4 efectoras, aunque estos cambios no son estadísticamente significativos ($p = 0.054$ y $p = 0.112$, respectivamente), y constituyen una tendencia clara. No se observaron diferencias en el caso de los linfocitos CD8 entre CMSPs de pacientes con EGB y controles.

Las muestras de LITs contenían un $56,0 \pm 11,2\%$ por linfocitos T, de los cuales un $48,1 \pm 18,1\%$ eran células CD4+, y un $42,8 \pm 14,8\%$ eran CD8+, valores que no presentan diferencias significativas con respecto a CMSPs de controles y pacientes con EGB (**Figura 12A**), aunque en el caso de mLITs, tanto la población CD4 como CD8 estaban compuestas en su mayoría por células efectoras y de memoria central. Si comparamos las subpoblaciones de memoria entre CMSPs y

RESULTADOS

mLITs de pacientes con EGB, observamos una disminución de la subpoblación de células naïve en linfocitos CD4 ($8,49 \pm 4,89$ vs. $27,10 \pm 12,84$; $p < 0,001$) y en linfocitos CD8 ($10,66 \pm 4,05$ vs. $33,02 \pm 14,71$; $p < 0,0001$); de forma paralela se constata un aumento estadísticamente significativo de la subpoblación de células efectoras tanto en linfocitos CD4 ($29,94 \pm 8,43$ vs. $49,18 \pm 15,47$; $p < 0,001$), como en linfocitos CD8 ($30,14 \pm 8,75$ vs. $53,82 \pm 4,59$; $p < 0,0001$). No se observan diferencias significativas en las subpoblaciones TEMRA y TCM entre mLITs y CMSPs de pacientes con EGB o de controles. Todas las diferencias observadas entre mLITs y CMSPs de pacientes con EGB se reproducen de forma similar al comparar las muestras de mLITs con CMSPs de controles (**Figura 12B**).

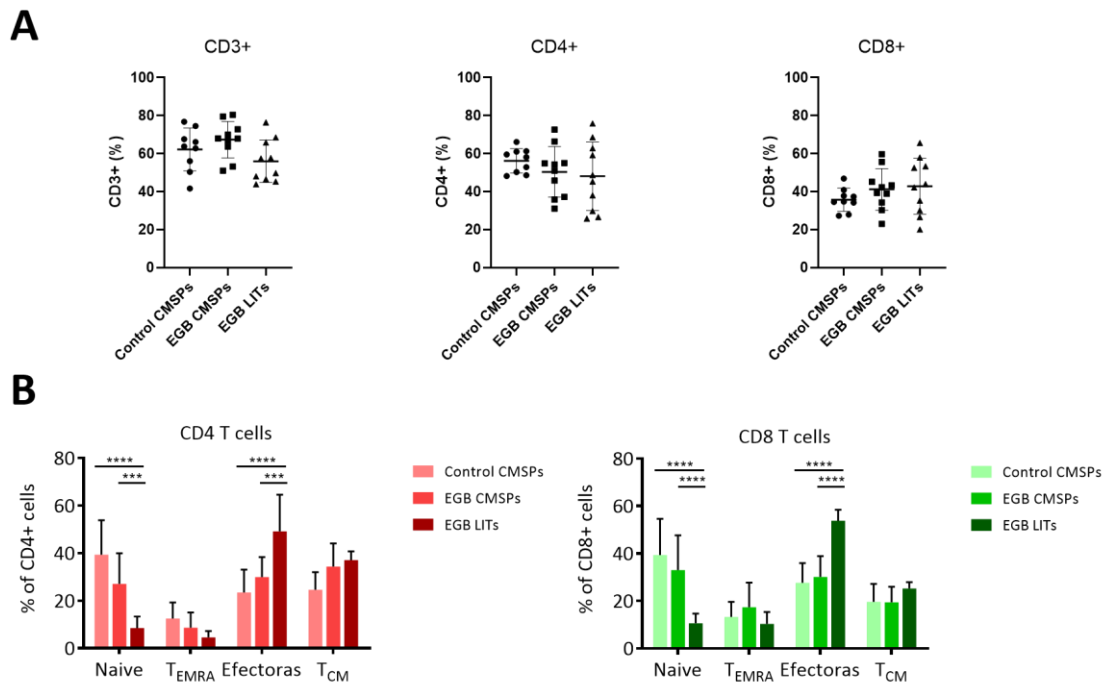


Figura 12. (A) Proporción de linfocitos T CD3+, y de las poblaciones CD4 y CD8, y (B) distribución de las subpoblaciones de memoria CD4 y CD8 en las muestras de sangre periférica de controles y paciente con enfermedad de Graves, y en linfocitos infiltrantes del tiroides en pacientes con enfermedad de Graves. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

RESULTADOS

1.2. Expresión de PD-L1 y PD-L2 en CMSPs y LITs

La cantidad de tejido fresco obtenido de pacientes con EGB y el grado de infiltración de estos condiciona enormemente la capacidad de obtención de mLITs y eLITs, es por ello por lo que el número de células recuperadas durante el procesamiento de las muestras se convertía en un factor limitante para la realización de subsiguientes experimentos. En base a la bibliografía, en este tipo de muestras se decidió dar prioridad a la determinación de PD-1 frente a la de sus ligandos, realizando el estudio de la expresión de PD-L1 y PD-L2 solo en aquellas muestras en la que el número de células obtenidas así lo permitiese. Se realizó la determinación de PD-L1 en 8 de las 10 muestras, y PD-L2 en 2 de las 10 muestras incluidas en esta sección del proyecto. A pesar de no realizarse un análisis estadístico de los resultados debido al reducido número de muestras, no se observaron diferencias en la expresión de PD-L1 o PD-L2 en linfocitos T o en monocitos entre CMSPs de controles y pacientes con EGB, o entre CMSPs y mLITs de pacientes con EGB (Datos no mostrados).

1.3. Expresión de PD-1 en CMSPs y LITs

La expresión de PD-1 se analizó en el total de linfocitos T CD4 y CD8, y en cada una de las subpoblaciones de memoria previamente definidas por la expresión de CD45RA y CCR7.

La proporción de células CD4 PD-1+ observada fue superior en CMSPs de pacientes con EGB comparada con la de CMSPs de controles ($16,9 \pm 5,4$ vs. $9,8 \pm 5,4$; $p < 0,05$), en cambio, no hubo diferencias en la expresión de PD-1 en linfocitos CD8 entre estos dos grupos (**Figura 13A**). Si comparamos la expresión de PD-1 dentro de cada una de las subpoblaciones de memoria de linfocitos CD4 entre CMSPs de paciente con EGB y de controles, observamos un aumento de expresión de PD-1 estadísticamente significativo en células TEMRA ($6,3 \pm 7,7$ vs. $1,9 \pm 1,5$; $p < 0,05$). Sin embargo, solo se observaba una tendencia, que no llegó a ser estadísticamente significativa, en las subpoblaciones efectoras ($29,8 \pm 4,8$ vs. $23,1 \pm 9,2$; $p = 0,054$), TCM ($21,1 \pm 4,8$ vs. $15,4$ vs. $6,6$; $p = 0,054$), y naïve ($1,62 \pm 1,14$ vs. $0,87 \pm 1,08$; $p = 0,065$) (**Figura 13B**). De forma similar a lo observado en el conjunto de la población de células CD8, no se detectan diferencias significativas en la expresión de PD-1 al comparar individualmente cada una de sus distintas subpoblaciones de memoria.

RESULTADOS

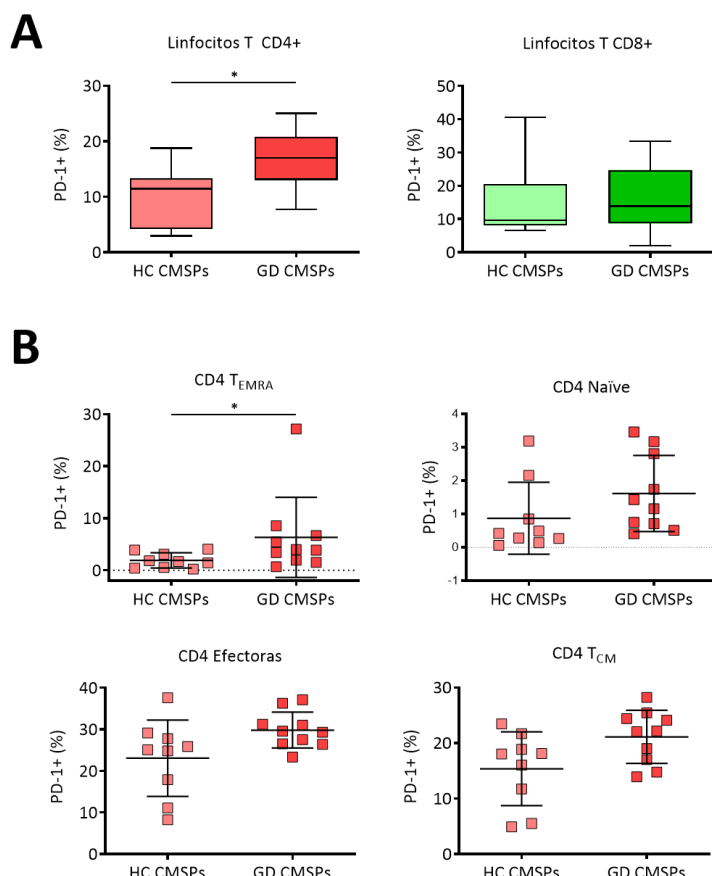


Figura 13. (A) Expresión de PD-1 linfocitos CD4 y CD8, y (B) expresión de PD-1 en las distintas subpoblaciones de memoria de linfocitos CD4 en sangre periférica de controles y pacientes con enfermedad de Graves. * $p < 0,05$

A continuación, se estudiaron las diferencias de expresión de PD-1 entre las muestras de CMSPs y mLITs de pacientes con EGB. Cabe destacar que, durante el análisis de los resultados obtenidos se observó que la expresión de PD-1 en linfocitos T periféricos, cuando esta era positiva, mostraba una distribución continua con medias de intensidad de fluorescencia (MFI) relativamente bajas; mientras que en mLITs la distribución, si bien seguía una distribución igualmente continua, la intensidad de la señal alcanzaba valores muy superiores en un porcentaje variable de los linfocitos CD4 y CD8. En base a estos patrones de expresión se definieron tres subpoblaciones de células T según la intensidad de expresión de PD-1: células PD-1 negativas (PD-1^{neg}), PD-1 positivas de expresión intermedia (PD-1^{int}), y PD-1 positivas de alta expresión (PD-1^{hi}) (**Figura 14A**). En un primer análisis se observa que el porcentaje total de expresión de PD-1, suma de las poblaciones PD-1^{int} y PD-1^{hi}, es significativamente superior en mLITs con respecto a las correspondientes muestras de CMSPs de pacientes con EGB, tanto en el conjunto de linfocitos T CD4 ($48,6 \pm 14,9$ vs. $16,9 \pm 5,4$; $p < 0,001$) como de linfocitos T CD8 ($44,5 \pm 16,0$ vs. $15,9 \pm 10,1$; $p < 0,001$) (**Figura 14B**). A continuación, se estudió el porcentaje de células PD-1^{int}, PD-1^{hi}, y el total de células PD-1+ en las distintas subpoblaciones de memoria CD4 y CD8 entre CMSPs y eLITs. Estos tres conjuntos de células PD-1 positivas están

RESULTADOS

significativamente aumentados en la mayor parte de las subpoblaciones de memoria en mLITs con respecto a CMSPs. Las mayores diferencias de expresión de PD-1 entre CMSPs y mLITs de pacientes con EGB se observan en las subpoblaciones TCM y efectoras, tanto en linfocitos CD4 como CD8. Como consecuencia de los distintos patrones de expresión de PD-1 en CMSPs y mLITs descritos anteriormente, la subpoblación de células T PD-1^{hi} es casi exclusiva de muestras de mLITs. Este tipo de linfocitos infiltrantes CD4 o CD8 con alta expresión de PD-1 presentan en su mayoría un fenotipo efector o TCM, detectándose raramente células CD45RA⁺ con este patrón de expresión de PD-1 (**Figura 14C-D y Tabla 4**).

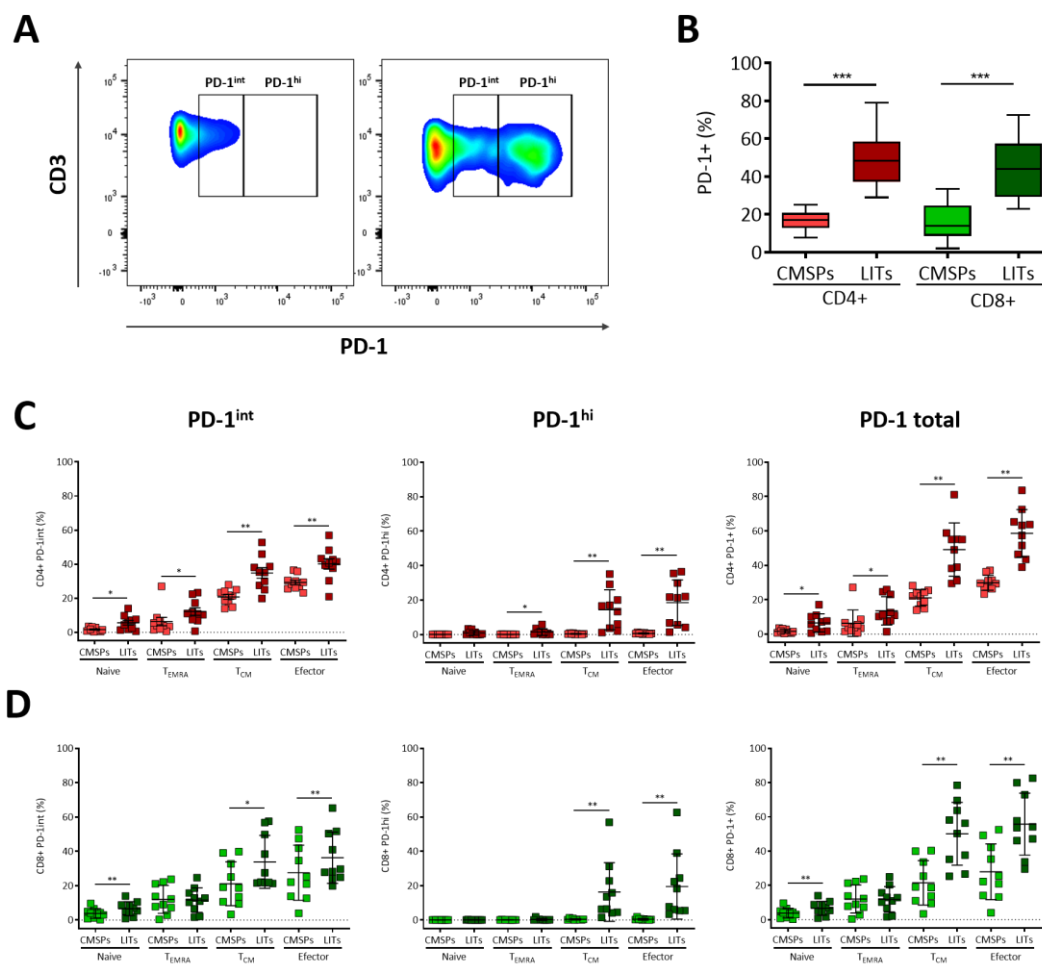


Figura 14. (A) Imagen representativa de los distintos patrones de expresión de PD-1 en células T de sangre periférica e infiltrantes de tiroides en pacientes con enfermedad de Graves. Las células PD-1⁺ pueden diferenciarse según su MFI en las subpoblaciones de expresión intermedia (PD-1^{int}) y alta (PD-1^{hi}). (B) Comparación de la expresión de PD-1 entre CMSPs y LITs de pacientes con enfermedad de Graves en células CD4 (rojo) y CD8 (verde). (C-D) Distribución de los distintos grupos de expresión de PD-1 en las subpoblaciones de memoria T CD4 (C) y CD8 (D) entre muestras apareadas de CMSPs y LITs en pacientes con enfermedad de Graves. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Tabla 4. Análisis estadístico de los grupos definidos en base a la expresión de PD-1 en las subpoblaciones de memoria CD4 y CD8 entre muestras apareadas de CMSPs y eLITs de pacientes con enfermedad de Graves.

	PD-1 ^{int}			PD-1 ^{hi}			PD-1+ (PD-1 ^{int} + PD-1 ^{hi})		
	PBMCs	ITLs	p-value	PBMCs	ITLs	p-value	PBMCs	ITLs	p-value
	(Mean±SD)	(Mean±SD)		(Mean±SD)	(Mean±SD)		(Mean±SD)	(Mean±SD)	
CD4	16.66±5.36	33.83±10.08	<0.01	0.28±0.18	14.73±11.45	<0.01	16.94±5.44	48.56±14.86	<0.01
CD4 Naive	1.61±1.14	5.60±4.31	<0.05	0.01±0.01	0.91±1.27	0.11	1.62±1.14	6.50±5.23	<0.05
CD4 Temra	6.31±7.67	12.18±7.02	<0.05	0.03±0.05	1.35±1.88	<0.05	6.33±7.71	13.53±8.21	<0.05
CD4 Effector	29.24±4.26	40.15±9.66	<0.01	0.59±0.36	18.46±13.22	<0.01	29.83±4.32	58.61±13.86	<0.01
CD4 CM	20.78±4.63	34.82±9.984	<0.01	0.33±0.27	14.36±11.59	<0.01	21.11±4.77	49.18±15.47	<0.01
CD8	15.76±9.98	29.91±12.62	<0.01	0.18±0.20	14.63±15.54	<0.01	15.94±10.06	44.54±16.07	<0.01
CD8 Naive	3.79±2.84	6.62±4.01	<0.01	0.00±0.01	0.03±0.09	1	3.79±2.84	6.64±4.03	<0.01
CD8 Temra	12.01±8.13	11.60±7.11	0.85	0.06±0.09	0.25±0.54	0.13	12.06±8.18	11.85±7.39	0.92
CD8 Effector	27.52±16.06	36.29±14.98	<0.05	0.40±0.53	19.48±19.02	<0.01	27.93±16.28	55.76±18.11	<0.01
CD8 CM	21.12±12.73	33.85±15.42	<0.01	0.35±0.40	16.27±17.09	<0.01	21.47±12.97	50.12±18.31	<0.01

1.4. Análisis histológico de la expresión de PD-1

La expresión de PD-1 en aquellos linfocitos T que infiltran el tiroides se estudió de forma paralela mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) en una selección de secciones de glándulas de pacientes con EAT (EGB = 9 y HT = 5). Con el objetivo de confirmar las observaciones realizadas mediante citometría de flujo, se realizaron marcajes dobles para CD4 + PD-1 y CD8 + PD-1 en cada muestra. Si bien el análisis de la expresión de PD-1 mediante IFI no permite la clasificación de los linfocitos T en base a la intensidad de la señal, sí que permite la cuantificación del número total de células PD-1+, y obtener información sobre la distribución de estas dos poblaciones de células en los tejidos autoinmunes.

En muestras de pacientes con EAT, los linfocitos pueden encontrarse en infiltrados de tamaño variable, que pueden además estar organizados como folículos linfoides, en ocasiones con presencia de centros germinales. En las muestras analizadas, la mayor parte de los linfocitos T CD4 se distribuían formando parte de estos infiltrados focales, al contrario que los linfocitos CD8, los cuales suelen presentar un patrón de infiltración más difuso (**Figura 15**). En general, en las muestras de pacientes con EGB solo una pequeña proporción del parénquima suele encontrarse sustituido por infiltrado linfoide, mientras que

RESULTADOS

tejidos de pacientes con HT la pérdida de tejido tiroideo a expensas de células infiltrantes y tejido linfoide terciario suele ser siempre mayor, y puede llegar a suponer más de un 50% del volumen de la glándula en determinadas zonas. En cuanto a la expresión de PD-1, en secciones de tiroides de pacientes con EAT esta se observaba siempre en células de morfología linfoide, tanto en grandes infiltrados como en pequeños grupos de células en el intersticio entre folículos. En aquellos tejidos sin patología autoinmune o presencia de tiroiditis focal, la expresión de PD-1 era negativa o relegada a unas pocas células, de nuevo de morfología linfoide, distribuidas de manera difusa en el parénquima.

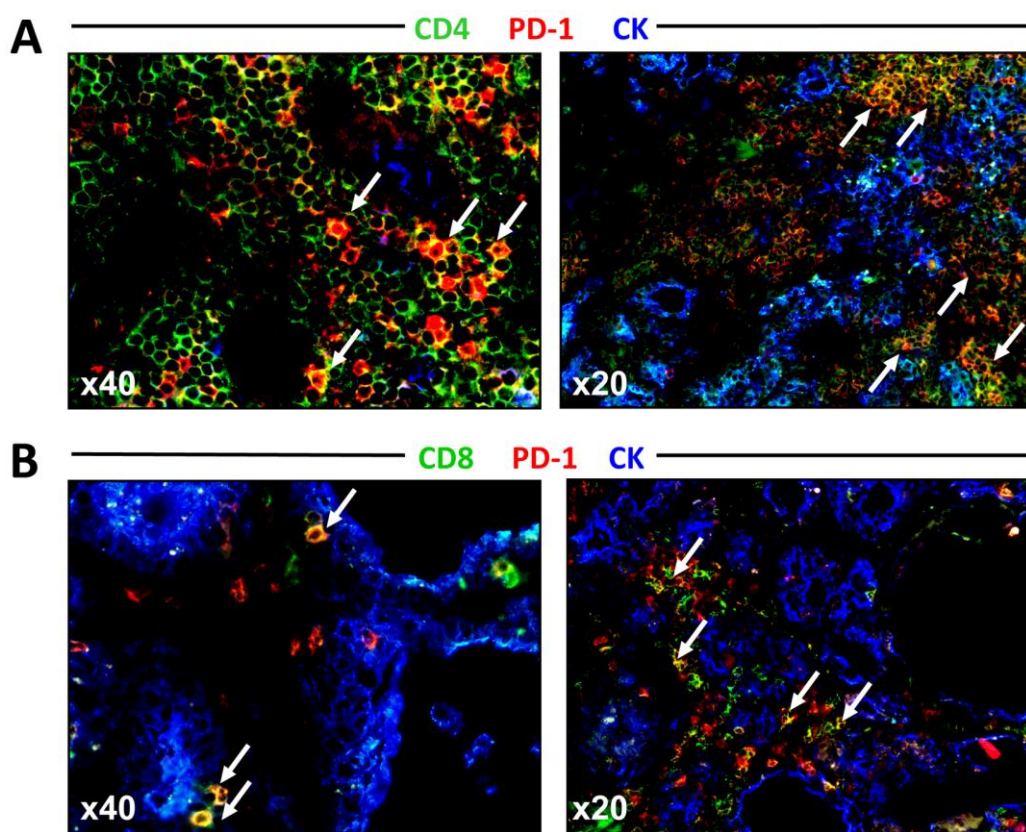


Figura 15. Imágenes representativas de la expresión de PD-1 en linfocitos (A) CD4 y (B) CD8 en secciones de tiroides congeladas de pacientes con enfermedad de Graves. Las flechas blancas marcan linfocitos CD4 y CD8 infiltrantes positivos para PD-1. En estas secciones la expresión de citoqueratina (CK) se utilizó para identificar las células foliculares tiroideas.

La cuantificación mediante IFI confirma el alto porcentaje de expresión de PD-1 en LITs de pacientes con EAT ya descrito previamente mediante citometría de flujo (**Tabla suplementaria 9**). Sin embargo, el porcentaje de linfocitos T PD-1+ cuantificados mediante esta técnica resultó superior al observado previamente mediante citometría de flujo, tanto en células CD4 ($44,5 \pm 14,7$ vs. $61,4 \pm 6,9$; $p <$

RESULTADOS

0,001), como en CD8 ($45,4 \pm 15$ vs. $61,6 \pm 8,3$; $p < 0,01$) (**Figura suplementaria 1**). Una posible explicación para este hecho es que el estudio de PD-1 en secciones de tejido permite la observación del total de linfocitos infiltrantes, sin embargo, el proceso de obtención de la fracción de mLITs podría favorecer la extracción de células con menor expresión de moléculas de adhesión, lo cual podría conllevar un enriquecimiento en los linfocitos menos activados presentes en el tejido, introduciendo de esta manera un sesgo en el análisis.

Si comparamos la expresión de PD-1 en LITs entre muestras de pacientes con EGB y pacientes con HT no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en las poblaciones de linfocitos T CD4 ($63,3 \pm 7,7$ vs. $57,9 \pm 3,6$; $p = 0,438$) y CD8 ($64,2 \pm 7,2$ vs. $57,1 \pm 10,1$; $p = 0,19$), a pesar de esto se observa una tendencia que podría indicar una mayor expresión de PD-1 en las muestras de pacientes con EGB. La ausencia de significación estadística podría deberse al reducido número de muestras, especialmente en el grupo de muestras de pacientes con HT, suponga una limitación importante para el análisis de los resultados.

1.5. Correlación de la expresión de PD-1 en linfocitos y parámetros analíticos

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes incluidos en el estudio de expresión de PD-1 en CMSPs y mLITs. Se recopilaron datos clínicos como el tiempo de la evolución de la enfermedad hasta su intervención, tratamientos farmacológicos previos, o la presencia de oftalmopatía, y también datos analíticos, como los niveles de TSH, T3 y T4 libres para valorar la función tiroidea, o la presencia de autoanticuerpos específicos contra antígenos tiroideos en el momento del diagnóstico (**Tabla 3**).

No se encontró ninguna correlación entre la expresión de PD-1 en CMSPs o mLITs y los parámetros analíticos recogidos, o entre los niveles de TSH, T3 o T4.

La determinación de los anticuerpos anti-TG, anti-TPO y anti-TSH-R se realizó en el momento del diagnóstico en 8 de los 10 pacientes, siendo positivos en el 50%, 88%, y 100% de estos, respectivamente. Debido a que la expresión de PD-1 está relacionada con estados funcionales muy diversos en el conjunto de los linfocitos T, el porcentaje de células periféricas o infiltrantes positivas para este marcador podría servir como una medición indirecta del estado de la respuesta autoinmune. Por ello, se analizó la correlación entre los niveles de los distintos autoanticuerpos y el porcentaje de células PD-1int, PD-1hi y PD-1+ (PD-1int + PD-1hi) en el total de linfocitos CD4 y CD8 y sus subpoblaciones de memoria,

RESULTADOS

tanto en CMSPs como en mLITs. En el compartimento de linfocitos CD4 se encuentra una correlación positiva entre el porcentaje de células naïve PD-1+ en mLITs y los niveles de anticuerpos anti-TPO ($r = 0,73$; $p < 0,05$); así mismo, los niveles de anticuerpos anti-TG se correlacionan positivamente con el porcentaje de células PD-1+ en el total de células CD8 en CMSPs ($r = 0,81$; $p < 0,05$), y con el porcentaje de células PD-1^{int} en el total de células CD8 en mLITs ($r = 0,74$; $p < 0,05$) (**Figura 16A-C**).

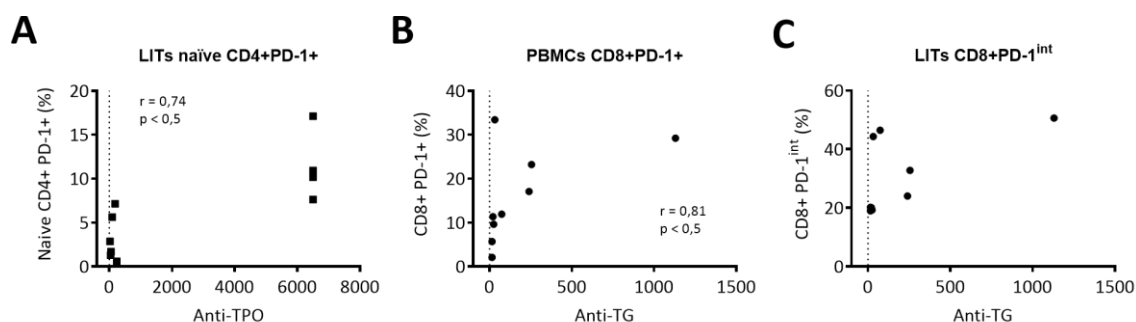


Figura 16. Correlación de los niveles de (A) autoanticuerpos anti-TPO con la expresión de PD-1 en células T naïve infiltrantes, y los niveles de autoanticuerpos anti-TG con (B) la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8 circulantes, o (C) con el porcentaje de linfocitos T CD8 infiltrantes con expresión intermedia de PD-1 (PD-1^{int}).

2. Expresión de PD-L1 y PD-L2 en tiroides

Dada la alta expresión de PD-1 detectada mediante inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo en linfocitos CD4 y CD8 que infiltran el tiroides de pacientes con EAT, se confirma el interés del estudio de la expresión de sus ligandos naturales, PD-L1 y PD-L2.

El análisis su expresión se realiza principalmente mediante inmunofluorescencia indirecta sobre secciones de tejido congelado, aunque también se disponen de datos de expresión mediante citometría de flujo en un reducido número de muestras de pacientes con EGB y BMN, estas forman parte de experimentos posteriores de digestión de tejido tiroideo para su cultivo y estimulación *in vitro*.

RESULTADOS

2.1. Expresión basal en suspensiones celulares

Muestras de tejidos fresco de tiroides de pacientes con EGB o BMN se dispersaron según el protocolo ya descrito. Brevemente, las suspensiones celulares se filtraron para eliminar la mayor parte de restos celulares y las agrupaciones de células parcialmente digeridas, para cada una de estas muestras se preparan cuatro tubos para su análisis mediante citometría de flujo según el protocolo descrito previamente en la sección «Material y métodos». La expresión de PD-L1 y PD-L2 se estudió en suspensiones celulares frescas de pacientes con EGB (n = 3) y BMN (n = 3), un número insuficiente de muestras para realizar un análisis estadístico de los resultados. Debido a esto, los resultados obtenidos son meramente descriptivos, sirviendo solo como guía para la realización de un estudio más amplio mediante inmunofluorescencia indirecta.

Comparadas con las muestras control de pacientes con BMN, en las muestras de pacientes con EGB los CFTs mostraban una expresión superior de HLA de clase I, además de una expresión de HLA-DR aumentada, tanto en cuanto a porcentaje de células positivas, como a su MFI. Los CFTs de muestras de tiroides autoinmunes presentaban un mayor porcentaje de expresión de PD-L1 comparados con los controles, aunque en ambos casos las células positivas mostraban una baja intensidad de la señal. En cuanto a PD-L2, no se detectó su expresión en CFTs de tiroides controles o autoinmunes, siendo su señal en todos los casos equiparable a la obtenida mediante el correspondiente control de isotipo (**Figura suplementaria 2A-B**).

2.2. Expresión en secciones de tejido congelado

Con el objetivo de corroborar los resultados iniciales observados en el estudio piloto mediante citometría de flujo, se analizó la expresión de PD-L1 y PD-L2 por tinción de inmunofluorescencia indirecta en secciones de tiroides criopreservados.

La expresión de PD-L1 se estudió en muestras de pacientes con BMN (n = 16), y pacientes con EAT, tanto EGB (n = 17) como HT (n = 5). La baja expresión de PD-L1, incluso en tejidos control empleados para su titulación, como el ganglio linfático o el bazo, y la baja afinidad de los anticuerpos comerciales, requirió de un gran número de pruebas para identificar los mejores reactivos y establecer las mejores condiciones de tinción. Para su optimización se probaron múltiples variantes del protocolo de tinción con distintas condiciones de incubación y combinación de anticuerpos. Se probaron hasta cuatro anticuerpos primarios

RESULTADOS

anti-PD-L1, de ellos solo los anticuerpos primarios producidos por Biolegend y Cell Signaling (**Tabla suplementaria 10**) se consideraron aptos para su uso en base a las pruebas realizadas en secciones de tejidos control.

En el caso de PD-L2, se estudió su expresión en muestras de pacientes con BMN (n = 6), y pacientes con EAT, EGB (n = 5) y HT (n = 4). De forma análoga a lo explicado anteriormente en el caso de PD-L1, se titularon y probaron en tejidos control hasta dos anticuerpos primarios distintos (**Tabla suplementaria 11**). En este caso ambos anticuerpos se consideraron aptos para su uso mediante inmunofluorescencia indirecta.

2.2.1. Expresión PD-L1 y PD-L2: IFI simple

En primer lugar, para estudiar la expresión de ambos ligandos en tiroides se estudiaron los tejidos correspondientes según el protocolo de tinción descrito en la sección «Material y métodos».

Mediante IFI se confirmó la expresión de PD-L1 en secciones de tiroides. En base a la morfología y a su disposición en el tejido, la mayor parte de las células positivas se identificaron como CFTs por su característica disposición como epitelio simple formando los folículos del tiroides (**Figura 17A**). En algunas muestras se observó un número variable de células PD-L1 positivas con aspecto de macrófagos, situadas en la luz de algunos folículos o en el espacio entre los capilares y el epitelio. Se observó la presencia de CFTs PD-L1+ en un 86% de las muestras de pacientes con EAT estudiadas, mientras que solo el 25% de las muestras de pacientes con BMN mostraban células PD-L1+, generalmente en menor número que en el caso de tejidos. Es poco frecuente observar CFTs PD-L1+ aislados, siendo lo más normal encontrar folículos formados por un porcentaje variable de CFTs positivos; es probablemente debido a este hecho, que en estos tejidos la distribución de PD-L1 tenga generalmente un patrón parcheado, con zonas de alta expresión alternadas con zonas en la que la mayor parte de los folículos y los CFTs que los forman son negativos. Debido a que la expresión de PD-L1 se observó principalmente en CFTs y que, además, esta parecía variar en función del diagnóstico de los pacientes, se decidió analizar en mayor profundidad este fenómeno. Para ello, la expresión de PD-L1 en CFTs identificadas en base a su morfología fue evaluada a ciegas, sin conocer el diagnóstico del paciente al que pertenecían, por dos observadores independientes. A cada tejido se le asignó una puntuación correspondiente a una escala semi-cuantitativa, cuyos criterios fueron los siguientes:

RESULTADOS

0: negativo, ausencia de expresión de PD-L1 en CFTs en ningún folículo de la sección evaluada.

1: por lo menos un folículo en el cual el 25% de CFTs fuesen positivos para PD-L1

2: más de un folículo tiroideo, pero menos del 50% de estos, debían presentar al menos un 25% de CFTs positivos para PD-L1

3: más del 50% de los folículos observados presentaban al menos un 25% de CFTs positivos para PD-L1

Las puntuaciones asignadas independientemente por cada observador presentaron una concordancia del 76% entre sí, por lo que a partir de ambas se calculó la media para cada una de las muestras (**Tabla suplementaria 12**). Se detectó la expresión de PD-L1 en CFTs en 13 de las 16 muestras de pacientes con EGB (81%) y en todas las muestras de pacientes con HT, siendo la puntuación media asignada entre los dos observadores de 0,8 y 1,75 para cada grupo, respectivamente. Por el contrario, en el grupo de muestras control de tiroides no autoinmunes 12 de los 16 tejidos analizados (75%) fueron negativos en cuanto a la expresión de PD-L1 en CFTs, obteniéndose una puntuación media de 0,2 para este grupo, y no superándose en ninguna de las secciones observadas una puntuación de 1, con lo que las muestras de BMN, en aquellos casos en los que son positivas, presentaron niveles de expresión reducidos (**Figura 17B**).

Por el contrario, la expresión de PD-L2 mediante IFI fue negativa en todos los tejidos estudiados independientemente del diagnóstico de estos, y del anticuerpo empleado para su detección. Estos resultados confirmaron los obtenidos mediante citometría de flujo en suspensiones de CFTs tras la digestión de tejido fresco.

RESULTADOS

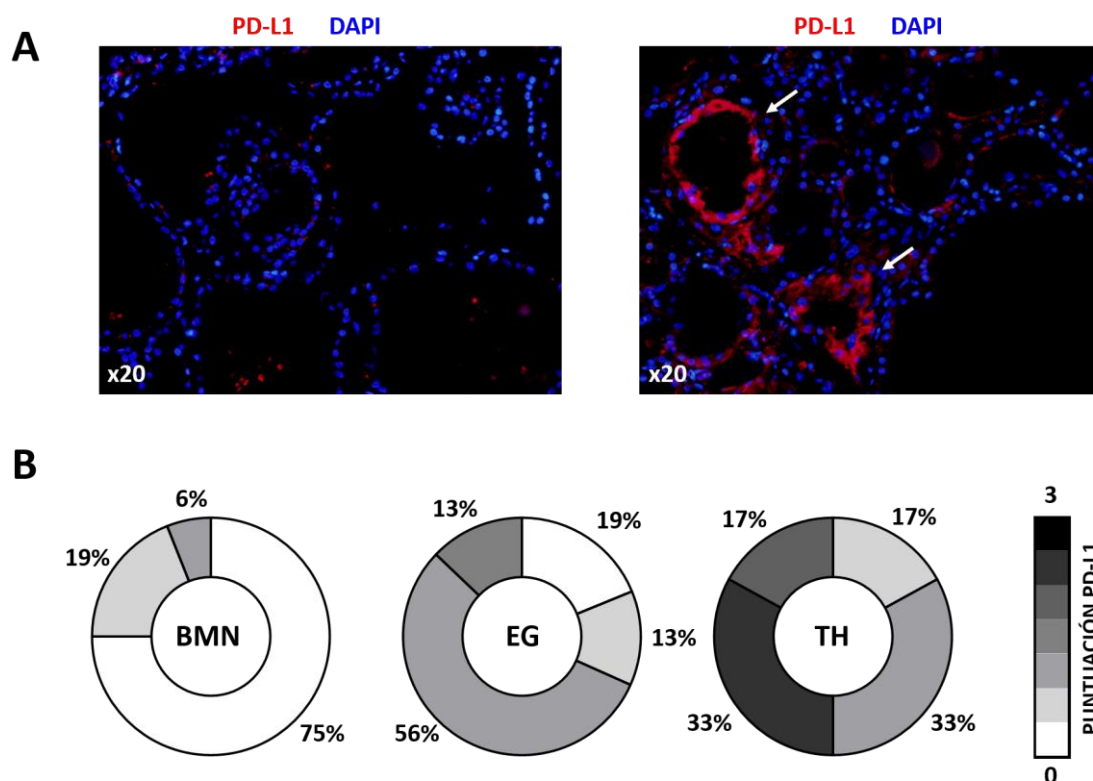


Figura 17. (A) Imágenes de inmunofluorescencia indirecta que muestran una sección de tiroides de un paciente con bocio multinodular (izquierda) negativa para la expresión de PD-L1, y una sección de tiroides de un paciente con enfermedad de Graves (derecha) en la que se puede observar la presencia de folículos en los que la mayoría de las CFTs son PD-L1+ (flechas blancas). (B) Distribución de la puntuación asignada para la expresión en tirocitos de PD-L1 en las glándulas estudiadas y clasificadas según el diagnóstico.

2.2.2. Distribución de PD-L1: IFI triple

Para confirmar la expresión de PD-L1 por parte de los CFTs, y estudiar su posible relación con otros tipos celulares, se realizaron una serie de tinciones triples mediante IFI. Un número reducido de muestras representativas de cada grupo de pacientes fueron seleccionadas, y teñidas empleando tres protocolos con diferentes combinaciones de anticuerpos primarios y sus correspondientes anticuerpos secundarios. Las proteínas estudiadas en cada uno de ellos se muestran en la **Tabla 5**.

RESULTADOS

Tabla 5. Combinación de anticuerpos empleada en cada protocolo de inmunofluorescencia indirecta triple para el estudio de colocalización de PD-L1 con distintos marcadores de CFTs y/o CMSPs.

Protocolo #1	Protocolo #2	Protocolo #3
PD-L1	PD-L1	PD-L1
TPO	TPO	TPO
CD45	HLA-DR	PD-1

La detección combinada de PD-L1, TPO y CD45 permitió en primer lugar confirmar los resultados observados inicialmente mediante IFI simple, en los que la mayor parte de células PD-L1+ se identificaron como CFTs en base a su disposición y morfología. La tinción para de PD-L1 es negativa en la mayor parte de los tejidos control, pero positiva en muestras de pacientes con EAT, y su expresión está limitada principalmente a CFTs TPO+. La presencia de hiperplasia folicular es una característica conocida de las glándulas de pacientes con EGB no bien tratados, estos cambios morfológicos de los CFTs pueden acompañarse de variaciones en los niveles de expresión de TPO (**Figura 18A**), aunque no pudo observarse una relación directa entre estos cambios y la expresión de PD-L1. Por otro lado, todas las glándulas que presentaban CFTs PD-L1+ en esta serie mostraban además infiltrados CD45+ de distinto grado, aunque no se apreció una relación directa entre la localización de infiltrados focales y la presencia CFTs PD-L1+ en los folículos circundantes (**Figura 18A-B**).

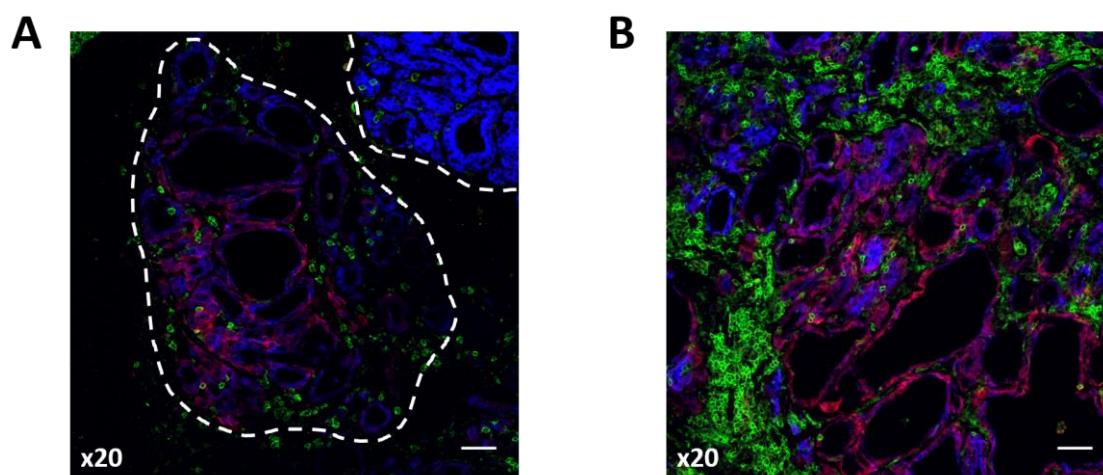


Figura 18. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta representativas de secciones de tiroides de pacientes con enfermedades autoinmunes del tiroides que muestran (A) zonas delimitadas con línea discontinua con marcadas diferencias en la morfología y expresión de TPO en tirocitos, y (A-B) CFTs TPO+PD-L1+ asociados a áreas con distinto grado de infiltración linfoide. Las marcas de escala equivalen a 50µm.

RESULTADOS

La expresión de moléculas de HLA de clase II, y en particular de HLA-DR, es característica de células presentadoras de antígeno, como macrófagos, células dendríticas o linfocitos B, pero también puede darse en linfocitos T activados, células endoteliales, o células epiteliales activadas por IFN- γ . Como ya se ha comentado anteriormente, la expresión de HLA de clase II en tirocitos de glándulas autoinmunes, o con tiroiditis focal, se conoce desde hace años, y su inducción se cree mediada principalmente por IFN- γ , citocina que además es la principal citocina inductora de PD-L1 de acuerdo con la bibliografía. Por ello analizó la relación entre la expresión de estas moléculas en estos tejidos. En la serie analizada, las secciones de tejidos autoinmunes, pero no de controles, presentaban una expresión difusa de HLA-DR en CFT que abarcaba la gran parte del área evaluada, y que contrastaba con la expresión parcheada de PD-L1, siendo ésta mucho más reducida en extensión e intensidad. Esta expresión podía solaparse en ocasiones observándose algunos CFTs HLA-DR+ PD-L1+, pero sin llegar a ser la norma general, ya que las zonas con mayor de expresión de PD-L1 no presentan necesariamente alta expresión de HLA-DR (**Figura 19**).

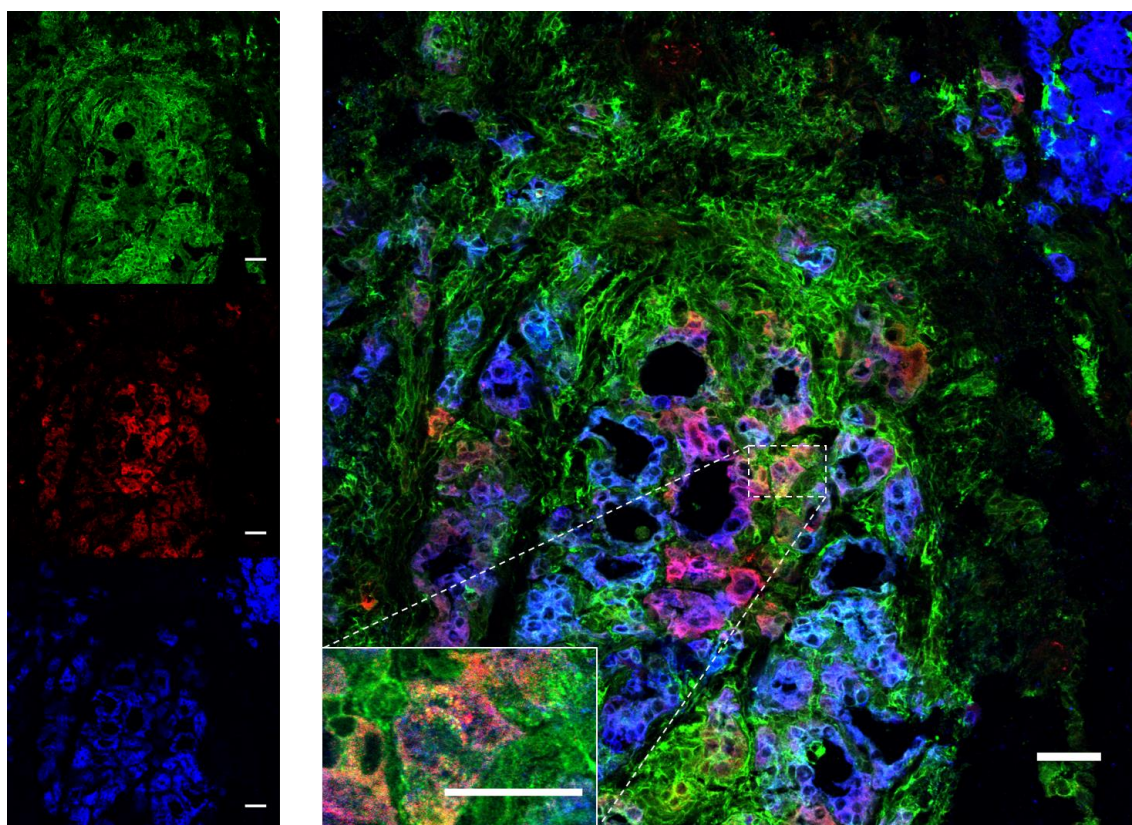


Figura 19. Imagen de inmunofluorescencia indirecta representativa que muestra los distintos patrones de expresión de HLA-DR y PD-L1 en CFTs en secciones de tiroides de pacientes con enfermedades autoinmunes. La zona ampliada corresponde con tirocitos TPO+ que coexpresan PD-L1 y HLA-DR con alta intensidad. Las marcas de escala equivalen a 50 μ m.

RESULTADOS

Anteriormente demostramos mediante citometría de flujo e IFI la alta expresión de PD-1 en linfocitos infiltrantes en pacientes con EAT, por ello se estudió de forma simultánea la expresión de esta molécula y de su receptor, PD-L1, en esta serie de muestras. Si bien no se utilizó de un marcador linfocitario, la mayor parte de las células PD-1+ podían identificarse en base a su morfología como linfocitos infiltrantes, siendo su distribución similar a la ya observada en las tinciones de IFI doble para CD4 + PD-1 y CD8 + PD-1. La presencia de células de aspecto linfoide PD-1+ era abundante en todos los tejidos de pacientes con EAT, aunque el número de ellas variaba entre muestras. La presencia de infiltrados focales o difusos con células PD-1+ parecía no determinar la expresión de PD-L1 en los CFTs de folículos colindantes. A pesar de esto, si pudieron observarse algunas zonas en las que células PD-1+ se encontraban en la vecindad de zonas con abundantes CFTs PD-L1+ (**Figura 20**).

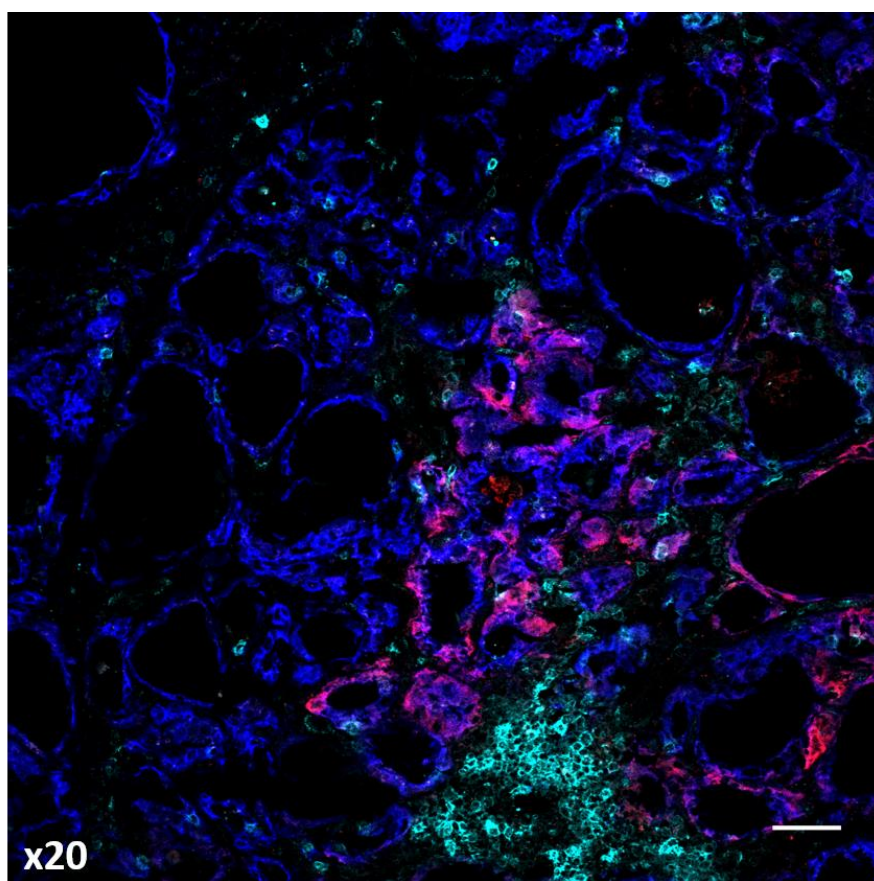


Figura 20. Imagen de inmunofluorescencia indirecta representativa de una sección de tiroides de un paciente con enfermedad de Graves que muestra un área de expresión de PD-L1 en CFTs próximo a un infiltrado focal PD-1+. La marca de escala equivale a 50µm.

RESULTADOS

3. Expresión de CMTM4 y CMTM6 en tiroides

CMTM4 y CMTM6 son proteínas que pertenecen a la superfamilia de moléculas tipo quimiocina. CMTM4 y CMTM6 se expresan de manera ubicua en la mayor parte de los tejidos humanos. Tras la endocitosis de las moléculas de PD-L1 expresadas en superficie CMTM6 inhibe su poliubiquitinación, protegiendo a PD-L1 de la proteólisis y favoreciendo su reciclaje. Por su parte, CMTM4 está principalmente implicada en la regulación del ciclo celular, actuando como inhibidor de la replicación al inducir una acumulación de las células en la fase G2/M, sin embargo, recientemente se ha descrito su posible participación en la regulación de PD-L1, sobre todo en ausencia de CMTM6 (150–152).

Con el objetivo de investigar si las diferencias de expresión de PD-L1 observadas entre tejidos control y tejidos de pacientes con EAT podían deberse a alteraciones en su regulación postraducciona, se estudió mediante IFI simple la expresión de CMTM4 y CMTM6 en una serie de secciones de pacientes con BMN (n = 5) y pacientes con EGB (n = 7). Tanto CMTM4 como CMTM6 se expresaban con alta intensidad en CFTs de todos los tejidos estudiados, siendo independiente tanto su patrón de expresión como su intensidad del diagnóstico inicial, un ejemplo de esta expresión se muestra en la **Figura 21A-B**. Estos altos niveles de expresión concuerdan con lo descrito a nivel transcripcional por la base de datos GTEx (<https://m.gtexportal.org>), en la que el número de transcritos de CMTM4 y CMTM6 en el tiroides, cuantificados mediante ARNseq, están entre los más altos de todos los tejidos estudiados.

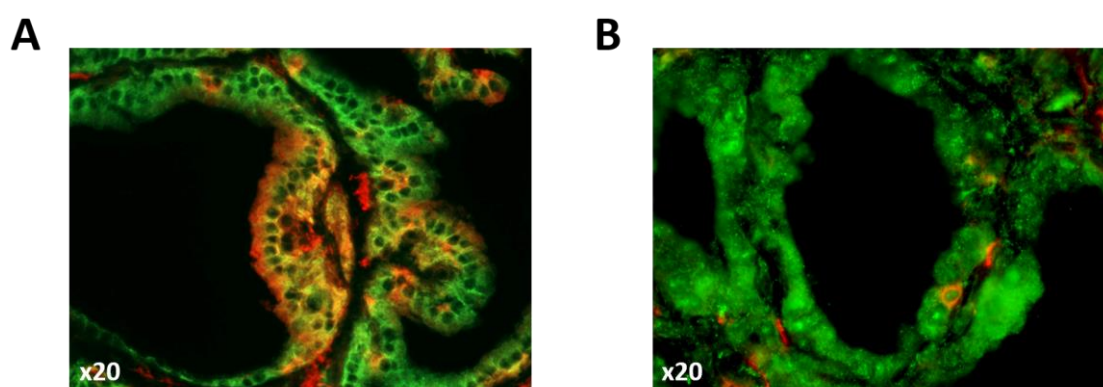


Figura 21. Secciones de tiroides de pacientes con enfermedad de Graves que muestran la expresión de (A) CMTM4 y (B) CMTM6 en células epiteliales tiroideas.

4. Expresión de IFN de tipo I y II en tiroides

El análisis transcriptómico de glándulas tiroideas autoinmunes ha demostrado la presencia de una signatura de señalización por IFN de tipo I y II en tiroides de pacientes con EAT (11). Se ha observado que los CFTs de glándulas que presentan tiroiditis focal, o infiltrados extensos como consecuencia de una enfermedad autoinmune bien establecida, pueden presentar expresión ectópica de HLA de clase II, la cual se ha relacionado con la producción local de distintos tipos de interferones. A su vez, se ha demostrado que el IFN- γ es el principal inductor de PD-L1 en diversos tipos celulares, pudiendo además presentar sinergia con el efecto de otras citocinas. Mediante IFI triple en secciones de tiroides hemos confirmado que tanto HLA-DR como PD-L1 se expresan en CFTs de pacientes con EGB, solapándose su expresión en algunas de estas células, es probable que la inducción de ambas moléculas en estos tejidos este principalmente regulada por la presencia de IFN- γ . Debido a ello se consideró de interés estudiar la expresión de distintos tipos de IFNs en muestras de tiroides de controles y de pacientes con EAT.

4.1. Expresión génica relativa de IFNs tipo I y II

Según lo descrito en el apartado correspondiente de Material y métodos, se procedió a determinar la expresión relativa de los genes de la familia de los interferones IFNA1, IFNA4, IFNB1, IFNG, además del gen SOCS1 inducido de forma temprana por IFN- γ , y que participa en un circuito de regulación negativa que controla su señalización. El estudio de su expresión se realizó mediante qPCR en muestras de ARN obtenidas de tejido congelado de las glándulas empleadas anteriormente para el análisis de la expresión de PD-L1 mediante IFI.

Se observó un aumento significativo de la expresión relativa de IFNG en muestras de pacientes con HT con respecto a muestras de pacientes con EGB ($5,6 \pm 3,6$ vs. $1,2 \pm 2,1$, $p < 0,05$) y a muestras control de BMN ($5,6 \pm 3,6$ vs. $0,8 \pm 1,7$, $p < 0,05$) (**Figura 22A**), esto es probablemente debido a la mayor extensión de los infiltrados presentes en estos tejidos y al aumento de la inflamación local que esto supondría. Aunque pudo observarse un ligero aumento de la expresión en muestras de pacientes con EGB frente a controles, este no fue estadísticamente significativo. No existió ninguna diferencia en la expresión relativa de los genes de IFNs de tipo IFNA1, IFNA4 e IFNB1 entre los distintos grupos de glándulas según su diagnóstico. En cuanto a SOCS1, se observa una expresión relativa

RESULTADOS

media superior en muestras de pacientes con HT, lo cual podría estar relacionado con la mayor presencia de IFNG, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

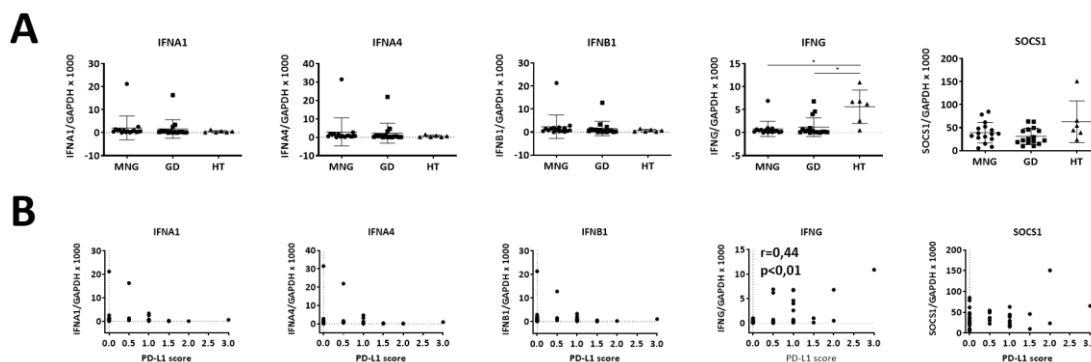


Figura 22. Análisis de la expresión IFNs de tipo I y II en tiroides de controles y pacientes con EAT. (A) Expresión relativa de IFNA1, IFNA4, IFNB1, IFNG y SOCS1 en tiroides de pacientes con BMN, EG y TH. (B) Correlación entre la expresión de los genes estudiados y la puntuación asignada a cada muestra en base a la expresión de PD-L1 en tirocitos.

4.2. Correlación con la expresión de PD-L1

La expresión de PD-L1 en CFTs no está restringida a tejidos de pacientes con EAT bien establecidas, sino que también se observó a bajos niveles en algunas muestras de tiroides con BMN, principalmente en aquellos en los que se observó la presencia de tiroiditis focal. Por ello se estudió la correlación de cada uno de los genes cuya expresión relativa se determinó mediante qPCR con la expresión de PD-L1 según la puntuación asignada a cada muestra mediante IFI simple, y cuyos criterios se explicaron anteriormente. Existe una correlación positiva entre la expresión relativa de IFNG y la puntuación asignada para la expresión de PD-L1 ($r=0,44$, $p < 0,01$), siendo esta independiente del diagnóstico de las muestras (**Figura 22B**). Por el contrario, no se observó ninguna correlación entre la expresión de PD-L1 y cualquier de los otros genes estudiados. Esta observación indica que es probable que el IFN- γ sea el responsable de inducir la expresión de PD-L1 en CFTs de forma análoga a lo postulado en el caso de HLA de clase II, y que, aunque el fenómeno es común en glándulas de pacientes con EAT, este puede darse en tejido con tiroiditis focal, aunque esta sea insuficiente para haber producido síntomas relacionados en estos pacientes.

5. Inducción in vitro de la expresión de PD-L1 y PD-L2 por efecto de IFN- γ , cinética y relación con HLA de clase I y II

En experimentos anteriores demostramos que tiroides de pacientes con EAT presentan una expresión aumentada de PD-L1, principalmente en CFTs, mientras que su presencia se observa en raras ocasiones en muestras control de pacientes con BMN. Además, la clasificación de estos tejidos mediante una escala semi-cuantitativa en base a dicha expresión, y su correlación positiva con la expresión relativa de IFNG mediante qPCR, sugirieron que esta citocina podría tener un papel en la inducción de PD-L1 en CFTs.

Para comprobar el posible efecto del IFN- γ sobre la expresión de PD-L1 y PD-L2 se realizaron una serie de cultivos celulares siguiendo el protocolo detallado en la sección correspondiente de Material y métodos. Brevemente, tanto cultivos de líneas celulares derivadas de tiroides, como cultivos primarios de CFTs, fueron cultivados en frascos de 25cm² y estimulados con diferentes dosis de IFN- γ durante 24 y 48 horas, tras lo cual se analizaron los cambios PD-L1 y PD-L2 a nivel de expresión en de proteína en superficie mediante citometría de flujo, y a nivel de expresión génica mediante qPCR.

5.1. Líneas celulares

Se emplearon las líneas celulares HT93 (n = 3), TPC-1 (n = 3) y HTH93 (n = 3), todas ellas derivadas de tiroides. En el estudio de las líneas celulares no es posible comparar entre ellas la MFI para cualquiera de los marcadores empleados, ya que entre los experimentos realizados empleando HT93 y las líneas celulares TPC-1 y HTH83, hubo un cambio en la plataforma de citometría con la que cuenta el laboratorio. Para hacer comparables los datos entre las tres series de cultivos, en su lugar se representa la magnitud de variación de la MFI para cada muestra con respecto a lo considerado la situación basal, que en este caso son las muestras sin estimular (0U/mL IFN- γ) 24 horas postestimulación.

Todas las líneas celulares expresan de forma basal HLA de clase I, cuya expresión aumenta tras la estimulación con IFN- γ . La inducción de HLA de clase I se observa ya a la concentración más baja utilizada (25U/mL), sin que el uso de concentraciones mayores de IFN- γ tengan un efecto mayor sobre su aumento de expresión. En los tres casos la expresión es ligeramente mayor en las muestras estimuladas durante 48 horas con respecto a aquellas estimuladas durante 24

RESULTADOS

horas, pero estos cambios no son significativos. Al contrario que lo descrito para HLA de clase I, HLA-DR no se expresa de forma basal en ninguna de las líneas celulares utilizadas. En el caso de HT93 y TPC-1, ambas procedentes de células más diferenciadas, la estimulación con IFN- γ producía la expresión de HLA-DR en la totalidad de las células cultivadas, esta inducción parecía no presentar una respuesta dosis-dependiente, aunque aumentaba a las 48 horas con respecto a las mismas muestras estimuladas durante 24 horas. Por otro lado, la línea HTH83 tampoco expresaba HLA-DR en la situación basal, pudiendo inducirse por IFN- γ , aunque solo llega a expresarse en un 40% de las células a las 24 horas y hasta en un 70% al cabo de 48 horas de post-estimulación. El aumento de expresión de HLA-DR a las 24 horas, al igual que lo ocurrido en las líneas HT93 y TPC-1, no presentaba una respuesta dosis dependiente, pero este fenómeno sí que se observó tras 48 horas de estimulación donde la expresión aumentaba al emplear concentraciones crecientes de IFN- γ (**Figura suplementaria 3**).

Las tres líneas celulares expresaban de forma basal PD-L1 en ausencia de estímulos exógenos, aumentando su expresión en respuesta al tratamiento con IFN- γ . Al igual que en el caso de HLA de clase I y HLA-DR, el incremento de la expresión tras 24 horas de estimulación no presentaba diferencias entre las distintas concentraciones de IFN- γ empleadas. La respuesta al IFN- γ a las 48 horas variaba ligeramente entre las líneas celulares, mientras que HT93 sufría un pequeño aumento de la expresión de PD-L1 con respecto a las 24 horas, las líneas TPC-1 y HTH83 se caracterizaban por una disminución de la expresión, muy leve en el caso de HTH83, pero más marcada en el caso de TPC-1. En el caso de las líneas HT93 y TPC-1 si era posible observar una respuesta dosis-dependiente al IFN- γ en las muestras estimuladas durante 48 horas. En cuanto a la magnitud de la inducción de PD-L1, la MFI de las muestras estimuladas aumentaba un orden de 2-3 veces con respecto a su respectiva situación basal, ligeramente inferior al incremento observado en el caso de HLA de clase I, y mucho menor al de HLA-DR, cuya MFI aumenta del orden de 5-10 veces y 10-30 veces con respecto a la situación basal a las 24 y 48 horas postestimulación, respectivamente (**Figura 23A**).

RESULTADOS

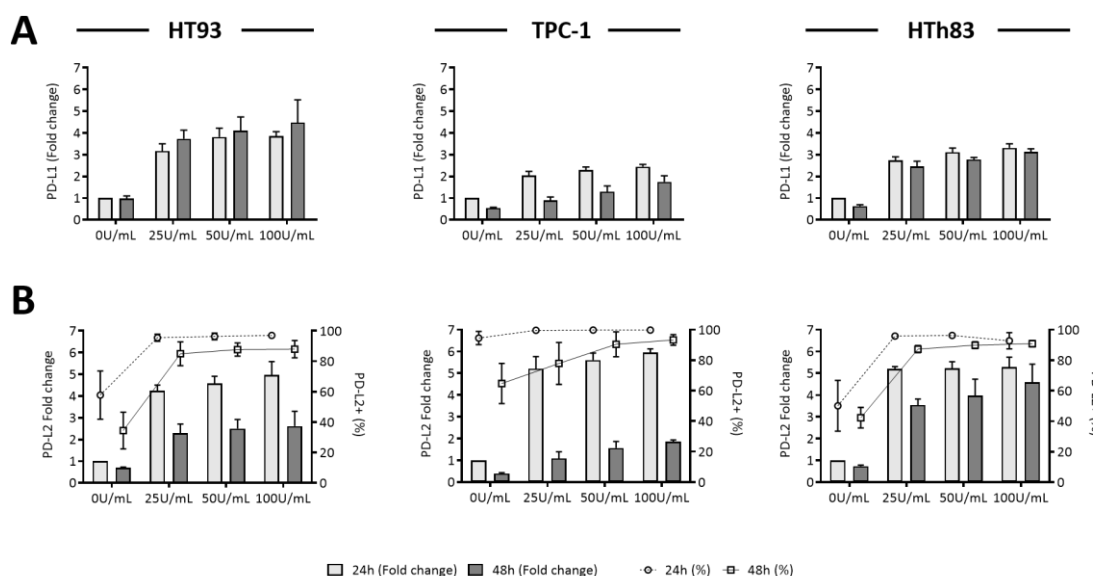


Figura 23. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de PD-L1 y PD-L2 en respuesta a la estimulación mediante distintas dosis de IFN- γ durante 24 y 48 horas en las líneas celulares HT93, TPC-1 y HTH83. En la fila superior (A) se muestra la expresión de PD-L1, y en la fila inferior (B) la expresión de PD-L2. Prácticamente el 100% de las tres líneas celulares expresaban PD-L1, por lo que solo se muestran el incremento de la MFI. En el caso de PD-L2 el incremento de la MFI con respecto a la situación basal se representa mediante barras en el eje Y izquierdo, mientras que el porcentaje de células positivas en cada condición se representa mediante puntos unidos por líneas en el eje Y derecho.

En el caso de PD-L2, existía una expresión basal, de menor intensidad y que no se daba la totalidad de las células analizadas, variando entre un 60% de células positivas en la línea HT93 y el 90% en la línea HTH83. La expresión, tanto a nivel de porcentaje de células positivas como de variación del MFI con respecto a la muestra basal, aumentaba en respuesta al INF γ tras 24 horas de estimulación, de nuevo no se evidenciaban cambios dependientes de la concentración de IFN- γ empleado. Curiosamente, el incremento de la expresión de PD-L2 a las 24 horas postestimulación, cuando se compara la MFI con cada situación basal correspondiente, es superior a la inducción observada para PD-L1 en las tres líneas celulares. Al contrario que lo observado con el resto de los marcadores estudiados, PD-L2 presentaba una disminución la expresión en las tres líneas celulares a las 48 horas postestimulación, siendo esta reducción más marcada en la línea HT93, y especialmente en la TPC-1, que llega a reducir la expresión de PD-L2 entre 4 y 5 órdenes de magnitud con respecto a la misma situación estimulada durante 24 horas (**Figura 23B**).

La inducción de HLA-DR, PD-L1 y PD-L2 en respuesta al IFN- γ se estudia en las mismas muestras mediante qPCR. Los resultados se muestran en los tres casos

RESULTADOS

como la expresión relativa de cada uno de los genes con respecto al gen de referencia GAPDH, y a su vez se calcula el cambio de esta expresión relativa con respecto a la muestra basal (0U/mL IFN- γ – 24h). En el caso del locus HLA-DR, para confirmar su inducción se estudia la transcripción del gen HLADRA, que codifica para la cadena α de la proteína (**Figura suplementaria 4**). A nivel de ARN se produce un aumento de su transcripción en respuesta a la estimulación mediante IFN- γ en las tres líneas celulares, aunque su expresión con respecto al gen GAPDH varía entre ellas, y su respuesta en el tiempo no coincide con las cinéticas vistas a nivel de expresión de HLA-DR en superficie en las líneas TPC-1 y HTH83. En la línea HT93 la inducción de HLA-DRA es mayor en las muestras estimuladas durante 48 horas con respecto a las estimuladas durante 24 horas, lo cual coincide con los resultados obtenidos mediante citometría de flujo. En la línea TPC-1 la expresión relativa de HLADRA es máxima con la concentración de IFN- γ más baja empleada, al igual que lo visto en el estudio de HLA-DR mediante citometría. Sin embargo, la expresión relativa de HLADRA disminuye a las 48 horas post-estimulación, mientras que a nivel de expresión en superficie se observaba el efecto contrario. Esta línea celular presenta además la mayor inducción de la expresión relativa de HLADRA con respecto a la situación basal de las tres líneas. En el caso de la línea HTH83 la expresión relativa de HLADRA en las muestras estimuladas es la menor observada en las tres las líneas, lo cual coincide con lo observado mediante citometría de flujo. A pesar de la baja inducción de HLADRA con respecto al gen de referencia, la variación con respecto a la muestra basal es comparable con de las líneas HT93 y TPC-1. La respuesta a IFN- γ , al igual que en TPC-1, produce el efecto contrario a nivel transcripcional que el observado a nivel de expresión de HLA-DR en superficie, su expresión aumenta a las 24 horas post-estimulación disminuyendo de nuevo tras 48 horas.

En cuanto a PD-L1, la mayor inducción a nivel transcripcional con respecto a la situación basal se obtiene en la línea HT93, y la menor en la línea TPC-1, coincidiendo con los resultados obtenidos previamente mediante citometría. Con respecto a la cinética de expresión de mRNA PD-L1 en el tiempo, los resultados obtenidos para la línea celular HT93 coinciden con los observados mediante citometría, con una mayor expresión a las 48 horas con respecto a las 24 horas post-estimulación (**Figura 24A**). Sin embargo en las líneas TPC-1 y HTH83, la respuesta frente IFN- γ difiere a nivel de expresión de mRNA y de la proteína, en la primera de ellas la expresión en superficie de PD-L1 es máxima a las 24 horas independientemente de la dosis de IFN- γ empleada, para disminuir a las 48 horas post-estimulación, sin embargo a nivel de mRNA no se observan diferencias entre los distintos tiempo de estimulación; por otro lado, la línea HTH83 muestra un

RESULTADOS

comportamiento opuesto, con un gran aumento de los niveles de PD-L1 mRNA a las 24 horas que descienden de nuevo, y a todas las concentraciones de IFN- γ empleadas, a las 48 horas, mientras que a nivel de la expresión en superficie esta es estable en todas las situaciones estudiadas independientemente del tiempo del estimulación y la concentración de IFN- γ .

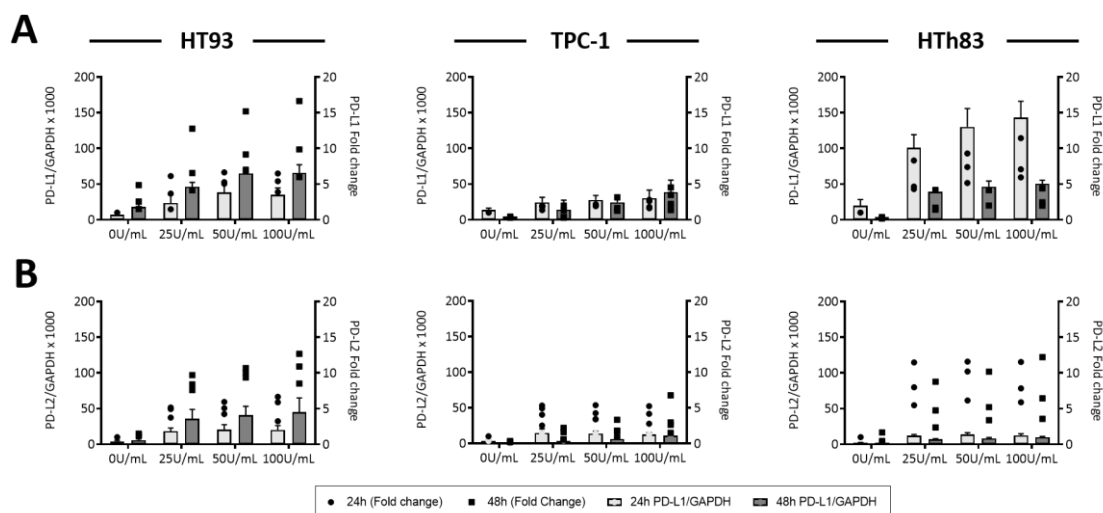


Figura 24. Análisis mediante qPCR de la expresión génica relativa de PD-L1 y PD-L2 en respuesta a la estimulación mediante distintas dosis de IFN- γ durante 24 y 48 horas en las líneas celulares HT93, TPC-1 y HTH83. En la fila superior (A) se muestra la expresión de PD-L1, y en la fila inferior (B) la expresión de PD-L2. En cada gráfica, en el eje Y izquierdo se representa mediante barras la expresión génica relativa de PD-L1 o PD-L2 normalizada con respecto a GAPDH, y en el eje Y derecho se representa mediante puntos el incremento de expresión con respecto a la situación basal.

De forma general, la expresión de PD-L2 a nivel de mRNA es menor que la de PD-L1, coincidiendo con lo observado mediante citometría de flujo (**Figura 24B**). La línea HT93 es la única de las tres que presenta una cinética opuesta entre la expresión de mRNA y de proteína en superficie, a nivel transcripcional la expresión aumenta a las 48 horas con respecto a las 24 horas post-estimulación, mientras que, a nivel de expresión de la proteína, esta disminuye significativamente a las 48 tras el tratamiento con IFN- γ , e independientemente de la dosis utilizada. Por otro lado, las líneas TPC-1 y HTH83 presentan un comportamiento similar entre la expresión de la mRNA y de proteína en superficie en todas las situaciones de cultivo estudiadas.

En resumen, las tres líneas celulares empleadas expresaban de manera basal HLA de clase I pero no HLA de clase II, a pesar de esto, y en concordancia con la literatura disponible, la estimulación con INF γ producía el aumento de los niveles

RESULTADOS

de HLA de clase I, y la expresión de HLA de clase II en todas ellas. Todas ellas presentaban además expresión basal de PD-L1, y a intensidades más bajas, de PD-L2, ambas moléculas resultaron igualmente inducibles tras la estimulación mediante INF γ . Es necesario tener en cuenta que la magnitud de la inducción para cada una de estas proteínas variaba entre las tres líneas celulares utilizadas en función del tiempo de estimulación y la concentración de INF γ utilizada.

5.2. Cultivos primarios

Se realizó la estimulación *in vitro* de muestras de CFTs obtenidas de tiroides de pacientes con BMN (n = 3) como controles y de pacientes con EGB (n = 3). El análisis de los datos es similar al realizado para las líneas celulares, con la salvedad de que, para el cálculo de la variación de expresión de cada marcador se considera la muestra de CFTs no cultivados y obtenidos el mismo día de la digestión del tejido como referente basal.

Los CFTs expresan de forma basal HLA de clase I, aumentando esta con la estimulación con IFN- γ . El incremento de la expresión es similar en muestras de pacientes con MGN y con EGB tras 24 horas de estimulación, aunque tras 48 horas el aumento con respecto a la situación basal es bastante mayor en muestras de BMN. En ambos tipos de muestra no se observa un efecto dosis-dependiente con respecto a la concentración de IFN- γ utilizada (**Figura 25A**). Si comparamos los incrementos de la expresión de HLA de clase I con los obtenidos previamente en las líneas celulares, vemos que la inducción que se produce en cultivos primarios es muy superior, del orden de 15 veces en EGB y 25-30 en BMN a las 48 horas, frente al aumento de 3-6 veces de la expresión con respecto a la situación basal en las líneas celulares tras el mismo período de estimulación. Al igual que en las líneas celulares, los CFTs primarios en condiciones fisiológicas normales no expresan HLA de clase II, es por ello que la expresión en las muestras de BMN es mínima, mientras que entorno al 20% de los CFTs de pacientes con enfermedad de Graves expresaban HLA-DR de forma basal en los tejidos analizados. En ambos casos HLA-DR aumenta su expresión tras la estimulación con IFN- γ , aunque la respuesta y la cinética de inducción difieren en CFTs de controles y de pacientes con EGB (**Figura 25B**). Los cultivos primarios de CFTs de pacientes con BMN no sufren cambios en la expresión de HLA-DR tras 24 horas de estimulación con IFN- γ . Sin embargo, tras 48 de cultivo se pudo observar un incremento dosis-dependiente de la expresión, tanto a nivel de porcentaje de células positivas, como de variación de la MFI con respecto a la muestra basal. Curiosamente, en el caso de las muestras de EGB, si bien no había

RESULTADOS

un aumento del porcentaje de células positivas en ausencia de IFN- γ , sí que se constató un aumento de la MFI de estas muestras con respecto a sus respectivas situaciones basales. Tras 24 horas de estimulación, y al contrario que en los cultivos de BMN, los CFTs sufren un incremento aún mayor de la expresión de HLA-DR, aunque este fue principalmente a nivel de la MFI y no del porcentaje de células positivas, cuyo aumento fue mínimo. Sin embargo, tras 48 horas de estimulación el efecto se invierte, se produce solo un ligero aumento de la MFI total para HLA-DR con respecto a las 24 horas postestimulación, pero en cambio el porcentaje de CFTs positivos aumenta significativamente. En conjunto, los CFTs de EG responden a la estimulación con IFN- γ con una mayor inducción de HLA-DR que los CFTs de BMN. Si comparamos ambos tipos de muestra con las líneas celulares cultivadas en las mismas condiciones, el aumento de expresión de HLA-DR con respecto a la situación basal es superior en estas últimas, con incrementos de la MFI de 5-30 veces a las 48 horas, frente a aumentos de 2-5 veces con respecto a la situación basal que se observa en los cultivos primarios.

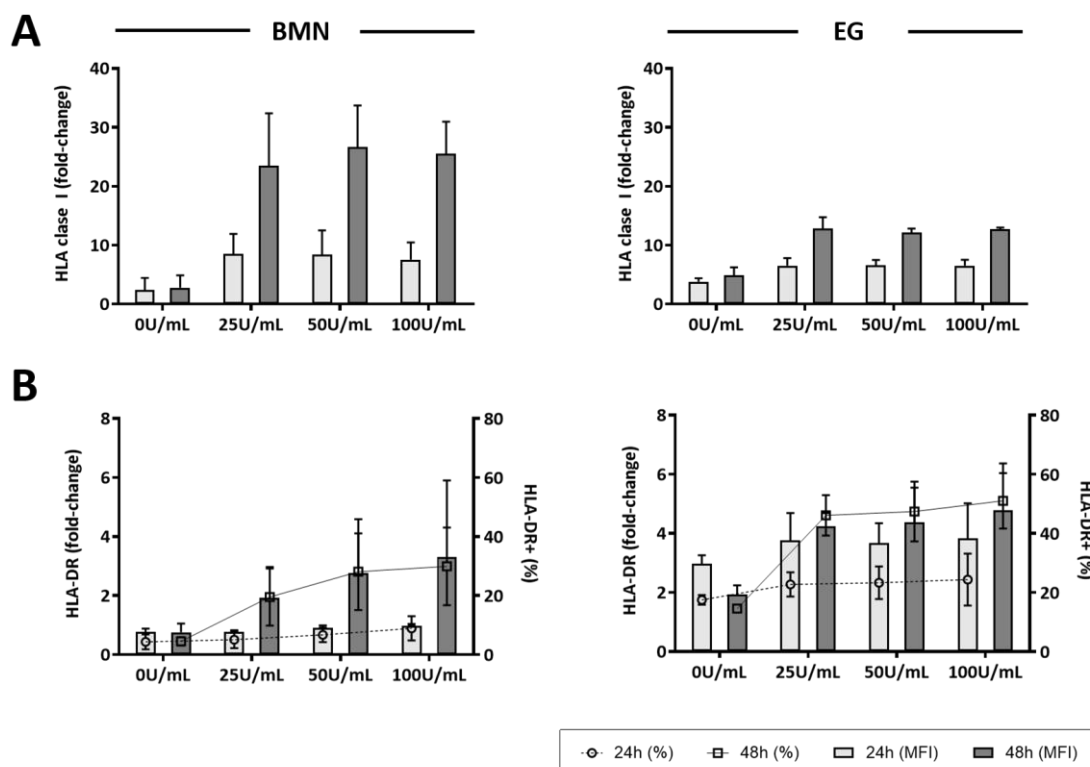


Figura 25. Análisis mediante citometría de flujo de la MFI para (A) HLA de clase I y (B) HLA-DR tras la estimulación mediante IFN- γ en cultivos primarios de CFTs de pacientes con bocio multinodular y enfermedad de Graves. En las gráficas correspondientes a HLA-DR, en el eje Y izquierdo se representa mediante barras el incremento de la MFI con respecto a la situación basal, y en el eje Y derecho se representa mediante puntos el porcentaje de células positivas.

RESULTADOS

Como ya se comentó anteriormente en la sección «Expresión de PD-L1 y PD-L2 en tiroides», el porcentaje de expresión de PD-L1 en CFTs tras la digestión del tejido es aparentemente superior en pacientes con EGB con respecto a los pacientes con BMN, aunque estas diferencias no resultan estadísticamente significativas, debido posiblemente al reducido número de muestras (**Figura 26A**). Cabe destacar el hecho de que la expresión de PD-L1 se induce de forma espontánea en cultivos primarios de CFTs incluso en ausencia de estímulos exógenos. Si comparamos los CFTs cultivados durante 48 horas en ausencia de IFN- γ con sus respectivas muestras basales observamos un aumento estadísticamente significativo del porcentaje de CFTs PD-L1+ en muestras tanto de pacientes con BMN ($12,3 \pm 3,1$ vs. $37,1 \pm 8,5$; $p < 0,01$) como de EGB ($17,5 \pm 7,7$ vs. $55,4 \pm 7,4$; $p < 0,05$). Este efecto se observa también en la MFI de PD-L1 en CFTs, aunque en este caso solo la diferencias entre los cultivos de BMN son estadísticamente significativas ($150,7 \pm 24,8$ vs. $416,0 \pm 132,6$; $p < 0,01$) (**Figura 26B**). Esta expresión espontanea de PD-L1 en cultivo resultó un efecto inesperado, por lo que descartamos primero un posible efecto debido a la presencia de trazas de endotoxina en los preparados de colagenasa. Con el objetivo de descartar esta posibilidad, una muestra de tiroides fue digerida siguiendo el protocolo descrito anteriormente, utilizando en paralelo Colagenasa IV (3mg/mL) o Liberasa™ TM (2,5 μ L/mL) como enzimas proteolíticas. La Liberasa™ TM (Roche) es una combinación de colagenasas I y II altamente purificadas y libres de endotoxinas. No se observaron diferencias en la expresión de HLA de clase I, HLA-DR o PD-L1 entre las CFTs obtenidas mediante ambas combinaciones de enzimas proteolíticas (**Figura suplementaria 5**).

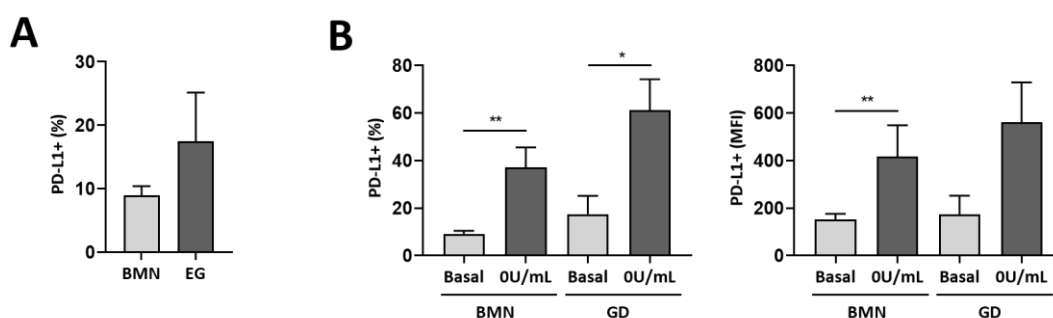


Figura 26. (A) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión basal de PD-L1 en CFTs de suspensiones celulares obtenidas tras la digestión enzimática de tejido tiroideo de pacientes con bocio multinodular y enfermedad de Graves. (B) Inducción espontanea de PD-L1 en tirocitos de pacientes con bocio nodular y con enfermedad de Graves tras 24 horas de cultivo en ausencia de estimulación. La gráfica izquierda muestra el porcentaje de CFTs PD-L1+, y la derecha la MFI para PD-L1 en el conjunto de los CFTs

RESULTADOS

Por otro lado, la respuesta al IFN- γ es similar en controles y pacientes con enfermedad de Graves. Tras la estimulación se observa un aumento de la expresión de PD-L1 por encima de los niveles inducidos espontáneamente durante el proceso de cultivo. El porcentaje de CFTs PD-L1+ presenta una variación mínima en función de la concentración de IFN- γ utilizada, y alcanza el máximo de expresión a las 24 horas postestimulación, manteniéndose su expresión estable en las muestras estimuladas durante 48 horas. En cuanto a la MFI de PD-L1 en el total de CFTs, esta aumenta igualmente tras la estimulación, aunque en ambos tipos de muestra la expresión es ligeramente superior en los cultivos estimulados durante 48 horas con respecto a aquellos estimulados durante 24 horas (**Figura 27A**).

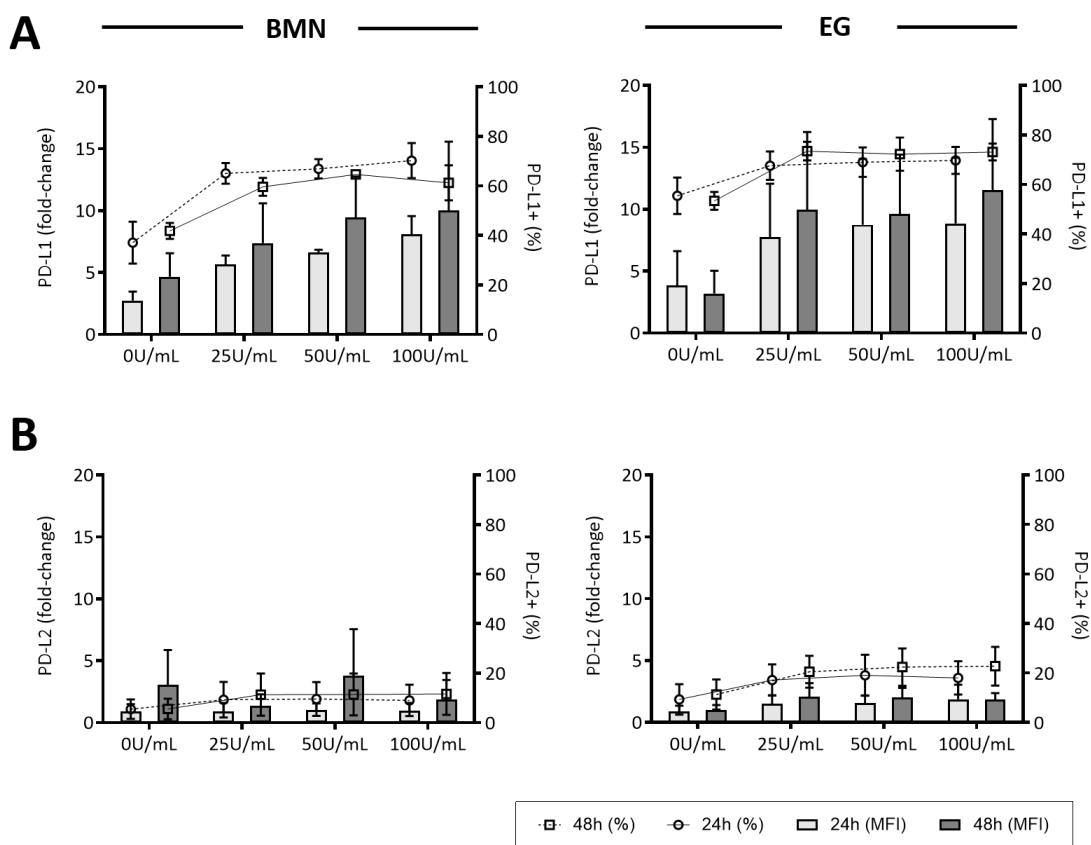


Figura 27. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de PD-L1 y PD-L2 en respuesta a la estimulación mediante distintas dosis de IFN- γ durante 24 y 48 horas en CFTs de pacientes con bocio multinodular y enfermedad de Graves. En la fila superior (A) se muestra la expresión de PD-L1, y en la fila inferior (B) la expresión de PD-L2. En el eje Y izquierdo se representa mediante barras el incremento de la MFI con respecto a la situación basal, y en el eje Y derecho se representa mediante puntos el porcentaje de células positivas.

RESULTADOS

Al contrario de lo descrito para PD-L1, PD-L2 no se expresa de forma basal en CFTs de controles o pacientes con EGB. Su expresión tampoco se ve afectada por el proceso de cultivo, y no se observa la inducción espontánea descrita previamente para PD-L1. La estimulación mediante IFN- γ aumenta ligeramente el porcentaje de CFTs PD-L2+ hasta un máximo del 15-20% de las células totales, sin observarse diferencias entre la estimulación durante 24 y 48 horas (**Figura 27B**). A pesar de esto, la expresión de PD-L2, cuando se produce, es siempre con intensidades de señal muy bajas, siendo difícil en ocasiones establecer un punto de corte con respecto a la población negativa incluso con utilizando un control de isotipo adecuado.

De nuevo se confirmaron los resultados obtenidos mediante citometría de flujo a nivel de la expresión de mRNA mediante qPCR. HLA-DRA se induce en todos los casos en respuesta al IFN- γ , aunque el aumento de su expresión relativa con respecto al GAPDH es muy variable entre muestras independientemente del diagnóstico inicial del tejido de origen. Sin embargo, el aumento en cada muestra con respecto a su propia situación basal siempre fue superior en las muestras de BMN, mientras que en las de EGB este aumento es mínimo (**Figura suplementaria 8**).

La respuesta al IFN- γ de CFTs de BMN y EGB coincide a niveles de mRNA con los descritos previamente mediante citometría de flujo, observándose un incremento significativo de la transcripción de PD-L1, con una inducción mínima del mRNA codificante para PD-L2 (**Figura 28A-B**). Es interesante que, si bien la expresión de ambas proteínas en respuesta a la estimulación in vitro es bastante consistente entre muestras del mismo grupo, a nivel de mRNA la cinética de inducción a 24 y 48 horas post-estimulación puede variar entre muestras sin que esto se refleje, aparentemente, en los niveles de expresión de la proteína en superficie. Mientras que en todos los casos la expresión proteica aumenta ligeramente a las 48 horas con respecto a las 24 horas post-estimulación, a nivel transcripcional podemos encontrarnos muestras en las que los niveles de mRNA disminuyan considerablemente a las 48 horas con respecto a las 24 horas.

En resumen, de forma similar a lo observado en los experimentos de inducción en las líneas celulares, las CFTs en condiciones normales expresan de forma basal HLA de clase I, aunque en cuanto a HLA de clase II, estas proteínas no se expresan en el caso de muestras de pacientes con BMN, pero si que se expresan en una proporción variable de CFTs de pacientes con EGB. En ambos casos el tratamiento con IFN- γ produce un aumento de la expresión, aunque la cinética de respuesta varía entre muestras de pacientes con BMN y EGB. En cuanto a los

RESULTADOS

ligandos de PD-1, PD-L1 se expresa basalmente a intensidades muy bajas en un porcentaje muy pequeño de CFTs, siendo su expresión aparentemente mayor en muestras de pacientes con EGB; en cuanto a PD-L2 su expresión es negativa en todas las muestras examinadas. Ambas proteínas aumentan su expresión en respuesta a la estimulación con IFN- γ , aunque la inducción es mucho mayor en el caso de PD-L1, tanto a nivel de porcentaje de células positivas como de la intensidad de la señal observada. Cabe destacar que en el caso de PD-L1 su expresión aumentaba considerablemente en CFTs tras 24 horas de cultivo en ausencia de estímulo, siendo este fenómeno común a las muestras obtenidas de pacientes con BMN y EGB.

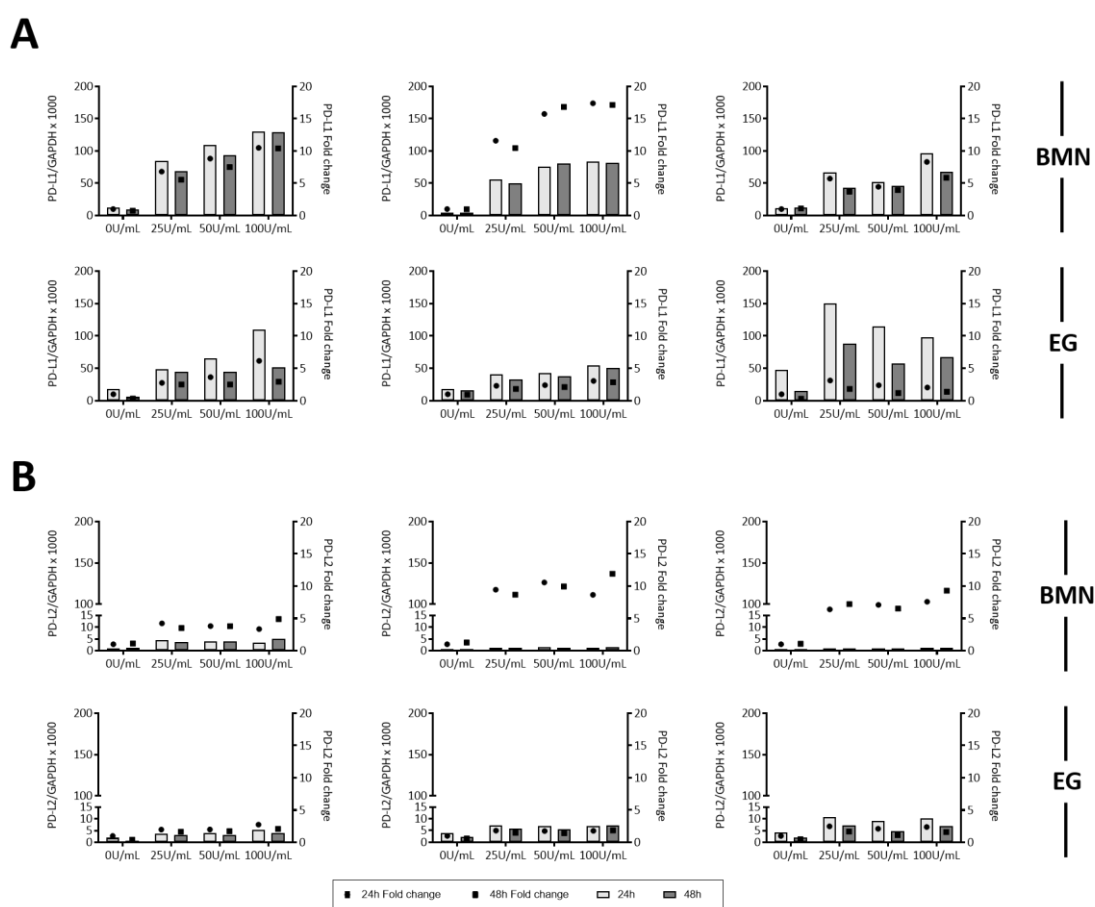


Figura 28. Análisis mediante qPCR de la expresión génica relativa de (A) PD-L1 y (B) PD-L2 en respuesta a la estimulación mediante distintas dosis de IFN- γ durante 24 y 48 horas en cultivos primarios de CFTs de pacientes con BMN y EG. En cada gráfica, en el eje Y izquierdo se representa mediante barras la expresión génica relativa de PD-L1 o PD-L2 normalizada con respecto a GAPDH, y en el eje Y derecho se representa mediante puntos el incremento de expresión con respecto a la situación basal. Debido a la variabilidad entre las muestras los resultados se representan de forma individualizada.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE CMSPs Y CFTs

En experimentos anteriores demostramos que, en muestras de tiroides y sangre periférica de pacientes con EGB los linfocitos T infiltrantes del tiroides presentan una mayor expresión del receptor inhibidor PD-1 que los linfocitos T circulantes. La expresión de PD-L1, principal ligando de PD-1, se detectó en los CFTs de la mayor parte de los tejidos procedentes de pacientes con EAT analizados (86%), pero solo en una pequeña proporción de las secciones obtenidas de pacientes con BMN (25%), en las que además la expresión solía afectar a un menor número de CFTs. Por último, y de acuerdo con lo descrito previamente para otros tipos celulares, demostramos que, tanto las líneas celulares derivadas de tiroides HT93, TPC-1, y HTH83, como cultivos primarios de CFTs de pacientes con EGB o BMN, son capaces de expresar altos niveles de PD-L1 en respuesta a la estimulación con IFN- γ .

Estos hallazgos sugieren que las CFTs responden *in vivo* a el microambiente inflamatorios propio de la EGB expresando, entre otras moléculas, PD-L1. La unión del PD-L1 en la superficie de las CFTs al PD-1 presente en los linfocitos T infiltrantes del tiroides podría favorecer la inhibición de estos últimos, atenuando las respuestas autoinmunes y contribuyendo a los mecanismos de tolerancia periférica ya conocidos.

Para estudiar el efecto de la expresión de PD-L1 por parte de las CFTs en la activación y proliferación de CMSPs, se diseñaron los experimentos de cultivos mixtos entre CMSPs y CFTs o la línea celular TPC-1 que se describen en los siguiente apartado.

1. Cocultivo autólogo de CMSPs y CFTs

Transcurridas 72 horas tras el establecimiento del cocultivo, según se describe en la sección correspondiente de Material y métodos, se estudiaron los efectos de la interacción entre CMSPs y CFTs valorando los cambios fenotípico en ambos tipos celulares mediante citometría de flujo, según protocolo de selección mostrada en la **Figura 6** de Material y métodos.

Como ya se mencionó anteriormente, la digestión del tejido tiroideo genera una suspensión que, además de células libres, contiene una gran cantidad de agregados de CFTs, lo que dificulta su conteo para conseguir la concentración deseada para la preparación de las distintas condiciones de los experimentos de cocultivo. Por ello se consideró necesario comprobar si las proporciones de

RESULTADOS

cultivo CTF:CMSP calculados se correspondían con los obtenidos experimentalmente. Este cálculo se realizó una vez finalizado el experimento, para ello se tuvo en consideración que la proliferación de CFTs y CMSPs en cultivo en ausencia de estímulos es casi nula, con lo cual el número de células presentes al inicio y al final del cocultivo en los pocillos de control debería de mantenerse constante (**Figura suplementaria 7**).

Adicionalmente cabe destacar que, la adición de anticuerpos bloqueantes anti-IFN- γ o de anticuerpos estimulantes anti-CD3/CD28 no parece afectar al número o la morfología de las CFTs presentes en los cultivos control.

1.1. Efecto del cocultivo con células foliculares tiroideas (CFTs) sobre los linfocitos autólogos activados *in vitro*

Tras la obtención de las muestras de CMSPs no se observaron diferencias significativas entre controles y pacientes con enfermedad de Graves en la proporción de las poblaciones CD45+CD4+ ($40,6 \pm 8,4$ vs $47,8 \pm 16,3$, $p > 0,05$), CD45+CD8+ ($18,7 \pm 8,7$ vs $16,5 \pm 5,0$, $p > 0,05$), o CD45+CD4-CD8- ($26,7 \pm 3,5$ vs $23,8 \pm 13,6$, $p > 0,05$). Tampoco hubo diferencias significativas en el grado de expresión de PD-1 entre ambos grupos de muestras (34 ± 18 vs $32,8 \pm 9,7$, $p > 0,05$; $28 \pm 9,6$ vs $28,5 \pm 7,6$, $p > 0,05$; $4,8 \pm 1,5$ vs $4,1 \pm 1,6$, $p > 0,05$; en CD45+CD4+, CD45+CD8+ y CD45+CD4-CD8-, respectivamente) antes de sembrarlos en presencia de los CFTs en los experimentos de cocultivo (**Figura 29A**). Por otro lado, el cultivo durante tres días no afectó por sí mismo a la proporción de subpoblaciones T CD45+CD4+ ($40,6 \pm 8,4$ vs $36,6 \pm 16,8$, $p > 0,05$; y $47,8 \pm 16,3$ vs $59,9 \pm 11,9$, $p > 0,05$), CD45+CD8+ ($18,7 \pm 8,7$ vs $19,5 \pm 4,4$, $p > 0,05$; y $16,5 \pm 5,0$ vs $18,6 \pm 5,5$, $p > 0,05$), o CD45+CD4-CD8- ($26,7 \pm 3,5$ vs $24 \pm 2,3$, $p > 0,05$; y $23,8 \pm 13,6$ vs $17,7 \pm 8$, $p > 0,05$) en controles y pacientes con enfermedad de Graves respectivamente (**Figura 29B-C**).

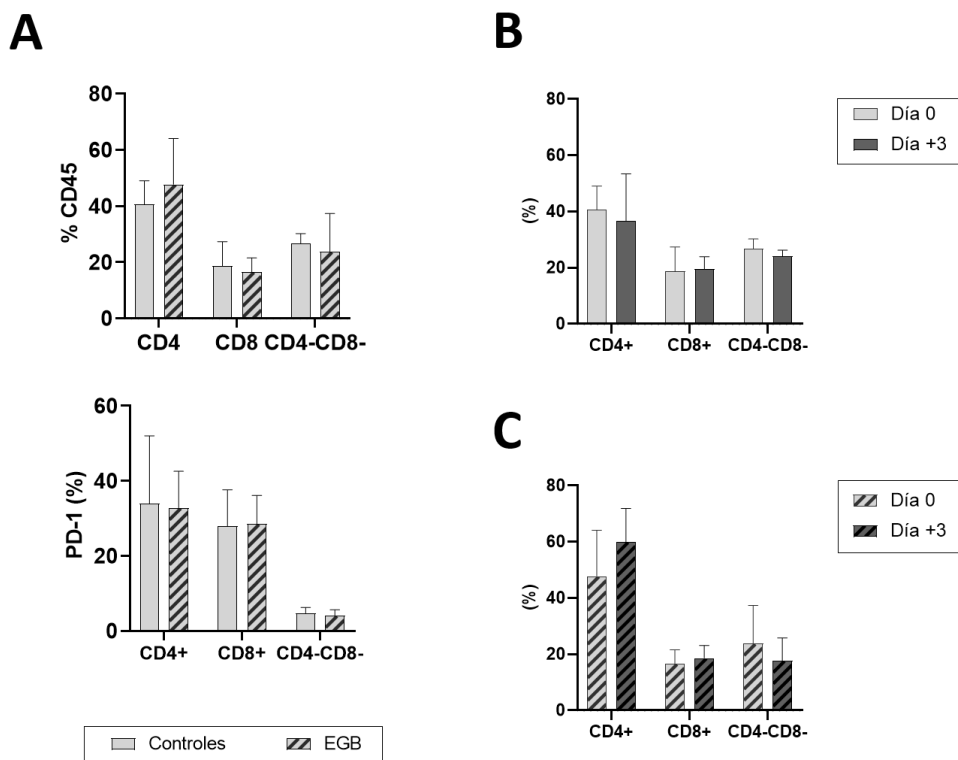


Figura 29. (A) Análisis de la proporción de linfocitos CD4+, CD8+ y CD4-CD8- sobre el total de células CD45+ y de su expresión de PD-1 en muestras de CMSP de donantes de órganos y pacientes con EG antes del cocultivo. (B-C) Comparación de las proporción de los linfocitos CD4+, CD8+ y CD4-CD8- sobre el total de CD45+ entre el momento basal y tres días tras su cultivo sin estimular en muestras de (B) donantes de órganos y (C) pacientes con EG.

El cultivo de CMSPs estimulados con anti-CD3/CD28 en presencia de CFTs autólogos indujo una disminución significativa del porcentaje de células CD4+ y CD8+ respecto al total de células CD45+. La reducción del porcentaje de linfocitos T con respecto al total de células CD45+ fue máxima en los pocillos con mayor cantidad de CFTs, y menor en los cocultivos con menos CFTs, guardando una relación inversa con el número de CFTs. De forma paralela, en los cocultivos con mayor proporción de CFTs se produjo también una marcada reducción del número total de células CD45+. La reducción de los porcentajes de linfocitos CD4 y CD8 fue menos acentuado en los cultivos en los que no se activaron los linfocitos, en ellos no se observó además la reducción del número total de células CD45+. La adición de anticuerpos bloqueantes anti-IFN- γ no modificó la magnitud de estos efectos en ninguna de las condiciones experimentales (**Figura 30**). Es interesante que la proporción CD4/CD8 se mantuvo en las diferentes condiciones de cocultivo a pesar de la reducción de sus proporciones respecto a las células CD45+ y la reducción generalizada de las CMSP en algunos cultivos (**Figura suplementaria 8**). Estas observaciones se aplican tanto a los cocultivos de muestras de donantes de órganos, como de pacientes con EG.

RESULTADOS

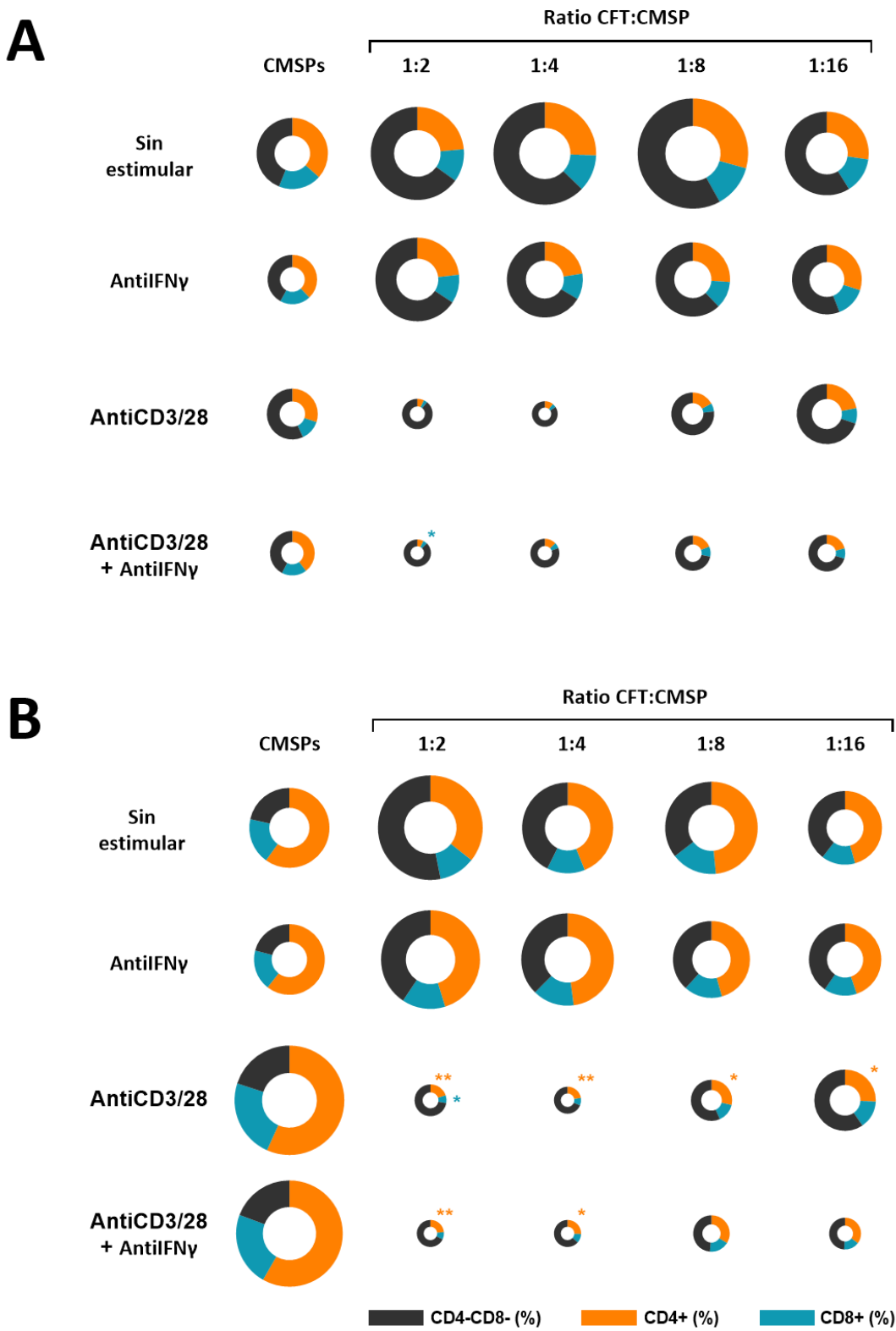


Figura 30. Proporción media de linfocitos CD4+, CD8+ y CD4-CD8- recuperados de cada pocillo tres días tras el inicio de cocultivo en muestras de (A) donantes de órganos y (B) pacientes con enfermedad de Graves. El tamaño de los gráficos es directamente proporcional a la cantidad media de células CD45+ recuperadas de cada condición. Los asteriscos muestran diferencias significativas en la proporción de células CD4 o CD8 con respecto a su correspondiente control en el que sembró inicialmente CMSPs sin CFTs. *p < 0,05; **p < 0,01.

RESULTADOS

Por otra parte, y como era de esperar, la proporción de las poblaciones de linfocitos T PD-1+ aumentó significativamente en los cultivos activados con anti-CD3/CD28, sin que la presencia de anticuerpo bloqueante anti-IFN- γ tuviese efecto sobre esta inducción (**Figura 31**). En todos los casos, la presencia de CFTs -sin importar la proporción- en los cocultivos no tuvo ningún efecto sobre el porcentaje de linfocitos T PD-1+ tanto en la muestra de pacientes con EG como de controles. Por otro lado, la población CD45+CD4-CD8- presentó también un incremento de la proporción de células PD-1+ tras la activación con antiCD3/CD28, sin embargo, esta inducción fue muy inferior a la observada en células T. En este caso, la presencia de CFTs inhibió la inducción de PD-1 en todas las proporciones de cocultivo estudiadas.

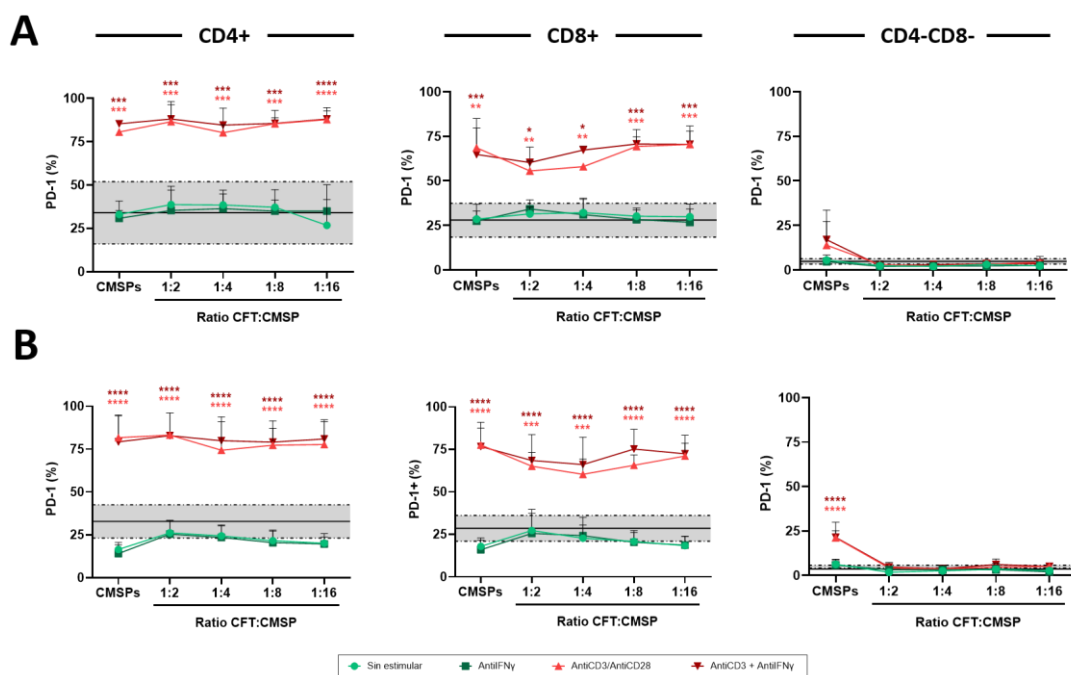


Figura 31. Expresión de PD-1 en linfocitos CD4+, CD8+ y CD4-CD8- tras el cocultivo en muestras de (A) donantes de órganos y (B) pacientes con enfermedad de Graves. La estimulación con anticuerpos anti-CD3/CD28 produce un aumento significativo de la expresión de PD-1 en células CD4+ y CD8+ que es independiente de la presencia de CFTs. El área gris de cada gráfica representa la media (línea continua) \pm la desviación estándar en las muestras previamente a su cultivo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

RESULTADOS

En paralelo, se analizó mediante citometría de flujo la proliferación celular de las poblaciones de linfocitos T empleando la prueba de dilución de CFSE (**Figura 32**).

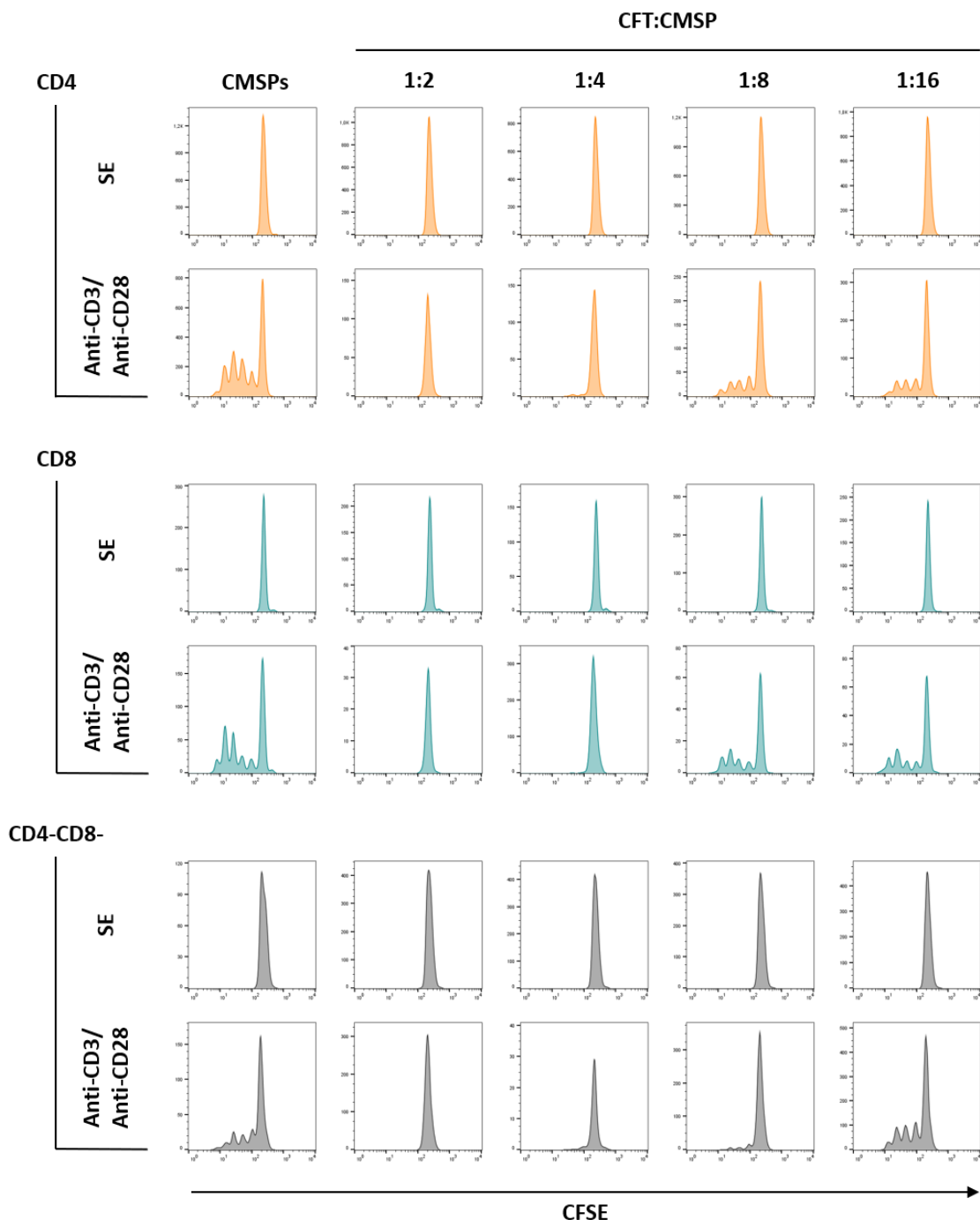


Figura 32. Imagen representativa de la cuantificación de la proliferación celular en las subpoblaciones de linfocitos CD4+, CD8+ y CD4-CD8- en respuesta a las distintas condiciones experimentales presentes en el cocultivo. El eje X de los histogramas muestra la intensidad de señal para el CFSE, correspondiendo cada uno de los picos observados con una generación de células cuya intensidad de señal será inversamente proporcional al número de divisiones celulares que habrán sufrido.

RESULTADOS

La presencia de números crecientes de CFT en los cocultivos produce una inhibición progresiva de la proliferación inducida por anti-CD3/CD28 en los linfocitos T CD4 y CD8. Como es de esperar, la proliferación de esta población en los pocillos tratados con anti-CD3/CD28 es muy inferior a la de las células T, sin embargo, su proliferación también disminuye con la presencia de CFTs en cocultivo. Este efecto también se produce tanto en las muestras procedentes de pacientes con enfermedad de Graves como de donantes de órganos (**Figura 33**).

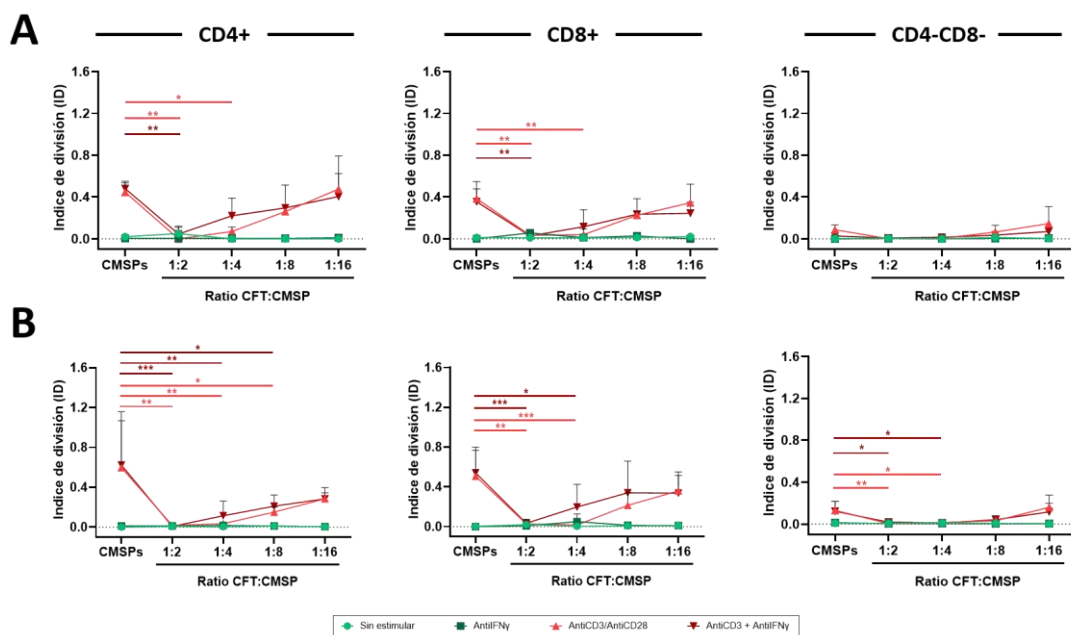


Figura 33. Análisis de la proliferación celular de linfocitos CD4+, CD8+ y CD4-CD8- tras la finalización del cocultivo en muestras de (A) donantes de órganos y (B) pacientes con enfermedad de Graves. El cocultivo con concentraciones crecientes de CFTs produce una disminución de la proliferación que afecta especialmente a linfocitos T. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

El índice de división (ID) permite comparar cuantitativamente la proliferación de los linfocitos T en el conjunto de los pocillos estimulados, aquellos tratados con Anti-CD3/Anti-CD28 y Anti-CD3/Anti-CD28 + Anti-IFN- γ , con el ratio real de cocultivo calculado más arriba, observándose que existe una correlación directa entre el ratio CMSP:CFT y el ID de las células CD4 ($r = 0,82$ en controles, $p > 0,001$; y $r = 0,41$ en EGB, $p > 0,05$) y de las células CD8 ($r = 0,78$ en controles, $p > 0,001$; y $r = 0,59$ en EGB, $p > 0,01$) (**Figura 34**). Por lo tanto, la proliferación de linfocitos T es mayor cuanto menor es el número de tirocitos en el cocultivo. En algunos experimentos, pero no todos, la proliferación en los pocillos en los que la ratio linfocitos tirocitos es 1:16, es igual a la de los pocillos sin tirocitos. En

RESULTADOS

algunas de las condiciones experimentales estudiadas, la reducción del número total de células CD45+ en cultivo en combinación con índices de división elevados sugiere la coexistencia de fenómenos de proliferación y muerte celular (Ver discusión).

El uso de anticuerpo bloqueante anti-IFN- γ no parece modificar este fenómeno, ya que no se observan diferencias significativas en la proliferación entre las CMSPs estimuladas tratadas o no tratadas con él.

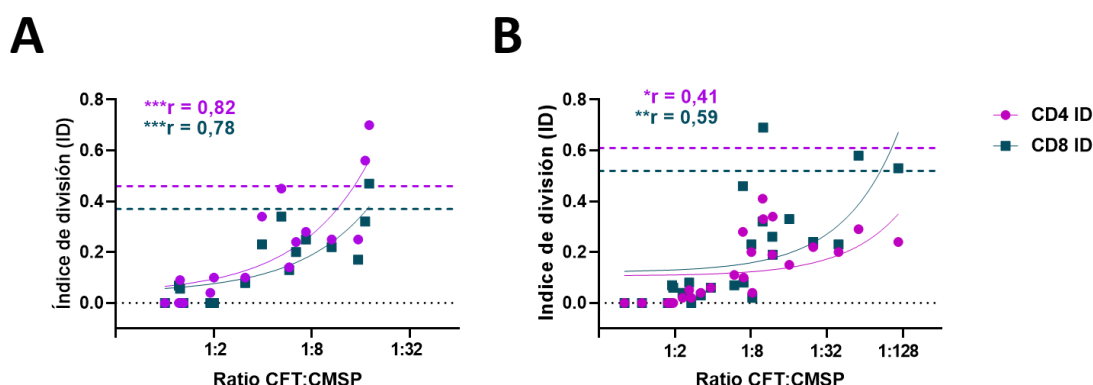


Figura 34. Análisis de la correlación entre el índice de división de linfocitos T estimulados con anti-CD3/CD28 con el ratio final de cocultivo cuantificado en los controles correspondientes para cada pocillo. Correlación entre ambos parámetros en (A) donantes de órganos y (B) pacientes con enfermedad de Graves. Se observa una correlación positiva estadísticamente significativa en células CD4 y CD8 en ambos tipos de muestra. Las líneas discontinuas muestran la media del índice de división (ID) en los pocillos de control no cultivados en presencia de CFTs y estimulados con anti-CD3/CD28. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

1.2. Efecto del cocultivo con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) sobre las células foliculares tiroideas (CFT) autólogas activados *in vitro*

En primer lugar, se determinaron los niveles basales de HLA-DR y PD-L1 en los tirocitos de glándulas de controles y de pacientes afectados de Graves. Como se describe en Material y métodos, para su análisis mediante citometría de flujo se consideraron CFTs las células CD45- y con morfología compatible. La expresión de PDL1 fue similar en los CFTs de controles y pacientes mientras que la de HLA-DR fue claramente mayor en estos últimos como se ha descrito (**Figura suplementaria 9**).

RESULTADOS

La expresión de HLA-DR y PD-L1 se analizó en las pocillos de CFTs cultivados en ausencia de CMSPs y en los pocillos cocultivados en proporción 1:2. El número de CFTs el resto de las condiciones de cocultivo se consideró insuficiente para su análisis. Mediante el uso de un microscopio invertido se comprobó que la presencia de CMSPs no afectó a la celularidad de la monocapa de tirocitos o a su morfología (Datos no mostrados).

En ausencia de estimulación, y a día 3 de cultivo, el porcentaje de CFTs HLA-DR+ es ligeramente mayor en los cocultivos que en los cultivos en ausencia de CMSPs, especialmente en las muestras control, aunque estos cambios no son estadísticamente significativos ($1,8 \pm 0,5$ vs $6,8 \pm 7,4$ en controles, $p > 0,05$; $13 \pm 12,8$ vs $15,5 \pm 15,3$ en EG, $p > 0,05$). La adición de anticuerpos anti-CD3/CD28 aumentó la expresión de HLA-DR en los CFTs, tanto el porcentaje de células positivas como la MFI. Este efecto, aunque menor, se observó también en las CFTs cultivadas en ausencia de CMSPs (**Figura 35**). El efecto en los cultivos de tirocitos en ausencia de CMSPs es probable que se deba a la presencia de linfocitos residuales a pesar del lavado de células no adherentes que se lleva a cabo a las 18 horas tras la siembra de los tirocitos. En las muestras activadas con anti-CD3/CD28 la adición de anticuerpos neutralizantes anti-IFN- γ disminuye significativamente la expresión de HLA-DR a nivel del porcentaje de CFTs positivas y de la MFI de la población total. La respuesta de las CFTs al cocultivo con CMSPs y a las distintas condiciones experimentales es similar en las muestras control y las muestras de pacientes con EG, salvo que tanto los niveles de partida como máximos de expresión de HLA-DR son mayores en los tirocitos procedentes de glándulas afectas de enfermedad de Graves.

RESULTADOS

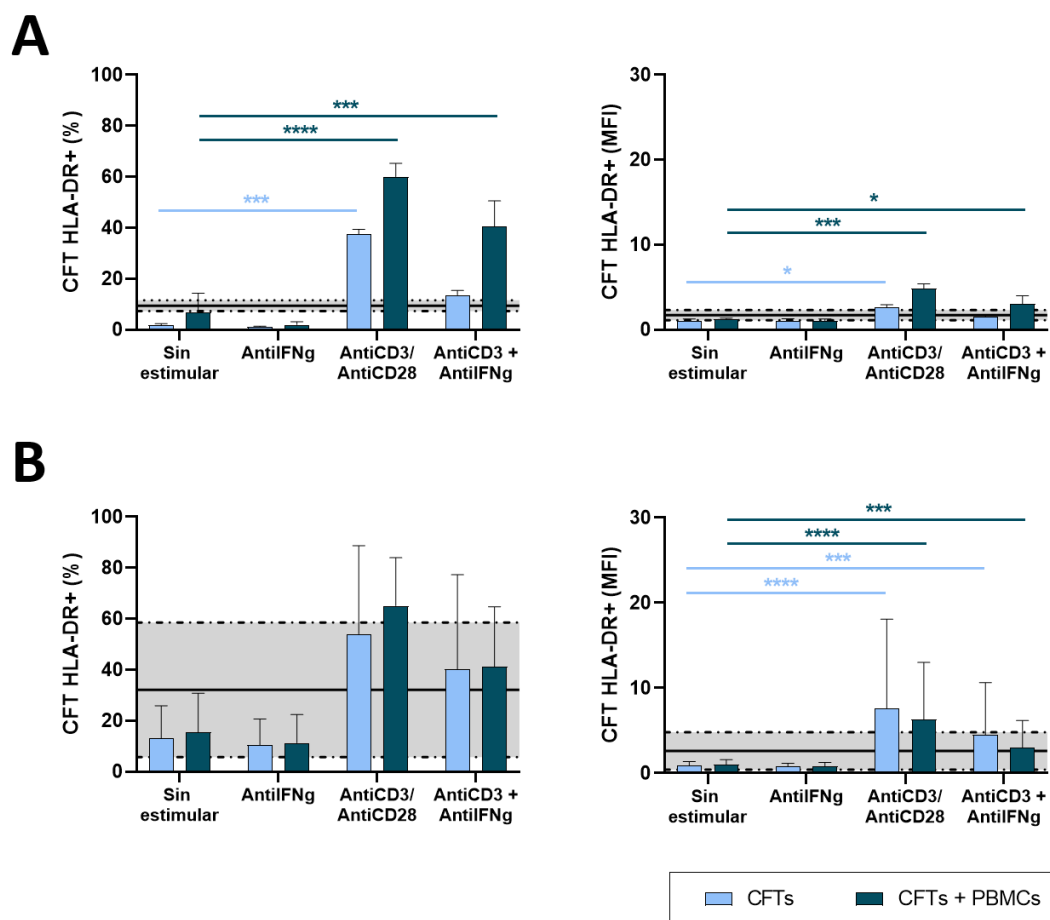


Figura 35. De izquierda a derecha, porcentaje de CFTs HLA-DR+ y MFI de HLA-DR en el conjunto de CFTs tras la finalización del cocultivo en muestras de (A) donantes de órganos y (B) pacientes con enfermedad de Graves. La estimulación de los cultivos mediante anti-CD3/CD28 produce un aumento del número de CFTs HLA-DR+, así como un aumento de la MFI del total de los tirocitos. El área gris de cada gráfica representa la media (línea continua) \pm la desviación estándar en las muestras previamente a su cultivo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Como se comentó anteriormente, en ausencia de estímulos la expresión de PD-L1 aumenta espontáneamente en las CFTs durante el cultivo, siendo este aumento mayor en las muestras de pacientes con EGB ($7,7 \pm 1,5$ vs $20,9 \pm 10,5$ en controles, $p > 0,05$; $8,9 \pm 3,7$ vs $45,7 \pm 7,2$ en EG, $p < 0,01$). Al igual que en el caso de HLA-DR, el porcentaje de CFTs PD-L1+ aumenta ligeramente cuando estas son cultivadas en presencia de CMSPs incluso en ausencia de estímulos ($20,9 \pm 10,5$ vs $37,36 \pm 25,1$ en controles, $p > 0,05$; $45,7 \pm 7,2$ vs $50,4 \pm 4,6$ en EG, $p > 0,05$), aunque estos cambios no son significativos. De nuevo, la adición de anticuerpos anti-CD3/CD28 aumenta considerablemente los niveles de expresión de PD-L1, tanto el porcentaje de CFTs positivas como la MFI global de la población. En este caso el efecto del anticuerpo bloqueante anti-IFN- γ no

RESULTADOS

afecta al porcentaje de CFTs que pasan a ser PD-L1+, aunque si disminuye la intensidad de la señal detectada en el conjunto de la población de estas células (Figura 36).

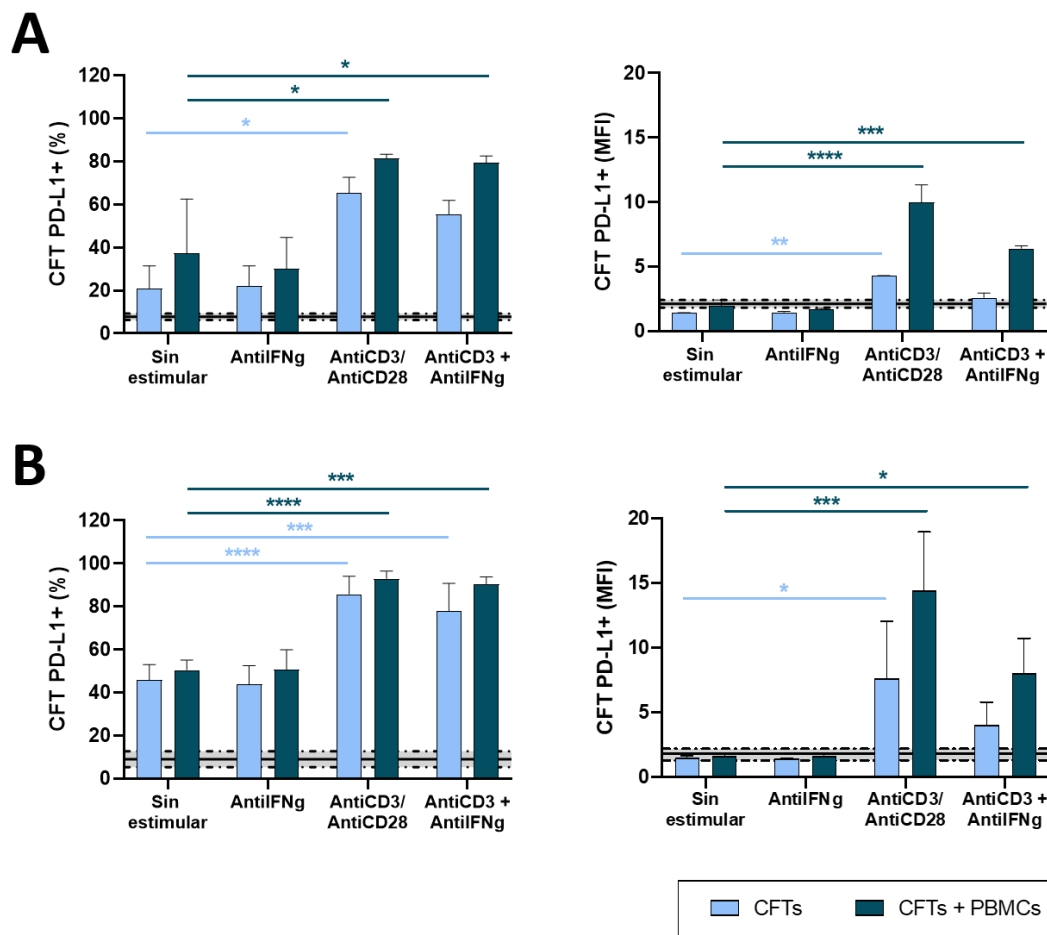


Figura 36. De izquierda a derecha, porcentaje de CFTs PD-L1+ y MFI de PD-L1 en el conjunto de CFTs tras la finalización del cocultivo en muestras de (A) donantes de órganos y (B) pacientes con enfermedad de Graves. La estimulación de los cultivos mediante anti-CD3/CD28 produce un aumento del número de CFTs PD-L1+, así como un aumento de la MFI del total de los tirocitos. El área gris de cada gráfica representa la media (línea continua) \pm la desviación estándar en las muestras previamente a su cultivo. *p < 0,05; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

2. Cocultivo de CMSPs con la línea celular TPC-1

A diferencia los cultivos primarios de tirocitos, en los que estos apenas proliferan durante los primeros días de cultivo, las células de la línea TPC-1, con un tiempo de duplicación aproximado de 18 horas, se dividen activamente. Esto dificulta mantener las proporciones TPC-1:CMSP incluso en cultivos muy cortos como los presentes. Para determinar el número a sembrar, se realizó una serie de cultivos

RESULTADOS

sembrando cantidades decrecientes de células TPC-1 por pocillo. Se estableció así la cantidad de 2000 células TPC-1 como la cantidad mínima necesaria para obtener una monocapa con una confluencia entre el 80-90% tras las 72 horas de duración del experimento. A partir de esta suspensión celular se obtuvieron y sembraron diluciones seriadas 1:2 para conseguir pocillos con cantidades decrecientes de células TPC-1. Se consiguió de esta manera obtener tras 72 horas ratios de TPC-1:CMSP crecientes, sin embargo, las proporciones iniciales conseguidas fueron muy inferiores a los cocultivos primarios, al menos inicialmente (**Figura suplementaria 10**). En estos experimentos se debe presumir, aunque no se han tipificado para HLA ni la línea ni los donantes de CMSP, que trabajamos con cultivos mixtos alogénicos.

Como se explicó en el apartado anterior, en los cultivos autólogos con CFTs, la presencia de CMSPs no producía cambios en la densidad de la monocapa formada por las células epiteliales en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas. De igual manera, en el caso de los cultivos alogénicos con la línea TPC-1, mediante el uso de un microscopio invertido se comprobó que la monocapa formada por estas células permaneció inalterada al cocultivarse estas con CMSPs en ausencia de estimulación (Datos no mostrados). Sin embargo, y a diferencia de lo observado en los cocultivos primarios de tirocitos, al estimular los cocultivos con anticuerpos anti-CD3/CD28 el número de células TPC-1 disminuía significativamente. Este efecto parece ser dependiente de la presencia de CMSPs, ya que no se observó en los pocillos de control con TPC-1 tratadas con anti-CD3/CD28 en ausencia de CMSPs (**Figura 37**).

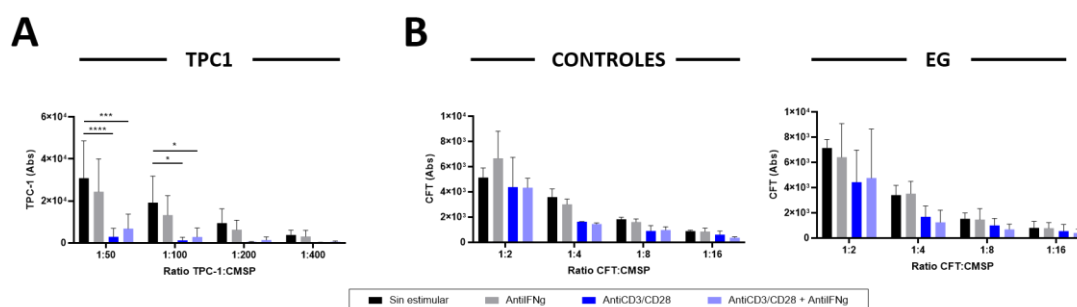


Figura 37. Número total de células CD45- recuperadas de cada pocillo tras la finalización del cocultivo en experimentos con (A) TPC-1 y (B) CFTs de donantes de órganos y pacientes con enfermedad de Graves. La estimulación con anti-CD3/CD28 produce una disminución significativa del número de células TPC-1 en cocultivo con CMSPs, este efecto no se observa en cultivos primarios de CFTs. *p < 0,05; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

RESULTADOS

2.1. Las células TPC-1 tienen un efecto negativo parcial sobre los linfocitos T autólogos activados *in vitro*

El análisis previos al establecimiento de los cocultivos no mostraron diferencias en la proporción de las poblaciones CD4+ y CD8+, ni en su grado de expresión de PD-1, con respecto a las muestras de controles y pacientes con enfermedad de Graves estudiadas previamente (Datos no mostrados).

Al igual que en los cultivos autólogos con CFTs, el cocultivo de tirocitos de la línea TPC-1 con CMSPs indujo una disminución del porcentaje de células CD4+ y CD8+ respecto al total de células CD45+. En este caso, este efecto pareció no verse acentuado por la activación de los linfocitos mediante anti-CD3/CD28, aunque las únicas diferencias estadísticamente significativas se encontraron en los pocillos control no estimulados. De forma general, el cocultivo de las CMSPs en presencia de la línea TPC-1 pareció inducir un ligero aumento del número total de células CD45+, siendo este incremento mayor en los pocillos con mayor número de células TPC-1 (**Figura 38**).

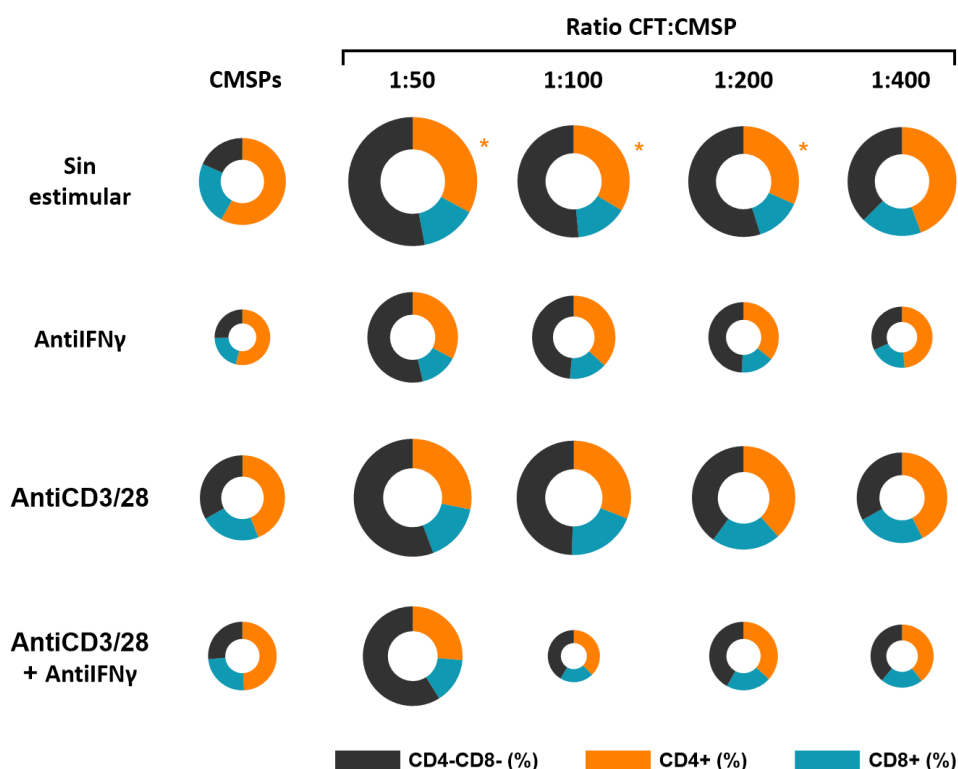


Figura 38. Proporción media de linfocitos CD4+, CD8+ y CD4-CD8- recuperados de cada pocillo tres días tras el inicio de cocultivo con células de la línea TPC-1. El tamaño de los gráficos es directamente proporcional a la cantidad media de células CD45+ recuperadas de cada condición. Los asteriscos muestran diferencias significativas en la proporción de células CD4 o CD8 con respecto a su correspondiente control en el que sembró inicialmente CMSPs sin CFTs. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

RESULTADOS

Como se muestra en la **figura 39**, los linfocitos T proliferan adecuadamente en respuesta a la activación anti-CD3/CD28, pero a diferencia de lo observado en los cocultivos con tirocitos autólogos, las células TPC-1 no inhiben esta proliferación. En este caso, se observa incluso una ligera tendencia al aumento del índice de división de CD4 y CD8 cuando estos se cocultivan con TPC-1 aunque estas diferencias tampoco son estadísticamente significativas.

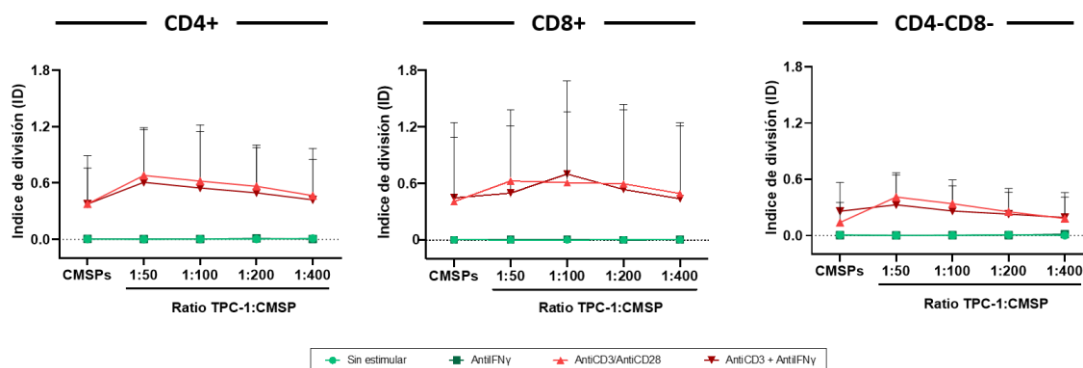


Figura 39. Análisis de la proliferación celular de linfocitos CD4+, CD8+ y CD4-CD8- tras la finalización del cocultivo con células de la línea TPC-1. El cocultivo con concentraciones crecientes de TPC-1 no afecta de forma significativa a la proliferación de las subpoblaciones de linfocitos estudiadas.

En cuanto a la expresión de PD-1, ambas subpoblaciones de linfocitos T expresaron altos niveles de este receptor tras la estimulación con anticuerpos anti-CD3/CD28. Los porcentajes de células CD4+PD-1+ y CD8+PD-1+ fueron ligeramente inferiores en las muestras tratadas de forma adicional con anticuerpo bloqueante anti-IFN-γ, aunque las diferencias con respecto a aquellas no tratadas no fueron estadísticamente significativas. Este efecto, como ya observó en los cultivos autólogos, no se vio influenciado por la presencia de distintas cantidades de células TPC-1. La población de linfocitos CD4-CD8- no presenta un aumento significativo de la expresión de PD-1 tras la activación mediante anti-CD3/CD28 en ninguna de las condiciones de cultivo (**Figura 40**).

RESULTADOS

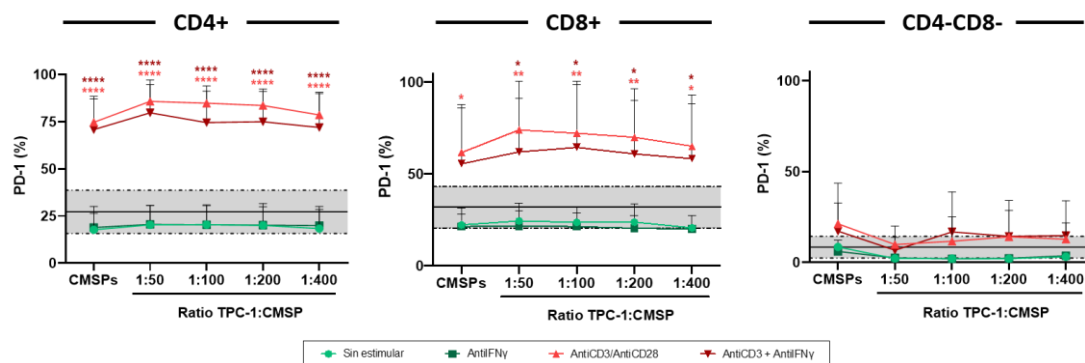


Figura 40. Expresión de PD-1 en linfocitos CD4+, CD8+ y CD4-CD8- tras el cocultivo con células de la línea TPC-1. La estimulación con anticuerpos anti-CD3/CD28 produce un aumento significativo de la expresión de PD-1 en células CD4+ y CD8+ que es independiente de la presencia de CFTs. El área gris de cada gráfica representa la media (línea continua) \pm la desviación estándar en las muestras previamente a su cultivo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

2.2. Efecto del cocultivo sobre las células TPC-1

Como ya describimos en apartados anteriores, la línea celular TPC-1 expresa de forma basal PD-L1, pero no HLA-DR. En los pocillos control en los que TPC-1 se cultiva en ausencia de CMSPs, se observa que la expresión de ambas moléculas no se ve afectada por el tratamiento de la línea celular con anti-CD3/CD28 o con anti-IFN- γ (**Figura 41**).

Sin embargo, el porcentaje de células TPC-1 HLA-DR+ aumenta cuando estas son cocultivadas con CMSPs incluso en ausencia de estimulación, disminuyendo de nuevo la expresión cuando se añade al medio anti-IFN- γ , aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. En cambio, la estimulación de los pocillos de cocultivo TPC-1:CMSP mediante anti-CD3/CD28 o anti-CD3/CD28 + anti-IFN- γ produce un incremento significativamente estadístico del porcentaje de TPC-1 HLA-DR+ con respecto a la misma muestra no estimulada ($21 \pm 35,4$ vs $91,6 \pm 6,1$, $p < 0,0001$; $21 \pm 35,4$ vs $76,5 \pm 16,6$, $p < 0,0001$; respectivamente). La MFI para HLA-DR de la población TPC-1 en cocultivo con CMSP se comporta de una forma similar, aumentando significativamente en el pocillo tratado con anti-CD3/CD28 con respecto al no estimulado ($2,4 \pm 3$ vs $91,1 \pm 68,7$, $p < 0,0001$). Aunque en este caso, el descenso producido por el bloqueo del IFN- γ es mayor, por lo que no hay diferencias significativas entre los pocillos de cocultivo sin estimular y los tratados con anti-CD3/CD28 + anti-IFN- γ .

En cuanto al porcentaje de expresión de PD-L1 en la línea TPC-1, este se mantiene constante, siendo de casi del 100% en todas las condiciones experimentales

RESULTADOS

estudiadas. Sin embargo, y al igual que lo ya descrito para HLA-DR, cuando la línea TPC-1 se cultiva en presencia de CMSPs, la MFI de estas células para PD-L1 aumenta significativamente con respecto a los pocillos no estimulados cuando se estos se tratan con anti-CD3/CD28 ($35,75 \pm 8,7$ vs $169,7 \pm 71,2$, $p < 0,0001$) y con anti-CD3/CD28 + anti-IFN- γ ($35,75 \pm 8,7$ vs $106,7 \pm 43,8$, $p < 0,01$). En este caso, el descenso de la MFI para PD-L1 de los pocillos estimulados cuando adicionalmente se bloquea con anticuerpos anti-IFN- γ , si resulto estadísticamente significativo ($169,7 \pm 71,2$ vs $106,7 \pm 43,8$, $p < 0,05$).

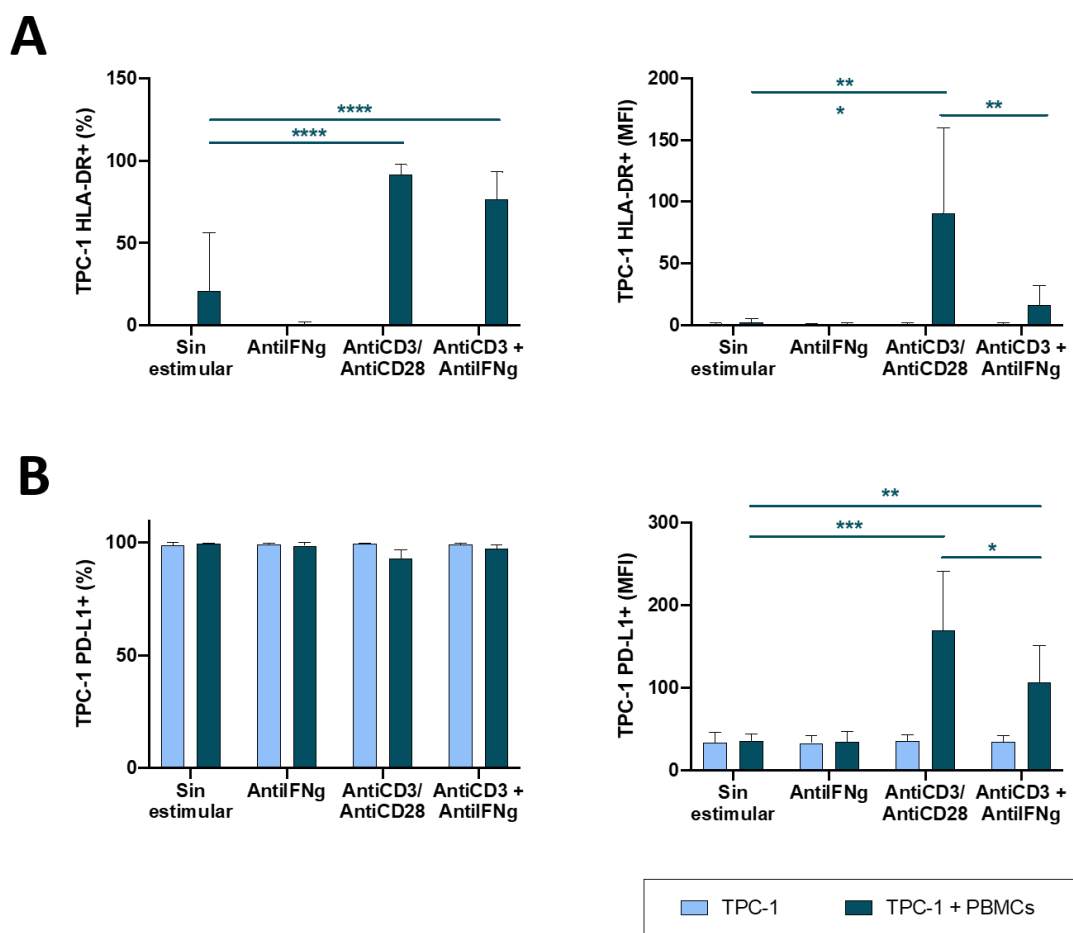


Figura 41. Porcentaje de células positivas y MFI de en el conjunto de TPC-1 para (A) HLA-DR y (B) PD-L1 tras la finalización del cocultivo con CMSPs. La estimulación de los cultivos mediante anti-CD3/CD28 produce un aumento del porcentaje de TPC-1 HLA-DR+, así como un aumento de la MFI para PD-L1 y HLA-DR. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

RESULTADOS

ANALISIS TRANSCRIPTOMICO DE TIROIDES CON DIFERENTES GRADOS DE TIROIDITIS DE LA COLECCION GTEx (*GENOTYPE TISSE EXPRESSION PROJECT*)

Como ya se comentó anteriormente, la presencia de infiltrados focales o tiroiditis subclínica es un fenómeno común en la población general, especialmente la de mayor edad. Este hecho ha permitido que, incluso en una colección de tejidos no dirigida al estudio de la autoinmunidad, haya sido posible recoger una gran cantidad de datos de tiroides con grados diversos de tiroiditis autoinmune.

La estrategia ha consistido en combinar los datos histológicos, y los datos asociados de expresión de ARN en las muestras recogidas en el proyecto GTEx. Esto nos ha permitido analizar datos de 332 muestras de tiroides.

1. Clasificación histológica – GTEx

Mediante la funcionalidad Histology Viewer del repositorio público de datos del proyecto GTEx (<https://www.gtportal.org/home/>) se evaluó el grado de infiltración linfocitaria en cortes histológicos de 336 pacientes.

Tabla 6. Resumen de los datos demográficos de los grupos de tejidos definidos en base al grado de infiltración linfocitaria observado en las imágenes histológicas publicadas por el proyecto GTEx.

	ELI	SFI	ELI
Número de muestras (%)	262 (78,9%)	49 (14,8%)	21 (6,3%)
Sexo (%)			
Mujer	89 (34%)	21 (42,9%)	14 (66,7%)
Hombre	173 (66%)	28 (57,1%)	7 (33,3%)
Rango de edad (%)			
20-29	20 (7,6%)	3 (6,1%)	2 (9,5%)
30-39	12 (4,6%)	4 (8,2%)	0 (0%)
40-49	44 (16,8%)	11 (22,4%)	7 (33,3%)
50-59	103 (39,3%)	10 (20,4%)	4 (19%)
60-69	79 (30,2%)	21 (42,9%)	8 (38,1%)
70-79	4 (1,5%)	0 (0%)	0 (0%)

RESULTADOS

De los 336 tejidos analizados, 4 de ellos fueron excluidos del estudio tras observarse la presencia de adenoma incidentales, los 334 restantes son clasificados en base a los criterios previamente descritos (**Tabla 6**). Se identifican 261 (78%) tejidos con ausencia de infiltrado linfoide (NIT), 49 (15%) tejidos con presencia de pequeños infiltrados focales (SFI), y 21 (6%) tejidos con zonas extensas de infiltración linfocitaria (ELI), que de forma general podía encontrarse organizada como tejido linfoide terciario. A pesar de lo descrito anteriormente en estudios en necropsias (13,14), en esta serie de muestras no se observa un aumento significativo de la prevalencia de fenómenos de infiltración linfocitaria en el tiroides con el aumento de la edad de los donantes. Sin embargo, la presencia de infiltrados linfocitarios es mayor en mujeres que en hombres, especialmente en el grupo de muestras clasificadas como ELI (**Figura 42A-B**), lo cual estaría en concordancia con los datos de prevalencia de EAT en la población general, donde se describe una mayor incidencia en mujeres que en hombres.

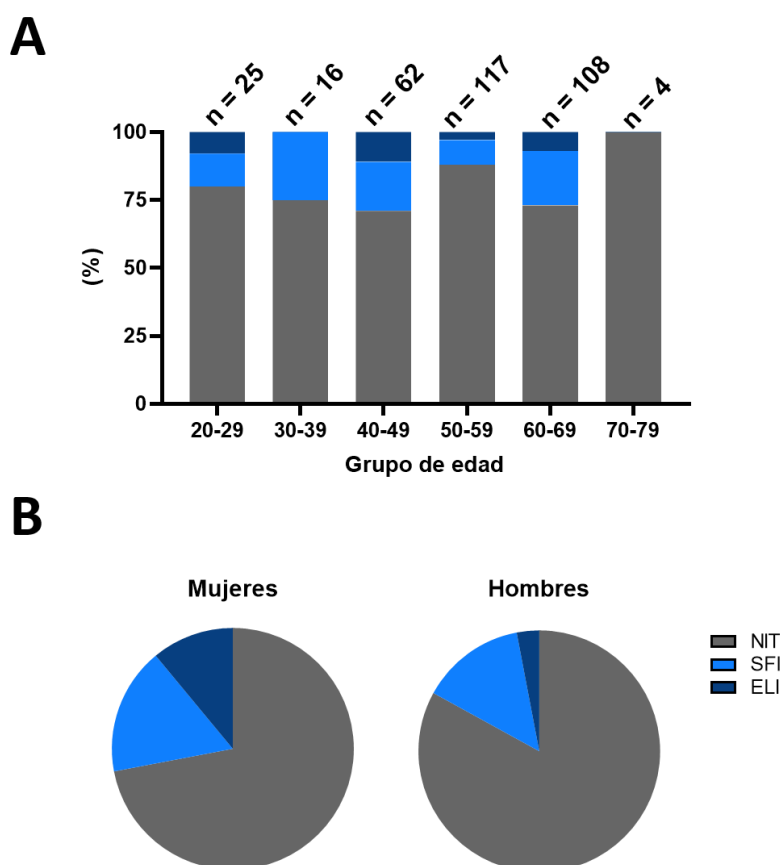


Figura 42. Distribución de los grupos de muestras definidos en base a estudio histológico según (A) la edad, y (B) el sexo de los donantes. Se observa una mayor prevalencia de infiltrados linfoides en mujeres con respecto a hombres, pero no se encuentran diferencias entre los grupos de edad de los donantes.

RESULTADOS

2. Análisis de expresión génica – GTEx

Se seleccionaron 292 muestras de las cuales se disponía de datos apareados de ARNseq e imágenes del estudio histológico. De estas, 236 (81%) pertenecían al grupo NIT, 42 (14%) al grupo SFI, y 14 (5%) al grupo ELI.

2.1. Control de calidad

Para evaluar la semejanza de las muestras seleccionadas se realizó un análisis de distancia euclidiana entre ellas, y los resultados se representaron mediante un heatmap (**Figura suplementaria 11**). El patrón de este gráfico puede indicarnos la agrupación de varias muestras en base a su similitud global, lo cual puede atribuirse a efectos biológicos o experimentales. En rojo se observan algunos agrupamientos de muestras con bajas distancias entre ellas, todas ellas pertenecen al grupo NIT. Es destacable que, el conjunto de muestras representadas junto al margen superior e izquierdo, y que presentan una elevada distancia con respecto al resto de muestras, pertenecen al grupo de tejidos con grandes infiltrados linfocitarios (ELI).

Se realizó también un análisis de componentes principales (PCA), cuya representación se muestra en la **figura 43**. Mientras que las muestras que presentan pequeños infiltrados focales (SFI) muestran gran variabilidad y se encuentran dispersas en todas las áreas del gráfico, las muestras sin infiltración (NIT) y con grandes infiltrados linfocitarios (ELI) se encuentran distribuidas en zonas opuestas de la representación, lo que indica que hay grandes diferencias entre estos dos grupos de muestras.

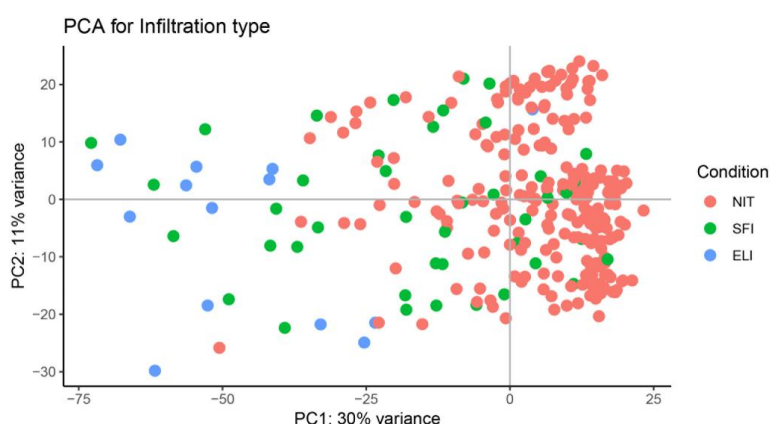


Figura 43. PCA (Principal component análisis) de las muestras de tiroides incluidas en el estudio. Se observan claras diferencias entre el grupo de muestras NIT (rojo), situado a la izquierda de la representación, y el grupo de muestras ELI (azul), situado en la zona izquierda.

RESULTADOS

En base a los análisis de control de calidad realizados se consideró que las diferencias observadas hasta el momento se debían a la propia naturaleza de las muestras, sin que existiesen sesgos de carácter técnico en los resultados obtenidos. Por ello todas las 292 muestras fueron incluidas en el análisis de expresión diferencial.

2.2. Análisis de la expresión diferencial

El principal objetivo es diferenciar que genes se encuentran diferencialmente expresados como consecuencia de la pérdida de tolerancia y la aparición de respuestas autoinmunes órgano específicas en el tiroides. Para ello se compara la expresión génica de los tres grupos de muestras previamente definidos entre ellos: SFI vs. NIT, ELI vs. NIT, y SFI vs. ELI. El número total de genes diferencialmente expresados en las comparaciones realizadas se resumen en la **Tabla suplementaria 13**, estos se encuentran agrupados en función de su p-valor ajustado. El resultado global de las comparaciones puede observarse mediante su representación en volcano plots (**Figura 44**), donde solo los genes con cambios de magnitud de expresión superior a 3 (\log_2) y un p-valor ajustado inferior a 0,001 se muestra en morado junto a su nombre. Al comparar el grupo SFI con el NIT, observamos un número considerable de genes cuya expresión ha aumentado, pero la mayor parte de ellos con cambios de magnitud inferiores a 3. Sin embargo, al comparar los tejidos más infiltrados, correspondientes a grupo ELI, con el grupo NIT se observa un gran número de genes cuya expresión aumenta, muchos de ellos con magnitudes superiores a 3 (\log_2); al contrario que en el caso anterior, también existen genes cuya expresión ha disminuido considerablemente, por encima de 3 órdenes de magnitud con respecto a los tejidos sin infiltrar. En base a esto se puede afirmar que las mayores diferencias en términos de expresión génica se dan entre los grupos ELI y NIT.

RESULTADOS

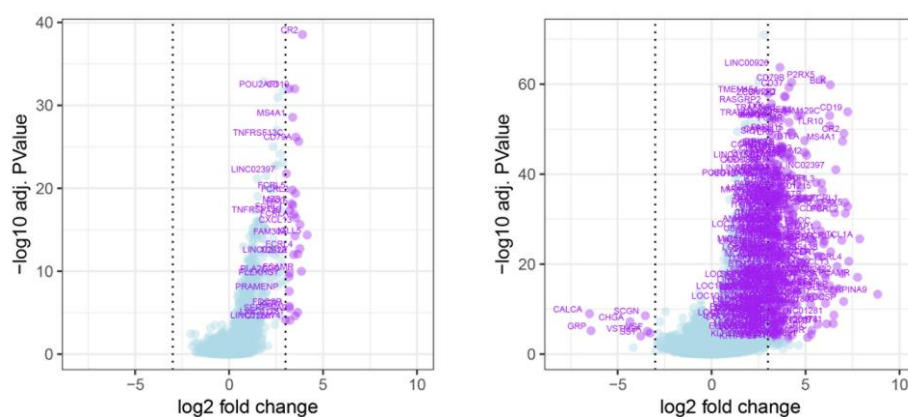


Figura 44. Volcano plots que muestran los genes diferencialmente expresados entre (A) tejidos NIT y SFI, y (B) tejidos NIT y ELI. El eje X representa *fold-change* observado para cada gen, y el eje Y el p-valor ajustado. Aquellos genes con valores absolutos de *fold-change* superiores a 3, junto a un p-valor ajustado inferior a 0,001 se muestran en morado.

En las **Tablas 7-9** se muestran los genes 10 genes cuya expresión se ve más aumentada y disminuida en cada una de las comparaciones realizadas, y cuyo p-valor sea, además, <0,01. Al comparar los tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI) con el grupo de tejidos sin presencia de infiltrado linfóide (NIT) observamos que los genes cuya expresión más aumenta codifican para proteínas expresadas principalmente en linfocitos B, como CD79a, BAFF-R, o CD21. Por el contrario, los genes cuya expresión se ve más disminuida en los tejidos del grupo SFI codifican para proteínas que intervienen en distintas vías de señalización, aunque resulta interesante destacar que, mientras que algunos de ellos, como RGS17 o USP6, son de expresión ubicua, otros tienen una expresión más restringida, como es el caso de THEG, MDH1B o KLH10, cuya expresión se ha descrito principalmente en el tejido testicular.

Al comparar el grupo de tejidos ELI con el grupo NIT, vemos de nuevo que los 10 genes cuya expresión más aumenta en el primer grupo con respecto al segundo codifican para proteínas específicas de células de origen hematopoyético, principalmente de linfocitos B como son CD19, PAX5 o diversos receptores de inmunoglobulinas; aunque también se encuentra en este grupo el gen FDCSP, que codifica para una proteína expresada en células dendríticas foliculares, y que tiene un papel en la regulación y formación de los centros germinales, y en la respuesta de anticuerpos por parte de los linfocitos B (153). En este caso el aumento de expresión de los genes específicos de linfocitos es mucho mayor que el observado en la comparación de los grupos SFI y NIT, probablemente como consecuencia directa del mayor grado de infiltración de estos tejidos. Por otro lado, entre los genes con expresión más reducida en el grupo ELI frente al NIT encontramos un único gen específico del tejido tiroideo, CALCA, expresado en

RESULTADOS

células C, y que codifica para la calcitonina. Entre los genes restantes cuya expresión se encuentra más disminuida en el grupo ELI, la mayor parte codifica para proteínas con funciones neuroendocrinas como pueden ser la somatostatina, el péptido liberador de gastrina, o el factor de crecimiento nervioso inducible, y cuya expresión se da principalmente en el sistema nervioso central o distintos tejidos endocrinos como las glándulas adrenales, la hipófisis, o ciertas zonas del aparato digestivo.

Por otro lado, los genes con la expresión más aumentada en el grupo SFI comparado con el grupo ELI coinciden parcialmente con aquellos con expresión más reducida en este segundo grupo frente a los tejidos sin infiltrar. Mientras que aquellos menos expresados en el grupo SFI frente al ELI son genes especialmente relacionados con tejido linfoide, principalmente con linfocitos B. Esto parece indicar que los genes más diferencialmente expresados en el grupo ELI con respecto a los otros dos dependen directamente del grado de infiltración de estas glándulas.

RESULTADOS

Tabla 7. Resumen de los 10 genes más diferencialmente expresados positiva y negativamente y con un p-valor inferior a 0,01 entre los grupos de NIT y SFI.

Gen	Proteína	Principal fuente de expresión	log2 Fold change	p-valor adj.
Expresión aumentada				
IGLL5	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	Linfocitos B	4,154	4,33344E-15
CR2	Complement C3d receptor 2 (CD21)	Linfocitos B	3,903	2,87528E-39
FCAMR	Fc fragment of IgA and IgM receptor	Tejido linfoide y epitelio renal	3,848	1,0447E-10
CXCL13	C-X-C motif chemokine ligand 13	Tejido linfoide secundario	3,773	2,30331E-16
FCRL4	Fc receptor like 4	LB de memoria residentes en epitelios	3,767	1,89941E-13
CD79A	CD79a molecule	Linfocitos B	3,707	2,19576E-26
LINC02422	Long intergenic non-protein coding RNA 2422	-	3,654	8,76458E-13
SERPINA9	Serpin family A member 9	LB asociados a centros germinales	3,648	9,01099E-06
TNFRSF13C	TNF receptor superfamily member 13C (BAFF-R)	Linfocitos B	3,555	6,81242E-27
FCRLA	Fc receptor like A	Linfocitos B	3,546	3,65004E-17
Expresión reducida				
THEG	Testicular haploid expressed gene protein	Núcleo de espermatoцитos	-2,043	0,00388731
LINC00051	Long intergenic non-protein coding RNA 51	-	-1,797	0,003877553
SLED1	Proteoglycan 3, pro eosinophil major basic protein 2 pseudogene	Sangre periférica	-1,071	0,006614687
USP6	Ubiquitin specific peptidase 6	Expresión ubicua	-0,989	0,000740286
LINC02232	Long intergenic non-protein coding RNA 2232	-	-0,812	0,009824797
ART5	ADP-ribosyltransferase 5	Tejido testicular	-0,742	0,000307901
HSD11B2	Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2	Riñon, aparato digestivo, y otros tejidos	-0,576	0,005778561
RGS17	Regulator of G protein signaling 17	Expresión ubicua	-0,441	0,002686842
MDH1B	Malate dehydrogenase 1B	Tejido testicular	-0,395	0,009074047
KLHL10	Kelch like family member 10	Tejido testicular	-0,376	0,00361487

RESULTADOS

Tabla 8. Resumen de los 10 genes más diferencialmente expresados positiva y negativamente y con un p-valor inferior a 0,01 entre los grupos de NIT y ELI.

Gen	Proteína	Principal fuente de expresión	log2 Fold change	p-valor adj.
Expresión aumentada				
SERPINA9	Serpin family A member 9	LB asociados a centros germinales	8,838	4,988E-14
TCL1A	TCL1 family AKT coactivator A	Linfocitos B	7,880	2,46912E-26
FCAMR	Fc fragment of IgA and IgM receptor	Tejido linfoides y epitelio renal	7,769	8,6425E-18
FCRL4	Fc receptor like 4	LB de memoria residentes en epitelios	7,301	2,36315E-21
CD19	CD19 molecule	Linfocitos B	7,243	1,42661E-54
PAX5	Paired box 5	Linfocitos B	7,240	1,60609E-33
FCRL2	Fc receptor like 2	Linfocitos B	7,119	5,25274E-32
FCRL1	Fc receptor like 1	Linfocitos B	7,101	2,08251E-34
CR2	Complement C3d receptor 2	Linfocitos B	7,038	9,68714E-50
FDCSP	Follicular dendritic cell secreted protein	Células dendríticas	7,028	2,08042E-12
Expresión reducida				
CALCA	Calcitonin related polypeptide alpha	Tiroides – Células C	-6,496	1,08617E-09
GRP	Gastrin releasing peptide	Expresión ubicua	-6,417	6,38566E-06
CHGA	Chromogranin A	Paratiroides, glándula adrenal, y otras células neuroendocrinas	-4,337	6,15386E-08
SST	Somatostatin	Aparato digestivo, sistema nervioso, glándulas adrenales	-3,771	9,71824E-05
SCGN	Secretagogen, EF-hand calcium binding protein	Aparato digestivo, sistema nervioso, hipófisis	-3,527	2,88214E-09
VGF	VGF nerve growth factor inducible	Sistema nervioso, hipófisis	-3,418	8,48606E-06
VSTM2A	V-set and transmembrane domain containing 2A	Sistema nervioso	-3,274	2,31552E-05
LOC100128317	Uncharacterized LOC100128317	-	-2,889	0,001771624
PTPRN	Protein tyrosine phosphatase receptor type N	Hipófisis, sistema nervioso, glándulas adrenales	-2,844	2,57114E-05
CSMD3	CUB and Sushi multiple domains 3	Sistema nervioso, hipófisis, tejido testicular	-2,827	0,006589902

RESULTADOS

Tabla 9. Resumen de los 10 genes más diferencialmente expresados positiva y negativamente y con un p-valor inferior a 0,01 entre los grupos de SFI y ELI.

Gen	Proteína	Principal fuente de expresión	log2 Fold change	p-valor adj.
Expresión aumentada				
CALCA	Calcitonin related polypeptide alpha	Tiroides – Células C	7,115	7,2103E-09
GRP	Gastrin releasing peptide	Expresión ubicua	6,930	2,3916E-05
CHGA	Chromogranin A	Paratiroides, glándula adrenal, y otras células neuroendocrinas	4,902	9,8434E-08
SST	Somatostatin	Aparato digestivo, sistema nervioso, glándulas adrenales	4,003	0,00033229
VGF	VGF nerve growth factor inducible	Sistema nervioso, hipófisis	3,785	1,9261E-05
CEACAM5	CEA cell adhesion molecule 5	Sistema digestivo	3,475	0,00021146
PTPRN	Protein tyrosine phosphatase receptor type N	Hipófisis, sistema nervioso, glándulas adrenales	3,344	1,528E-05
SCGN	Secretagogin, EF-hand calcium binding protein	Aparato digestivo, sistema nervioso, hipófisis	3,235	3,8945E-06
SLC7A11-AS1	SLC7A11 antisense RNA 1	Tejido testicular	3,146	2,2637E-05
GOLGA6L9	Golgin A6 family like 9	Expresión ubicua	3,036	0,00278831
Expresión reducida				
SERPINA9	Serpin family A member 9	LB asociados a centros germinales	-5,190	0,00043062
NLRP4	NLR family pyrin domain containing 4	Sistema nervioso, tejido testicular, tejido linfóide	-4,598	1,2448E-09
TCL1A	TCL1 family AKT coactivator A	Linfocitos B	-4,445	1,0284E-06
RGS13	Regulator of G protein signaling 13	Tejido linfóide	-4,165	1,9861E-10
TCL1B	TCL1 family AKT coactivator B	Tejido linfóide, tejido testicular, placenta	-4,127	0,00267118
KRT72	Keratin 72	Tejido testicular, piel y tejido linfóide	-3,925	5,3434E-12
FCAMR	Fc fragment of IgA and IgM receptor	Tejido linfóide y epitelio renal	-3,921	0,00064141
FCER2	Fc fragment of IgE receptor II	Linfocitos B	-3,921	3,4862E-12
AICDA	Activation induced cytidine deaminase	Linfocitos B	-3,893	2,398E-08
FCRL1	Fc receptor like 1	Linfocitos B	-3,884	3,6403E-08

Otro de los objetivos de este estudio es el de identificar cambios en la expresión de moléculas moduladoras de la respuesta inmune. Estos cambios podrían indicar que vías señalización podrían estar implicadas en la respuesta tisular a la pérdida de tolerancia por parte del sistema inmune, y los mecanismos periféricos implicados en la regulación de las respuestas autoinmunes. En la **Tabla 10** se recogen los cambios de expresión en las distintas comparaciones de los principales receptores o ligandos con efecto inmunomodulador descritos en la literatura.

RESULTADOS

Tabla 10. Expresión diferencial entre los distintos grupos de tiroides de algunos de los principales ligandos y receptores modulares de la respuesta inmune.

Proteína	Gen	SFI vs NIT		ELI vs NIT		SFI vs ELI	
		log2 Fold change	p-adj	log2 Fold change	p-adj	log2 Fold change	p-adj
PD-1	PDCD1	1,039	0,0000	3,265	0,0000	-2,227	0,0000
PD-L1	CD274	0,187	0,3876	0,793	0,0000	-0,606	0,0037
PD-L2	PDCD1LG2	0,185	0,4890	0,467	0,0271	-0,281	0,3192
VISTA	VSIR	0,082	0,7758	0,501	0,0007	-0,419	0,0218
IGSF11 (VSIG-3)	IGSF11	-0,188	0,6688	0,037	0,9332	-0,225	0,5885
IGSF11-AS1	IGSF11-AS1	-1,097	0,7288	-0,161	0,9563	ND	ND
CTLA-4	CTLA4	1,745	0,0000	4,497	0,0000	-2,752	0,0000
LAG3	LAG3	1,055	0,0000	2,711	0,0000	-1,656	0,0000
FGL1	FGL1	-0,148	0,9194	-0,463	0,5414	0,315	0,7387
CLEC4G	CLEC4G	-0,561	0,4301	0,176	0,8405	-0,738	0,3607
CD160	CD160	0,237	0,4865	1,121	0,0000	-0,883	0,0026
BTLA	BTLA	1,800	0,0000	4,948	0,0000	-3,148	0,0000
HVEM	TNFRSF14	-0,011	0,9787	0,634	0,0000	-0,645	0,0002
LAIR1	LAIR1	0,471	0,0777	1,813	0,0000	-1,342	0,0001
TIM3	HAVCR2	0,632	0,0008	1,847	0,0000	-1,215	0,0001
Gal9	LGALS9C	0,535	0,4225	1,555	0,0025	-1,020	0,1304
HMGB1	HMGB1	-0,009	0,9637	0,171	0,0229	-0,180	0,0427
CEACAM1	CEACAM1	-0,095	0,8681	-0,501	0,0697	0,407	0,2422
TIGIT	TIGIT	2,190	0,0000	4,432	0,0000	-2,242	0,0000
CD112	NECTIN2	0,071	0,7065	-0,553	0,0000	0,624	0,0000
CD113	NECTIN3	0,073	0,8143	-0,521	0,0004	0,594	0,0005
CD155	PVR	-0,032	0,9261	-0,709	0,0000	0,676	0,0000
IDO1	IDO1	0,434	0,3256	0,895	0,0288	-0,461	0,4149
IDO2	IDO2	0,016	0,9862	0,006	0,9916	0,010	0,9884
NLRC3	NLRC3	0,554	0,0000	2,493	0,0000	-1,939	0,0000
CD48	CD48	1,226	0,0000	3,587	0,0000	-2,361	0,0000
FCRL3	FCRL3	2,865	0,0000	5,848	0,0000	-2,984	0,0000
FCRL4	FCRL4	3,767	0,0000	7,301	0,0000	-3,534	0,0003
B7-H4	VTCN1	-0,351	0,7713	0,542	0,5027	-0,893	0,3025
B7-H3	CD276	0,014	0,9652	-0,244	0,0544	0,258	0,0847
CD96	CD96	0,571	0,0000	2,325	0,0000	-1,754	0,0000
CD111	NECTIN1	0,187	0,2756	0,095	0,6764	0,093	0,7240
HHLA2 (B7-H5)	HHLA2	0,639	0,3237	2,326	0,0000	-1,687	0,0094
TMIGD2	TMIGD2	0,456	0,2733	3,032	0,0000	-2,576	0,0000

RESULTADOS

Entre las distintas comparaciones entre grupos existen multitud de cambios significativos en la expresión de distintas molécula inmunomoduladoras, por lo que restringimos la búsqueda a aquellas con cambios de magnitud en su expresión superiores a 1,5 y con p-valores ajustados inferiores a 0,001. Al comparar el grupo de muestras SFI con el NIT destaca el aumento de expresión de CTLA-4 y TIGIT, que se expresan principalmente en linfocitos T, y el aumento de expresión FCRL3, FCRL4, y BTLA, que se expresan mayoritariamente en linfocitos B. Si comparamos el grupo de muestras con mayor infiltración linfoide (ELI) con el grupo NIT, las moléculas anteriormente citadas aumentan aún más su expresión. Se identifican, además, otros receptores y ligandos inmunomoduladores cuya expresión se ve incrementada por encima 1,5 órdenes de magnitud con respecto al grupo NIT, la mayor parte de estas proteínas, como PD-1, LAG3 o TIM3, se expresan principalmente en linfocitos T. Aunque también hay moléculas inmunomoduladoras que pueden ser producidas por distintos tipos celulares, como LAIR1, HHLA2 o Gal9.

2.3. Análisis de significación biológica

El objetivo de este análisis es determinar si un grupo determinado de genes, habitualmente pertenecientes a una misma categoría del gene ontology (GO), se encuentran sobrerrepresentados en una muestras con respecto a otra de referencia. Para ello se realizó un análisis utilizando dos bases de datos anotadas: Gene Ontology (GO) y Reactome Pathway Knowledge base. Ambas bases de datos trabajan empleando un grupo de genes previamente definidos por el usuario, en base al número de genes diferencialmente expresados en las tres comparaciones realizadas se definieron los siguientes criterios para la selección del grupo de genes utilizado para cada una de ellas:

SFI vs NIT: genes con cambios en su expresión superiores a 1 orden de magnitud y p-valor ajustado inferior a 0,05.

ELI vs NIT: genes con cambios en su expresión superiores a 3 orden de magnitud y p-valor ajustado inferior a 0,05.

SFI vs ELI: genes con cambios en su expresión superiores a 2 orden de magnitud y p-valor ajustado inferior a 0,05.

RESULTADOS

El proyecto Gene Ontology (GO) proporciona un vocabulario estandarizado que describe cada gen en base a tres categorías diferentes: procesos biológicos (BP), compuestos celulares (CC) y función molecular (MF). Empleando esta base de datos se realiza un análisis de enriquecimiento en las distintas comparaciones en los grupos descritos (NIT, SFI y ELI) en cada una de las categorías ontológicas definidas por GO. Para cada categoría de GO y comparación se obtiene un listado con los principales términos GO enriquecidos en el grupo seleccionado con respecto al de referencia. En cada una de las **Tablas 11-13** se muestran los resultados obtenidos para cada comparación, en ellas se detallan los 10 términos más enriquecidos en cada una de las categorías GO. Al comparar cualquiera de los dos grupos de muestras que presentan infiltrados linfoides, SFI y ELI, con el grupo de muestras no infiltradas vemos que los 10 procesos biológicos (BP) más enriquecidos son aquellos relacionados con activación, diferenciación y adhesión de leucocitos, y más concretamente de linfocitos (**Figuras 45-46**). En cuanto a la categoría de componentes celulares (CC), en ambos casos cabe destacar el enriquecimiento en genes relacionados con el complejo TCR, con la sinapsis inmunológica, y con otros receptores y membrana. En la categoría de función molecular (MF) algunos de los términos más enriquecidos en el grupo SFI hacen referencia a la actividad de receptores de citocinas y de nucleótidos, o a la actividad de adaptadores de la señalización; en el caso del grupo ELI, podemos encontrar, además, enriquecimiento en la regulación de receptores y de sus ligandos, así como específicamente en receptores de TNF. En los anexos se muestran diferentes representaciones gráficas para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos. Las **Figuras suplementarias 12-18** muestran el resto de las representaciones de las redes de los genes correspondientes a los términos más enriquecidos en cada comparación. Las **Figuras suplementarias 19-27** muestran mapas con la relación entre los términos más enriquecidos encontrados para cada categoría y comparación realizadas, en este tipo de gráfico los términos GO se agrupan en función a similitud.

RESULTADOS

Tabla 11. Términos pertenecientes a las tres categorías definidas por Gene Ontology enriquecidos en la comparación entre muestras NIT y SFL.

Identificación	Descripción	Ratio de genes ¹	p-valor ajustado
Procesos biológicos (BP)			
GO:0042110	T cell activation	46/240	7.31e-23
GO:0030098	lymphocyte differentiation	35/240	4.06e-18
GO:0051249	regulation of lymphocyte activation	40/240	4.09e-18
GO:1903037	regulation of leukocyte cell-cell adhesion	35/240	8.79e-18
GO:0050863	regulation of T cell activation	34/240	8.79e-18
GO:0007159	leukocyte cell-cell adhesion	36/240	1.13e-17
GO:0002521	leukocyte differentiation	40/240	1.14e-17
GO:0022407	regulation of cell-cell adhesion	37/240	7.37e-17
GO:0002696	positive regulation of leukocyte activation	31/240	3.27e-14
GO:0050867	positive regulation of cell activation	31/240	7.67e-14
Componentes celulares (CC)			
GO:0009897	external side of plasma membrane	29/254	1.59e-15
GO:0098552	side of membrane	36/254	9.89e-15
GO:0001772	immunological synapse	9/254	2.80e-08
GO:0098802	plasma membrane receptor complex	16/254	1.47e-07
GO:0043235	receptor complex	19/254	4.75e-06
GO:0042101	T cell receptor complex	6/254	4.75e-06
GO:0098636	protein complex involved in cell adhesion	5/254	3.01e-03
Función molecular (MF)			
GO:0004896	cytokine receptor activity	10/226	1.17e-04
GO:0071723	lipopeptide binding	4/226	6.09e-04
GO:0001614	purinergic nucleotide receptor activity	5/226	6.09e-04
GO:0016502	nucleotide receptor activity	5/226	6.09e-04
GO:0035586	purinergic receptor activity	5/226	1.22e-03
GO:0035591	signaling adaptor activity	7/226	5.00e-03
GO:0005070	SH3/SH2 adaptor activity	6/226	5.38e-03

¹Ratio de genes: número de genes pertenecientes a una determinado término ontológico diferencialmente expresados entre ambos grupos de muestras sobre el total de los genes que conforman dicho término.

RESULTADOS

Tabla 12. Términos pertenecientes a las tres categorías definidas por Gene Ontology enriquecidos en la comparación entre muestras NIT y ELI.

Identificación	Descripción	Ratio de genes ¹	p-valor ajustado
Procesos biológicos (BP)			
GO:0042110	T cell activation	52/249	4.60e-28
GO:0051249	regulation of lymphocyte activation	46/249	7.01e-23
GO:0050863	regulation of T cell activation	39/249	3.61e-22
GO:1903037	regulation of leukocyte cell-cell adhesion	40/249	3.61e-22
GO:0007159	leukocyte cell-cell adhesion	41/249	7.84e-22
GO:0002521	leukocyte differentiation	44/249	1.56e-20
GO:1903039	positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion	32/249	3.23e-20
GO:0002696	positive regulation of leukocyte activation	38/249	3.23e-20
GO:0030098	lymphocyte differentiation	37/249	3.58e-20
GO:0022407	regulation of cell-cell adhesion	41/249	5.33e-20
Componentes celulares (CC)			
GO:0098552	side of membrane	40/264	2.76e-17
GO:0009897	external side of plasma membrane	31/264	2.76e-17
GO:0001772	immunological synapse	12/264	1.12e-12
GO:0042101	T cell receptor complex	8/264	5.69e-09
GO:0098802	plasma membrane receptor complex	16/264	2.37e-07
GO:0043235	receptor complex	18/264	3.97e-05
GO:0031234	extrinsic component of cytoplasmic side of plasma membrane	8/264	4.73e-03
GO:0009898	cytoplasmic side of plasma membrane	10/264	4.73e-03
GO:0098562	cytoplasmic side of membrane	10/264	9.85e-03
Función molecular (MF)			
GO:0004896	cytokine receptor activity	10/236	1.57e-04
GO:0030545	receptor regulator activity	20/236	1.92e-03
GO:0048018	receptor ligand activity	19/236	1.92e-03
GO:0005164	tumor necrosis factor receptor binding	5/236	4.58e-03
GO:0004715	non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity	6/236	4.58e-03
GO:0035591	signaling adaptor activity	7/236	5.91e-03
GO:0005070	SH3/SH2 adaptor activity	6/236	6.15e-03
GO:0005125	cytokine activity	11/236	9.79e-03
GO:0016176	superoxide-generating NADPH oxidase activator activity	3/236	9.91e-03
GO:0071723	lipopeptide binding	3/236	9.91e-03

¹Ratio de genes: número de genes pertenecientes a una determinado término ontológico diferencialmente expresados entre ambos grupos de muestras sobre el total de los genes que conforman dicho término.

RESULTADOS

Tabla 13. Términos pertenecientes a las tres categorías definidas por Gene Ontology enriquecidos en la comparación entre muestras SFI y ELI.

Identificación	Descripción	Ratio de genes ¹	p-valor ajustado
Procesos biológicos (BP)			
GO:0042110	T cell activation	63/337	1.50e-31
GO:0050863	regulation of T cell activation	46/337	1.69e-23
GO:1903037	regulation of leukocyte cell-cell adhesion	47/337	1.96e-23
GO:0051249	regulation of lymphocyte activation	53/337	2.13e-23
GO:0007159	leukocyte cell-cell adhesion	48/337	6.41e-23
GO:1903039	positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion	38/337	4.56e-22
GO:0050870	positive regulation of T cell activation	37/337	7.12e-22
GO:0030098	lymphocyte differentiation	44/337	7.81e-22
GO:0002521	leukocyte differentiation	52/337	7.81e-22
GO:0002696	positive regulation of leukocyte activation	45/337	7.81e-22
Componentes celulares (CC)			
GO:0098552	side of membrane	43/353	8.80e-15
GO:0009897	external side of plasma membrane	32/353	2.00e-14
GO:0001772	immunological synapse	11/353	1.33e-09
GO:0042101	T cell receptor complex	8/353	7.32e-08
GO:0098802	plasma membrane receptor complex	18/353	4.92e-07
GO:0043235	receptor complex	20/353	2.26e-04
GO:0000779	condensed chromosome, centromeric region	11/353	5.63e-04
GO:0000775	chromosome, centromeric region	14/353	6.76e-04
GO:0009898	cytoplasmic side of plasma membrane	12/353	3.39e-03
GO:0000777	condensed chromosome kinetochore	9/353	4.51e-03
Función molecular (MF)			
GO:0004896	cytokine receptor activity	15/327	6.95e-08
GO:0005125	cytokine activity	17/327	2.23e-04
GO:0005164	tumor necrosis factor receptor binding	7/327	2.23e-04
GO:0048018	receptor ligand activity	25/327	2.31e-04
GO:0004715	non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity	8/327	4.24e-04
GO:0030545	receptor regulator activity	25/327	4.24e-04
GO:0001637	G-protein coupled chemoattractant receptor activity	6/327	4.24e-04
GO:0004950	chemokine receptor activity	6/327	4.24e-04
GO:0032813	tumor necrosis factor receptor superfamily binding	7/327	1.10e-03
GO:0071723	lipopeptide binding	4/327	1.10e-03

¹Ratio de genes: número de genes pertenecientes a una determinado término ontológico diferencialmente expresados entre ambos grupos de muestras sobre el total de los genes que conforman dicho término.

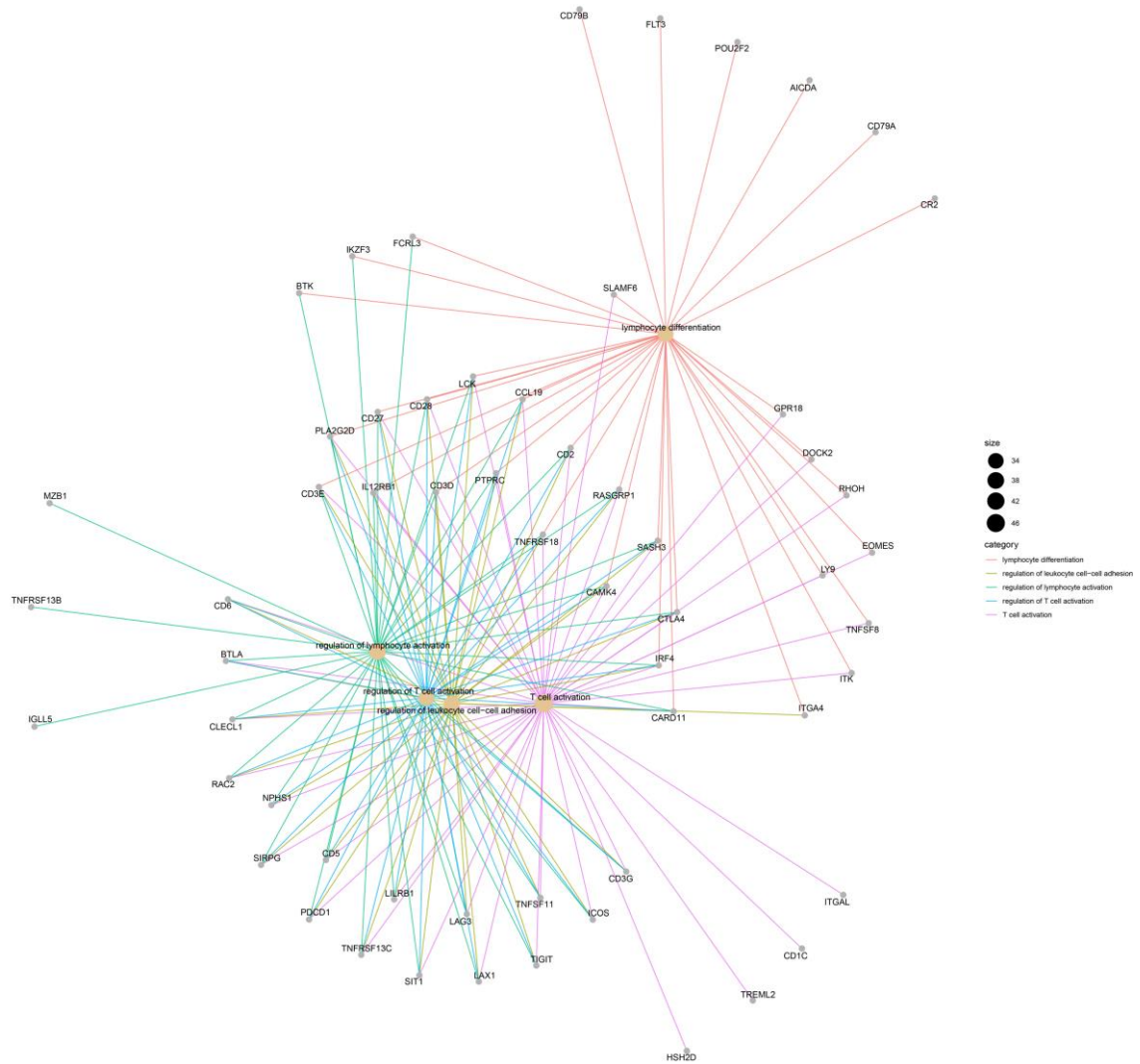


Figura 45. Red de genes encontrados en los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de procesos biológicos en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI). Cada gen se representa unido con los términos a los que pertenece. Los términos GO enriquecidos se muestran como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes que los forman y que se han encontrado diferencialmente expresados.

RESULTADOS

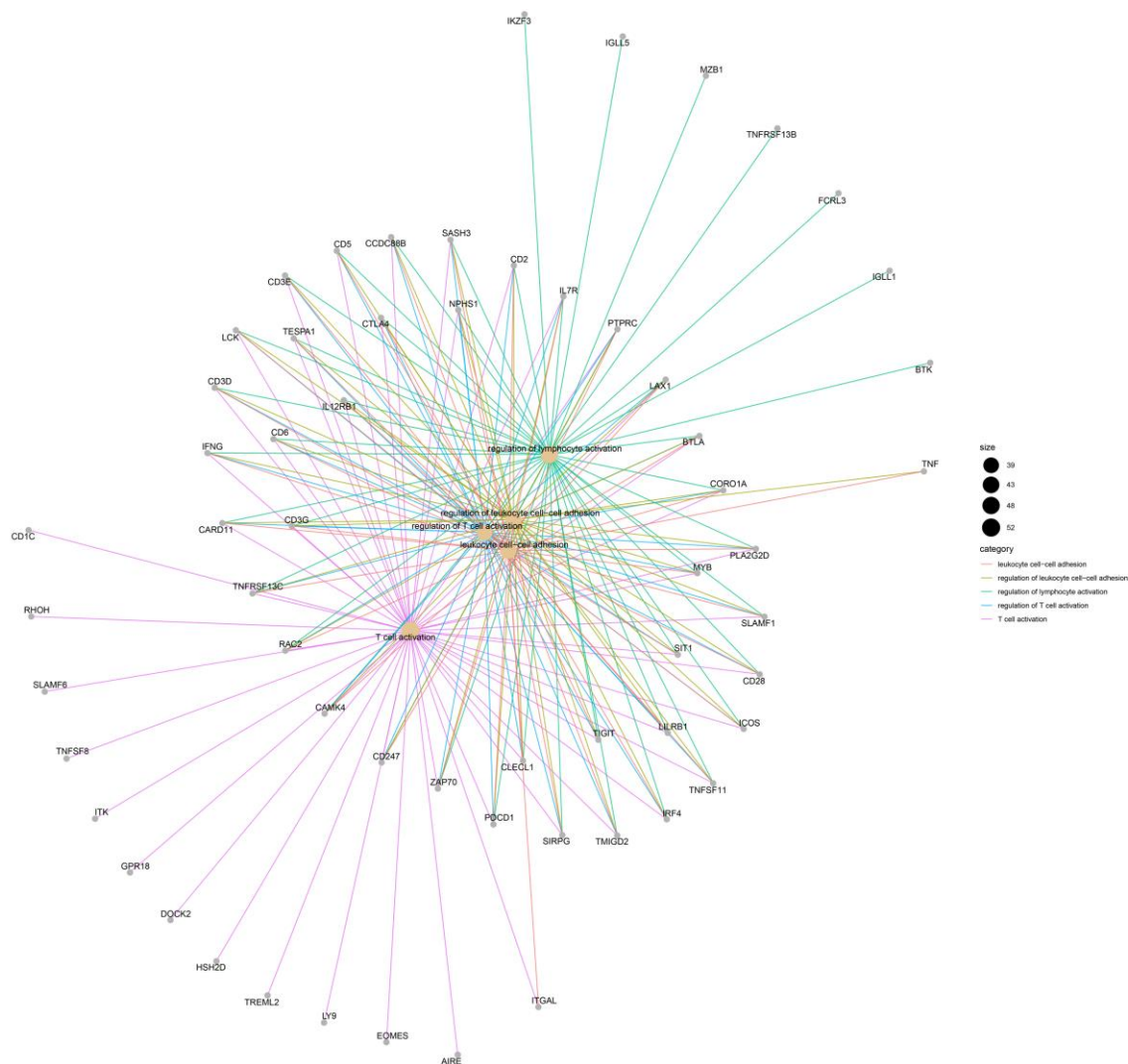


Figura 46. Red de genes encontrados en los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de procesos biológicos en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con infiltración extensa (ELI). Cada gen se representa unido con los términos a los que pertenece. Los términos GO enriquecidos se muestran como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes que los forman y que se han encontrado diferencialmente expresados.

La base Reactome Pathway Database, de forma análoga a GO utiliza un vocabulario estandarizado para clasificar los procesos biológicos de un organismo, estos procesos se pueden a su vez agrupar en vías biológicas. Mediante el uso de esta base de datos realizamos las comparaciones entre los distintos grupos de muestras para obtener un listado de vías biológicas enriquecidas en cada situación. Las 10 vías más representadas en cada una de las

RESULTADOS

tres comparaciones realizadas se muestran en las **Tablas 14-16**, en todas ellas los procesos biológicos más sobrerrepresentados a nivel transcripcional están relacionados con interacciones entre células del sistema inmune, señalización por diversas citocinas, señalización a través del BCR y TCR, y procesos de adhesión celular. Las **Figuras suplementarias 28-30** representan las redes formadas por los genes y los procesos biológicos con los que están relacionados, por otro lado, las **Figuras suplementarias 31-33** muestran las principales vías representadas en cada situación, agrupándolas entre en sí en base a su similitud.

RESULTADOS

Tabla 14. Vías biológicas pertenecientes a la clasificación de Reactome enriquecidas en la comparación entre muestras NIT y ELI.

Identificación	Descripción	Ratio de genes ¹	p-valor ajustado	Genes ²
R-HSA-198933	Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell	17/145	7.07e-10	CD19, SLAMF7, SLAMF6, ITGA4, CD3E, CD3D, SH2D1A, CRTAM, ITGAL, LILRB1, CD3G, TREML2, NCR3, SIGLEC8, SIGLEC6, CD1C, CD1B
R-HSA-5669034	TNFs bind their physiological receptors	9/145	1.89e-08	TNFRSF13B, TNFRSF17, CD27, TNFRSF18, TNFSF8, LTA, TNFRSF9, TNFSF11, EDAR
R-HSA-388841	Costimulation by the CD28 family	10/145	4.66e-06	BTLA, CTLA4, CD28, LCK, CD3E, CD3D, PDCD1, CD3G, ICOS, NPHS1
R-HSA-5668541	TNFR2 non-canonical NF- κ B pathway	11/145	9.95e-06	TNFRSF13C, TNFRSF13B, TNFRSF17, LTB, CD27, TNFRSF18, TNFSF8, LTA, TNFRSF9, TNFSF11, EDAR
R-HSA-983695	Antigen activates B Cell Receptor (BCR) leading to generation of second messengers	7/145	5.83e-05	CD19, BLK, CD79A, DAPP1, CD79B, BTK, NPHS1
R-HSA-375276	Peptide ligand-binding receptors	13/145	1.07e-04	PNOC, CXCL13, CCR4, CXCR5, CXCL9, KISS1R, CCL19, PMCH, CCR8, NMU, MC4R, CXCL11, UTS2
R-HSA-202733	Cell surface interactions at the vascular wall	11/145	1.37e-04	SIRPG, JCHAIN, CD84, CD48, FCAMR, VPREB3, LCK, ITGA4, CD2, ITGAL, VPREB1
R-HSA-380108	Chemokine receptors bind chemokines	7/145	1.57e-04	CXCL13, CCR4, CXCR5, CXCL9, CCL19, CCR8, CXCL11
R-HSA-983705	Signaling by the B Cell Receptor (BCR)	10/145	1.88e-04	CD19, BLK, CD79A, DAPP1, CD79B, CARD11, PRKCB, BTK, RASGRP1, NPHS1
R-HSA-373076	Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)	16/145	3.04e-04	PNOC, CXCL13, P2RY10, CCR4, CXCR5, GPR18, CXCL9, KISS1R, CCL19, PMCH, CCR8, NMU, MC4R, CXCL11, UTS2, TAAR1

¹Ratio de genes: número de genes pertenecientes a una determinado término ontológico diferencialmente expresados entre ambos grupos de muestras sobre el total de los genes que conforman dicho término.

²Genes: listado de genes incluidos en cada uno de los términos que se encuentran diferencialmente expresados entre ambos grupos de muestras.

RESULTADOS

Tabla 15. Vías biológicas pertenecientes a la clasificación de Reactome enriquecidas en la comparación entre muestras NIT y ELI.

Identificación	Descripción	Ratio de genes ¹	p-valor ajustado	Genes ²
R-HSA-198933	Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell	19/147	5.22e-12	CD19, SLAMF6, SELL, CD3E, TREML2, CD247, CD3G, CD3D, ITGAL, LILRB1, SLAMF7, NCR3, SH2D1A, CRTAM, CD22, SIGLEC8, CD1C, LILRA4, SIGLEC6
R-HSA-388841	Costimulation by the CD28 family	11/147	5.83e-07	BTLA, PDCD1, LCK, CD3E, CD247, CD3G, CD3D, CTLA4, CD28, ICOS, NPHS1
R-HSA-983695	Antigen activates B Cell Receptor (BCR) leading to generation of second messengers	8/147	5.74e-06	CD79B, BLK, CD19, DAPP1, BTK, CD79A, CD22, NPHS1
R-HSA-5669034	TNFs bind their physiological receptors	7/147	9.07e-06	TNFSF8, LTA, TNFRSF13B, TNFRSF17, TNFSF11, EDAR, TNFRSF9
R-HSA-202430	Translocation of ZAP-70 to Immunological synapse	6/147	1.04e-05	LCK, CD3E, ZAP70, CD247, CD3G, CD3D
R-HSA-202433	Generation of second messenger molecules	7/147	1.58e-05	LCK, CD3E, ZAP70, CD247, CD3G, CD3D, ITK
R-HSA-202427	Phosphorylation of CD3 and TCR zeta chains	6/147	1.89e-05	LCK, CD3E, CD247, CD3G, CD3D, PTPRC
R-HSA-202733	Cell surface interactions at the vascular wall	12/147	1.89e-05	VPREB3, CD48, LCK, SIRPG, SELL, CD2, CD84, ITGAL, FCAMR, IGLL1, JCHAIN, VPREB1
R-HSA-389948	PD-1 signaling	6/147	2.05e-05	PDCD1, LCK, CD3E, CD247, CD3G, CD3D
R-HSA-5668541	TNFR2 non-canonical NF-kB pathway	10/147	4.19e-05	LTB, TNFRSF13C, TNFSF8, LTA, TNFRSF13B, TNFRSF17, TNFSF11, EDAR, TNF, TNFRSF9

¹Ratio de genes: número de genes pertenecientes a una determinado término ontológico diferencialmente expresados entre ambos grupos de muestras sobre el total de los genes que conforman dicho término.

²Genes: listado de genes incluidos en cada uno de los términos que se encuentran diferencialmente expresados entre ambos grupos de muestras.

RESULTADOS

Tabla 16. Vías biológicas pertenecientes a la clasificación de Reactome enriquecidas en la comparación entre muestras SFI y ELI.

Identificación	Descripción	Ratio de genes ¹	p-valor ajustado	Genes ²
R-HSA-198933	Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell	19/206	3.46e-09	SELL, SLAMF6, TREML2, CD247, CD3E, CD19, CD3G, CD40LG, CD22, CD3D, ITGAL, LILRB1, NCR3, LILRA4, SIGLEC10, SIGLEC8, CD1C, SIGLEC6, CD1A
R-HSA-388841	Costimulation by the CD28 family	13/206	2.22e-07	BTLA, PDCD1, LCK, VAV1, CD247, CD3E, GRAP2, CD3G, CD3D, CTLA4, ICOS, CD28, NPHS1
R-HSA-202433	Generation of second messenger molecules	9/206	1.44e-06	WAS, ZAP70, LCK, CD247, CD3E, GRAP2, CD3G, CD3D, ITK
R-HSA-983695	Antigen activates B Cell Receptor (BCR) leading to generation of second messengers	9/206	5.34e-06	CD79B, BLK, BTK, VAV1, DAPP1, CD19, CD22, CD79A, NPHS1
R-HSA-5669034	TNFs bind their physiological receptors	7/206	8.85e-05	TNFSF8, LTA, TNFSF11, EDAR, CD70, TNFRSF17, TNFRSF13B
R-HSA-202430	Translocation of ZAP-70 to Immunological synapse	6/206	8.85e-05	ZAP70, LCK, CD247, CD3E, CD3G, CD3D
R-HSA-202733	Cell surface interactions at the vascular wall	13/206	1.79e-04	VPREB3, SELL, CD48, LCK, SPN, CD2, SIRPG, ITGAL, CD84, SLC7A11, IGLL1, CEACAM5, FCAMR
R-HSA-380108	Chemokine receptors bind chemokines	8/206	1.79e-04	CCR6, CCR7, CXCR4, CXCR3, CXCR5, CCR9, XCL2, CXCL13
R-HSA-5668541	TNFR2 non-canonical NF-κB pathway	11/206	1.79e-04	TNFSF8, CD40LG, LTB, LTA, TNFSF11, TNF, EDAR, CD70, TNFRSF13C, TNFRSF17, TNFRSF13B
R-HSA-389948	PD-1 signaling	6/206	1.79e-04	PDCD1, LCK, CD247, CD3E, CD3G, CD3D

¹Ratio de genes: número de genes pertenecientes a una determinado término ontológico diferencialmente expresados entre ambos grupos de muestras sobre el total de los genes que conforman dicho término.

²Genes: listado de genes incluidos en cada uno de los términos que se encuentran diferencialmente expresados entre ambos grupos de muestras.

En conjunto, existen múltiples diferencias a nivel transcripcional entre los tres grupos de muestras definidos en base a la revisión de los datos histológicos. Estos cambios afectan principalmente a genes expresados principalmente en células del sistema inmune, o a gene con funciones inmunomoduladoras, siendo además estos cambios más pronunciados en el grupo con mayor grado de infiltración linfocitaria (ELI).

3. Cibersort

Los datos de expresión génica para cada uno de los tejidos incluidos en el estudio se analizaron empleando la aplicación web Cibersort para obtener una estimación de la abundancia relativa de 22 subpoblaciones diferentes de células del sistema inmune. La composición relativa del infiltrado linfocitario para cada uno de los tejidos se muestra en la **Figura suplementaria 34**. De forma general, y sin diferenciar entre los distintos grupos de tejidos, cabe destacar la abundancia en los infiltrados linfocitarios de estas muestras de tiroides de macrófagos del tipo M2 y linfocitos CD4 de memoria en reposo, aunque en menor proporción también podemos encontrar células B y linfocitos CD8 naïve (**Figura 47**).

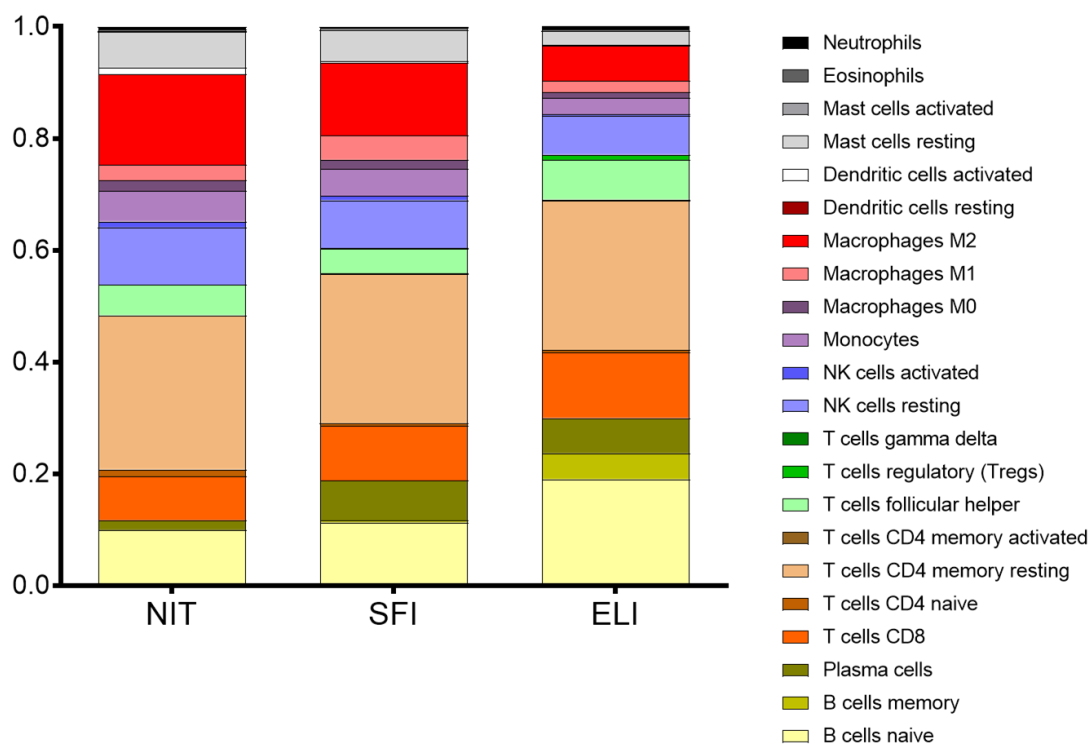


Figura 47. Composición relativa media de los infiltrados en los tres tipos de tejidos estudiados mediante RNA-seq: tiroides no infiltrados (NIT), con presencia de pequeños infiltrados focales (SFI), y con infiltrados extensos (ELI).

Si analizamos la abundancia relativa de las subpoblaciones celulares definidas por el archivo de referencia LM22 proporcionado por la plataforma en cada uno de los grupos de muestras, encontramos que algunas de ellas presentan

RESULTADOS

diferencias significativas entre sí. Las mayores diferencias se encuentran en el compartimento de linfocitos B, que muestra una mayor presencia de linfocitos B, tanto de memoria como naïve, en las muestras SFI y ELI, especialmente en este último grupo; observamos además un aumento de las células plasmáticas en ambos grupos con respecto al grupo NIT (**Figura 48A**). Con relación a las células de origen mieloide, si bien de forma general los macrófagos M2 son una de las subpoblaciones más representadas en el conjunto de las muestras, su presencia relativa disminuye en los grupos SFI y ELI con respecto a las muestras NIT, mientras que los macrófagos de tipo M1 presentan un ligero aumento en el grupo SFI con respecto al grupo NIT (**Figura 48B**). Además, en el grupo ELI con respecto al NIT observamos una disminución de la proporción de monocitos y células NK (**Figuras 48C-D**), y un pequeño aumento de linfocitos CD8 (**Figura 48E**).

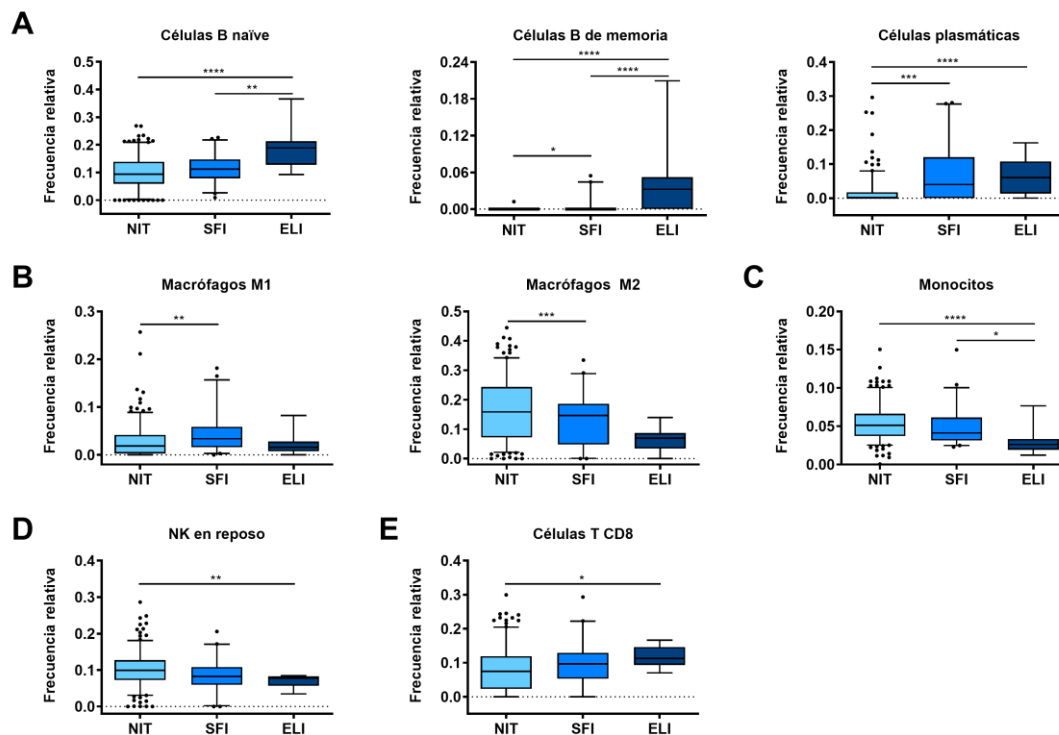


Figura 48. Comparación de la frecuencia relativa de distintas poblaciones infiltrantes de interés entre los grupos de tejidos no infiltrados (NIT), con infiltrados focales (SFI) y con infiltrados extensos (ELI). Diferencias encontrados entre los tejidos (A) en las subpoblaciones de células B naïve, B de memoria y células plasmáticas, (B) subpoblaciones de macrófagos M1 y M2, (C) monocitos, (D) células NK en reposo, y, (E) células T CD8+. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

RESULTADOS

Las células CD4 de memoria en reposo son la principal población celular identificada por Cibersort en la mayor parte de los tiroides independientemente a su clasificación. Sin embargo, el uso del archivo de referencia LM22 no permite diferenciar la polarización en este tipo de células T. Para determinar el tipo de respuesta Th predominante en los tejidos infiltrados en primer lugar se seleccionó un grupo de genes característicamente expresados por las subpoblaciones Th1, Th2, y Th17 (154). La expresión diferencial de estos genes entre los grupos de muestras SFI y ELI sugiere que la respuesta Th1 es la predominante en los procesos de tiroiditis, y esta aumenta en los tejidos más infiltrados (**Figura 49**).

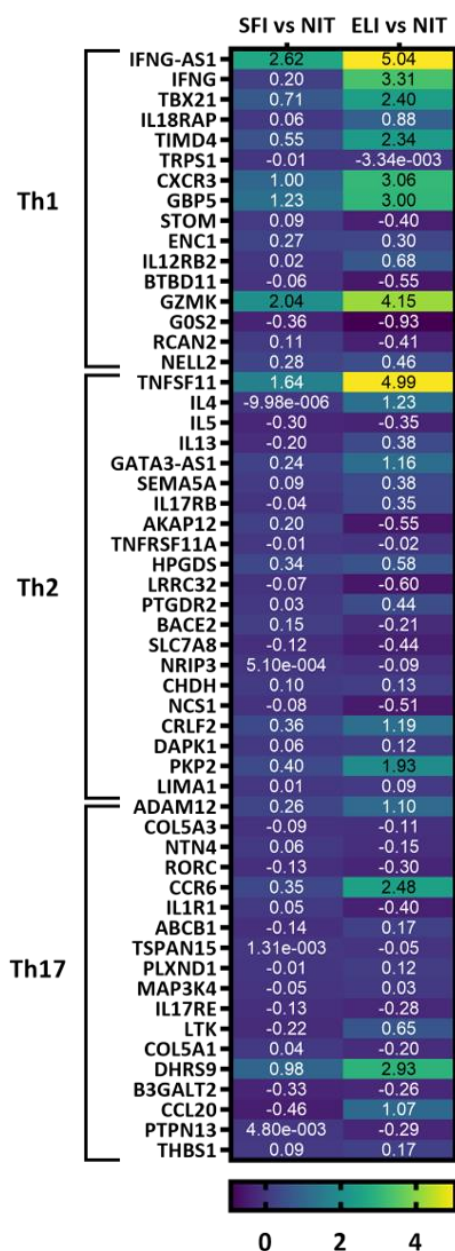


Figura 49. Heatmap de la expresión diferencial de los genes asociados a las distintas respuestas Th entre los tejidos sin infiltrar (NIT) y los dos grupos con distinto grado de infiltración linfocitaria (SFI y ELI). Se observa un aumento de genes asociados a la respuesta Th1 que es especialmente marcado en la comparación entre el grupo NIT y ELI. Los números contenidos en cada celda corresponden con el *fold-change* obtenido en el análisis de expresión diferencial.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La clonación de una serie de moléculas con la capacidad de modular la activación de linfocitos T durante los años noventa reveló un nivel de complejidad en la regulación de la respuesta inmune hasta ese momento no sospechado (155). Hasta el momento se han identificado más de una decena de pares de receptores y ligandos que se sabe intervienen en la activación de linfocitos T, aunque estemos lejos de comprender la función de cada uno de ellos (65). Actualmente se reconoce que la regulación de esta respuesta inmune es en general mucho más compleja de lo inicialmente supuesto, y que podría jugar un papel clave en el mantenimiento de la tolerancia a lo propio y, que sus fallos pueden dar lugar a las enfermedades autoinmunes. A este conjunto de moléculas se les ha denominado *checkpoint receptors* debido a que actúan como puntos de control de la progresión de la respuesta inmune, aunque también se pueden considerar como moléculas coestimuladoras o coinhibidoras de la activación de linfocitos T. Las primeras parejas receptor/ligando de *checkpoint-receptors* inhibidores caracterizados fueron CTLA-4/CD28 y PD-1/PDL-1 -L2. Mientras CTLA-4 actúa inmediatamente tras la activación, PD-1 y otras *checkpoint receptors* actúan en fases posteriores.

Fue la presencia de un motivo ITIM en la cola citoplasmática de PD-1, uno de los primeros correceptores identificado, lo que sugirió que este podría poseer la capacidad de regular negativamente determinadas respuestas inmunes *in vivo* (156). La generación de distintos modelos animales corroboró dicha función, y múltiples trabajos han aportado resultados que sugieren que el eje de señalización formado por PD-1 y PD-L1/PD-L2 participa en el mantenimiento de la tolerancia, siendo un claro ejemplo de ello el desarrollo de una enfermedad similar al LES en ratones C57BL/6 PD-1^{-/-}, o el aumento de la penetrancia y el inicio más temprano de diabetes en ratones NOD PD-1^{-/-} (157,158). Sin embargo, su papel en el desarrollo y el mantenimiento de las enfermedades autoinmunes en humanos está por determinar. A pesar del reciente interés que ha adquirido PD-1 como diana terapéutica en el campo de la oncología por su expresión en las denominadas células *exhausted*, esta molécula se expresa preferentemente en células T tras su activación, pero también se ha descrito su presencia en células Treg, Tfh, y de forma más minoritaria en otras células de origen hematopoyético como linfocitos B, células NK o NKT, macrófagos o células dendríticas. Sus ligandos, PD-L1 y PD-L2, se expresan principalmente en macrófagos y células dendríticas. Aunque se ha demostrado su expresión en distintos órganos no linfoides en ratón y humano, dicha expresión normalmente se ha asociado a células presentadoras de antígeno presentes en estos tejidos o a el endotelio vascular (159,160).

DISCUSIÓN

Con el objetivo de comprender mejor el papel de este eje de señalización en las enfermedades autoinmunes órgano-específicas en humanos, es necesario evaluar la expresión de PD-1 y de sus ligandos no solo en las células de sistema inmune, sino también en las células parenquimatosas del órgano diana. Por esta razón, en el presente trabajo se ha estudiado la expresión de PD-1, PD-L1, y PD-L2 en células mononucleares de sangre periférica (CMSPs), linfocitos infiltrantes del tiroides (LITs), y en las propias células foliculares tiroideas (CFTs) en pacientes con enfermedad de Graves (EG) y tiroiditis de Hashimoto (TH), utilizando muestras de pacientes con bocio multinodular (BMN) como control no autoinmune. Mediante el uso combinado de citometría de flujo sobre células frescas, inmunofluorescencia en secciones de tejido criopreservado, y experimentos de inducción *in vitro* en cultivos primarios de CFTs y de líneas celulares derivadas de tiroides, hemos demostrado de forma fehaciente que las CFTs tienen la capacidad de expresar PD-L1 y que, de hecho, este se expresa muy moderadamente en CFTs en las glándulas afectadas por procesos autoinmunes. Los resultados obtenidos sugieren, por tanto, que el eje de señalización PD-1/PD-L1 mantiene un papel activo en el control de la respuesta autoinmune en el tiroides de pacientes con EAT.

Para explorar la capacidad funcional de la expresión de PD-L1 en CFTs, pero no en células de origen hematopoyético, en experimentos posteriores se estudió en cultivos primarios la interacción de CFTs y CMSPs autólogos, y su efecto sobre la capacidad proliferativa de estos últimos. Los resultados obtenidos muestran que el cocultivo con CFTs autólogos es capaz de inhibir la proliferación de CMSPs inducida mediante la estimulación con anticuerpos anti-CD3/CD28, aunque este proceso no es dependiente de la señalización mediada por PD-1 (Datos no mostrados). Con el objetivo de identificar otras posibles vías inmunomoduladoras implicadas en el mantenimiento de las respuestas autorreactivas frente al tiroides, se analizaron los datos de RNA-seq obtenidos de tejido tiroideo de donantes de órganos pertenecientes al proyecto GTEx (144), y cedidos a nuestro grupo por el NIH.

El presente trabajo aporta datos que demuestran por primera vez la implicación de la vía de señalización PD-1/PD-L1 en las EAT. Si bien los resultados obtenidos sugieren que la expresión de PD-L1 por parte de las CFTs podría constituir un mecanismo de tolerancia periférica que favorecería el control de los linfocitos autorreactivos, la interacción entre las CFTs y los LITs es un fenómeno presumiblemente complejo que requerirá de la intervención de múltiples moléculas. Caracterizar en detalle la contribución de PD-1/PD-L1, así como de

DISCUSIÓN

otras vías de señalización, a este proceso requerirá estudios adicionales. Creemos que los datos aquí expuestos son fiables al haberse obtenido mediante distintas técnicas complementarias como la citometría de flujo en células frescas y cultivos, la inmunofluorescencia indirecta en secciones de tejidos congelados, o la determinación de la expresión génica mediante qPCR.

En primer lugar, empleando citometría de flujo demostramos que los linfocitos T CD4 circulantes de pacientes con EG mostraban un ligero aumento de la expresión de PD-1 respecto a muestras de controles obtenidos de donantes de sangre. El incremento de la expresión de PD-1 en linfocitos T de sangre periférica, tanto CD4 como CD8, se ha observado previamente asociado a otras enfermedades autoinmunes como el LES, la trombocitopenia autoinmune, o la esclerosis sistémica en humanos (161–163). Al comparar la expresión de PD-1 en linfocitos circulantes e intratiroidales en muestras de pacientes con enfermedad de Graves, observamos un incremento significativo en la expresión de PD-1 en LITs, detectándose las mayores diferencias en las subpoblaciones de memoria T_{CM} y T efectoras, las cuales constituían además la mayor parte del infiltrado T en los tiroides estudiados. Estas subpoblaciones de linfocitos intratiroidales presentaban a su vez una proporción variable de células con una alta expresión de PD-1 (PD-1^{hi}), este patrón de expresión de PD-1 no pudo detectarse en muestras de sangre periférica. Mediante el uso de IFI en secciones de tiroides congelado se confirmó la alta expresión de PD-1 los LITs CD4 y CD8 en muestras de pacientes con EG y TH. Esto permitió además realizar una descripción general de la organización de los infiltrados en estas glándulas. De acuerdo a lo publicado previamente por otros grupos, la mayor parte de los linfocitos T se encontraban en grandes infiltrados en espacios interfoliculares, los cuales estaban formados principalmente por linfocitos CD4, mientras que los linfocitos CD8 podían encontrarse además infiltrando de forma difusa grandes áreas del tejido (164,165).

El predominio de un fenotipo de memoria y efector, y la alta expresión de PD-1 en estas subpoblaciones de los linfocitos T infiltrantes, sugieren que una elevada proporción de estas células podrían corresponder con las denominadas células T *exhausted*, ya que estos rasgos serían comunes a los descritos previamente para este tipo de células en infecciones crónicas o en infiltrados tumorales (57,75). A pesar de ello, existen otras poblaciones minoritarias de linfocitos T que se caracterizan por la expresión de PD-1, como las células Treg, las células Tfh, o las recientemente descritas Tph (*T peripheral helper*) presentes en infiltrados de pacientes con AR o cáncer de mama (160,166,167). La presencia de células Tfh o

DISCUSIÓN

Treg en los infiltrados de pacientes con EAT ha sido descrita previamente por otros grupos (168,169), por ello sería recomendable profundizar en la caracterización de estos infiltrados linfoides mediante la realización de análisis adicionales empleando técnicas que permitan una mayor resolución.

Empleando IFI sobre secciones de tejido congelado se estudió la expresión de los ligandos de PD-1. En primer lugar, demostramos que PD-L1 se expresaba hasta en el 80% de los tiroides examinados de pacientes con algún tipo de EAT, mientras que tan solo se expresa en un 25% de los tejidos control empleados, en los que además el número de células positivas era siempre menor que en los tejidos autoinmunes. El hecho más destacable es que dicha expresión se daba preferentemente en células que por su morfología y disposición fueron identificadas como CFTs, mientras que solo en unos pocos tejidos pudo observarse su expresión en células infiltrantes. Por el contrario, la expresión de PD-L2 resultó negativa tanto en CFTs como en células infiltrantes en todos los tejidos estudiados independientemente de su diagnóstico inicial. Mediante tinciones múltiples se confirmó la expresión de PD-L1 en tirocitos por su coexpresión con TPO, aunque no se observó una relación clara entre las zonas de expresión de PD-L1 y la presencia de infiltrados contiguos CD45+ independientemente de la expresión o no en dichas células de PD-1. Al igual que lo observado para PD-L1, se sabe que una gran proporción de CFTs de pacientes con EAT expresan HLA de clase II (8,170). Sin embargo, en los tejidos estudiados mediante IFI triple las áreas de expresión para PD-L1 y HLA-DR solapaban solo parcialmente, mostrando diferencias no solo en el área afectada sino también en la intensidad de dicha expresión, que en ambos casos era considerablemente mayor para HLA-DR. Este hecho se basa en el análisis visual de las muestras, sin que la extensión e intensidad de ambas señales llegasen a cuantificarse experimentalmente.

Como se ha comentado anteriormente en la sección correspondiente de resultados, recientemente se han identificado las proteínas CMTM4 y CMTM6 como reguladores positivos de PD-L1 en distintas líneas tumorales (150,152). En una serie de muestras de tiroides estudiadas mediante IFI se ha observado que ambas moléculas presentan una elevada expresión en CFTs tanto en secciones obtenidas de pacientes con EAT y como de controles. Por lo tanto, es poco probable que las diferencias de expresión de PD-L1 entre ambos grupos de muestras se deban a cambios en la regulación postraduccionales dependientes de alguna de estas proteínas.

Se sabe que la expresión de PD-L1 en distintas líneas celulares y cultivos primarios es inducible por IFN- γ , y en menor medida por IFN de tipo I (120,171).

DISCUSIÓN

En tiroides de pacientes con EG pero no en controles se ha demostrado la presencia de una firma de IFN (11). Estos hechos sugieren que la expresión de PD-L1 en tiroides de pacientes con EAT puede ser consecuencia de la producción local de IFNs por los infiltrados presentes en estos tejidos. Mediante RT-PCR detectamos un aumento significativo de los niveles del mRNA codificante para PD-L1 en el tiroides de pacientes con EAT, estos presentaban además una correlación positiva con la expresión de PD-L1 observada previamente en estos tejidos mediante IFI. La capacidad del IFN- γ para inducir PD-L1 en CFTs se estudió mediante estimulación *in vitro* empleando las líneas celulares HT93, TPC-1 y HTH-83, y cultivos primarios de CFTs obtenidos de tiroides de pacientes con EG y BMN. Mediante citometría de flujo y RT-PCR se confirmó en todas las líneas celulares derivadas de tiroides la inducción de la expresión de PD-L1 durante las primeras 24 horas tras la estimulación con IFN- γ . La expresión de PD-L1 en estos cultivos fue paralela a la de HLA-DR, aunque en cultivos primarios esta presentó una inducción mayor en CFTs de pacientes con EG que en controles, tanto en el porcentaje de células positivas como en la MFI que esta población presentó. Por el contrario, mientras que en líneas celulares se observó una inducción de PD-L2 de magnitud similar a la de PD-L1, en cultivos primarios la estimulación con IFN- γ no produjo un aumento significativo de la expresión en superficie de PD-L2, o de los niveles de su mRNA correspondiente.

La expresión de PD-L1 y HLA-DR en CFTs tras la estimulación con IFN- γ está en consonancia con los resultados descritos en diversos trabajos anteriores. Sin embargo, ambas moléculas presentan *in vitro* una inducción de magnitud similar, lo cual no concuerda con lo observado *in vivo* mediante IFI en tiroides de pacientes con EAT, donde la expresión de HLA-DR es muy superior a la de PD-L1, tanto en extensión como en la intensidad de su señal. Es además interesante destacar que, los cultivos primarios de CFTs en ausencia de estimulación presentaron tras 24 horas la expresión espontánea de PD-L1. A pesar de que el IFN- γ es considerado el principal inductor de PD-L1, se han descrito varias vías de señalización y mecanismos de regulación que pueden afectar a su expresión (172,173). Estas observaciones podrían indicar la coexistencia de mecanismos adicionales de regulación de PD-L1 en las CFTs, como por ejemplo, mediante la represión activa de su expresión *in vivo*, o bien mediante su inducción *in vitro* causada por la pérdida parcial de los contactos célula-célula tras la digestión enzimática de los folículos, de forma similar a la inducción de PD-L1 asociada al proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*) descrita en algunos tumores (174).

Dos recientes trabajos de investigación publicados durante la realización de este proyecto respaldan los datos aquí expuestos hasta el momento en el contexto de

DISCUSIÓN

la diabetes tipo I (171,175). Ambos grupos demuestran la expresión de PD-L1 en las células β de los islotes pancreáticos en pacientes con diabetes tipo I pero no en controles, y como dicha expresión podía ser inducida en cultivo mediante la estimulación con IFNs de tipo I y tipo II. Sin embargo, en estos no se llegó a estudiar la expresión de PD-1 en el infiltrado presente en el órgano diana.

Los resultados discutidos hasta el momento demuestran la expresión de PD-1 y PD-L1 en el tiroides de pacientes con EAT. Sin embargo, estos no comportan en sí mismos una evidencia de que dicha vía participe activamente en el control de los linfocitos autoreactivos. Con el objetivo de demostrar el efecto de la interacción entre células epiteliales de tiroides y linfocitos sobre la activación de estos últimos, se llevaron a cabo los experimentos de cocultivo descritos en este trabajo, en el que se pretende emular el tipo de interacciones que pueden ocurrir en una glándula tiroidea afecta de un proceso autoinmune. Una vez establecido el sistema, este pretende servir como herramienta para estudiar el papel de distintas parejas de correceptores y ligandos en la modulación de la interacción entre linfocitos infiltrantes y células epiteliales tiroideas. Cabe señalar que aunque los cocultivos son de uso habitual en inmunología celular tienen limitaciones importantes.

Uno de los usos históricamente más importantes fue para valorar el grado de compatibilidad entre donante y receptor en el trasplante. Aunque este método fue muy útil para comprender mejor la especial característica de la respuesta alogénica, se tuvo que abandonar por la complejidad técnica, pero sobre todo por su gran variabilidad.

Los cocultivos, en este caso autólogos, entre las células infiltrantes del tumor y la células tumorales se ha utilizado ampliamente en el campo de la investigación oncológica, donde suele emplearse para evaluar la eficacia o mecanismo de acción de distintos fármacos, o la propia respuesta inmune en distintas condiciones. Es común en estos casos el cultivo previo de los linfocitos con altas dosis de IL-2 para conseguir una expansión importante previa de la población de LITs. Sin embargo, la expansión de linfocitos mediante este procedimiento da lugar a un cambio en el fenotipo y el estado de activación de estos, además de poder introducir sesgos producidos por una respuesta desigual a esta citocina por las distintas subpoblaciones (176). Por esta razón, para tratar de emular en cultivo lo más fielmente posible las interacciones entre linfocitos y células epiteliales tiroideas que puedan ocurrir *in vivo*, se decidió no realizar una expansión previa de las células efectoras.

DISCUSIÓN

El abordaje seguido en este trabajo ha quedado limitado por la reducción del acceso a tejido tiroideo autoinmune por la pandemia producida por el SARS-CoV-2 durante el último año, que ha dificultado la realización de intervenciones quirúrgicas programadas, incluidas las resecciones de tiroides de pacientes con enfermedad de Graves. La cantidad de tejido disponible y el grado variable de infiltración que pueden presentar los tiroides de pacientes con enfermedad de Graves dificultan la obtención del número de linfocitos infiltrantes (LITs) necesarios para la realización de los experimentos de cocultivos descritos en este trabajo. Por ello este trabajo se llevó a cabo empleando células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Graves y de donantes.

Aparte de las diferencias generales entre los modelos *in vitro* e *in vivo*, la diferente composición de las poblaciones separadas de sangre periférica –donde hay una alta proporción de células naïve y sólo una proporción mínima es concebible que reconozcan específicamente los tirocitos, incluso entre las células memoria-, y los linfocitos intratiroidales –donde la mayoría de las células son memoria y está expandida la proporción de linfocitos específicos de antígenos tiroideos- limitan la utilidad de este modelo. Sin embargo, se han obtenido resultados de gran interés.

Por un lado la activación de los linfocitos T mediante el uso simultáneo de anti-CD3 y anti-CD28 nos permite medir el efecto de la presencia de tirocitos sobre linfocitos recién activados. Como se puede ver en los resultados de cocultivos de células mononucleares periféricas, la mera presencia de tirocitos produce una fuerte reducción en la proporción y proliferación de linfocitos CD4+ y CD8 (**Figura 30**). Su número no sólo no aumenta sino que se reduce, lo que supone que la activación de los linfocitos T en presencia tirocitos induce muerte celular. Sin embargo, los linfocitos que persisten si experimentan cambios fenotípicos de activación como la adquisición de la expresión de PD-1. La medición de citocinas en el sobrenadante de los cultivos complementará estas observaciones. Lo que si se deduce de estos experimentos es que la citocina IFN-gamma no parece ser la principal responsable de estos cambios. Este efecto no es particular de las glándulas autoinmunes porque se produce tanto en los cocultivos generados a partir de donantes de órganos como de tejidos obtenidos de pacientes con enfermedad de Graves.

Es necesario comentar que este efecto negativo sobre las CMSPs no parece depender, al menos no exclusivamente del eje PD1-PDL1 porque la adición de cantidades crecientes de anticuerpos anti-PD1 bloqueantes de uso clínico no redujo tampoco el efecto. En experimentos que no se han incluido a espera de mostrar su reproducibilidad, el uso de *transwells* en un sistema de cocultivo entre

DISCUSIÓN

células mononucleares de sangre periférica y células epiteliales tiroideas de glándulas de pacientes con bocio multinodular sugiere que este efecto negativo es dependiente de contacto.

Los co-cultivos con los tirocitos transformados de la línea TPC-1 son algo más complejos de interpretar porque, tal como se ha comentado en resultados, tienen un rápido crecimiento intrínseco y es difícil mantener la proporción linfocitos – tirocitos, pero se observa el mismo efecto sobre la proporción de linfocitos CD4 y CD8, aunque en este caso no se produzca una disminución clara del número total de células CD45+ por efecto del cocultivo.

El efecto del co-cultivo sobre los tirocitos es menos sorprendente. En el caso de los tirocitos no transformados se produjo una inducción de la expresión de HLA clase II y de PD-L1 que se demuestra en parte dependiente de IFN-gamma. Esta inducción ocurre en los cultivos activados mediante anti-CD3/ CD28 incluso en ausencia de CMSPs, lo cual puede explicarse por la presencia en estas muestras de células residuales CD45+ no eliminadas junto al sobrenadante durante la preparación del cultivo. Los anticuerpos bloqueantes anti-IFN- γ producen una disminución de la MFI de PD-L1 y HLA-DR, pero tienen un efecto mínimo sobre el número de CFTs positivas, por lo que no inhiben por completo su inducción. Esto podría deberse a la utilización de una cantidad insuficiente de anticuerpos anti-IFN- γ para bloquear completamente su producción en estos cultivos, o al efecto de otras citocinas como TNF α , la cual puede tener un efecto sinérgico con el IFN- γ en la inducción de PD-L1, y cuya producción en cocultivos autólogos entre CMSPs y CFTs ha sido demostrada anteriormente (160,177,178).

En el caso de los cultivos empleando la línea celular TPC-1, estas células responden de forma semejante a los CFTs en los cultivos autólogos. Tanto PD-L1 como HLA-DR se inducen en estas células cuando son cultivadas en presencia de CMSPs estimulados con Anti-CD3/CD28, disminuyéndose este aumento si son tratados adicionalmente con anticuerpos bloqueantes anti-IFN- γ .

El cultivo de CMSPs con células TPC-1 produce un descenso significativo de su número, fenómeno que no se observó en los co-cultivos autólogos con CFTs. A pesar de esto el diseño experimental no nos permite confirmar si este fenómeno se debe a una inhibición de la proliferación de las células TPC-1, o a un efecto citotóxico directo producido por las CMSPs estimulados por la naturaleza alogénica y transformada de estos.

Los resultados obtenidos mediante los experimentos de cocultivos indican que las CFTs pueden ejercer una acción inmunomoduladora sobre los linfocitos T autólogos al inhibir su proliferación, a pesar de lo cual, dicho efecto no parece estar mediado por la expresión de PD-L1 en CFTs. A lo largo de los años distintos grupos han demostrado la expresión en CFTs de pacientes con EAT de moléculas

DISCUSIÓN

inicialmente asociadas a células de origen hematopoyético, como HLA de clase II, CD40, o moléculas de adhesión como ICAM-1 o NCAM (8,179–181). Por tanto, es lógico suponer que las interacciones entre estas células epiteliales y los linfocitos autorreactivos sean complejas, y que dependan de distintas moléculas, algunas de ellas de expresión constitutiva, y otras inducibles por un ambiente proinflamatorio, como HLA de clase II, CD40, o PD-L1.

El estudio transcriptómico entre tejidos autoinmunes y controles debería de permitir identificar otras vías de señalización que pudiesen estar implicadas en la regulación de las respuestas autorreactivas por parte de las CFTs. El aumento de la prevalencia de la tiroiditis focal y la tiroiditis subclínica en la población general con la edad, y la disponibilidad de imágenes histológicas de la mayor parte de las muestras nos han permitido realizar este análisis empleando los datos de RNA-seq de tiroides obtenidos como parte del proyecto GTEx (144).

La clasificación de las muestras en base a las imágenes histológicas ha mostrado una mayor prevalencia de procesos de tiroiditis focal o extendida en mujeres, de forma similar a lo descrito para las EAT (1–3). A pesar de que nuestro análisis no muestra un incremento de los casos de tiroiditis con la edad en las muestras analizadas, un estudio previo empleando el mismo grupo de muestras describió una relación entre distintos genes de procesos asociados al sistema inmune y la edad de los donantes. (182). Dicho estudio basó su clasificación en los datos anatomopatológicos cedidos por el proyecto GTEx, los cuales fueron valorados por varios expertos. En nuestro caso, las imágenes de las muestras incluidas fueron revisadas por un único experto en patología del tiroides del equipo de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d’Hebron, lo permitió completar los datos referentes a cada tejido y evitó la introducción sesgos interobservador. Esto podría explicar en parte la diferente asociación encontrada entre la edad y la presencia de infiltrados linfoides entre ambos estudios.

De acuerdo con lo esperable, el análisis comparativo entre los tres grupos de muestras previamente definidos indica que la mayor parte de los genes cuya expresión más aumenta en los tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI), son aquellos relacionados específicamente con el sistema inmune. Además, la magnitud de estos cambios incrementa en los tejidos con infiltraciones extensas (ELI). Por el contrario, la mayoría de los genes con expresión disminuida al comparar ambos grupos de tejidos infiltrados con el grupo control, pertenecen a vías de señalización o a procesos ubicuos, o sin relación específica con el metabolismo del tiroides o con el sistema inmune. Estos resultados se confirmaron mediante el análisis de significación biológica mediante Reactome y

DISCUSIÓN

Gene Ontology, los cuales muestran un aumento de los procesos ligados a la respuesta inmune al comparar los grupos SFI y ELI con el grupo control.

El objetivo principal de este análisis era la identificación de posibles vías de coestimulación y coinhibición, que al igual que el de señalización formado por PD-1/PD-L1, pudiesen encontrarse diferencialmente expresadas en los tejidos infiltrados y, por tanto, pudiesen tener un papel importante en el establecimiento o el control de estas respuestas autorreactivas. A pesar de que ningún gen codificante para receptores o ligandos inmunomoduladores se encontró entre los más diferencialmente expresados entre las distintas comparativas, se realizó una búsqueda manual entre los resultados obtenidos de las principales moléculas implicadas en la regulación de la respuesta inmune (65). Al comparar los tejidos con pequeños infiltrados linfoides con los controles se observó el aumento de expresión de varias moléculas asociadas a la regulación de la respuesta de los linfocitos T y B, como TIGIT o BTLA. De forma similar a lo observado en los resultados anteriores, la expresión de estos genes aumentaba considerablemente en los tejidos con infiltraciones linfocitarias extensas, además de comprobarse el incremento en la expresión de otras moléculas reguladoras. La mayor parte de los genes identificados de esta manera codifican para receptores expresados principalmente en distintas poblaciones de linfocitos. Es probable, por tanto, que el aumento de su expresión en los grupos SFI y ELI sea proporcional al grado de infiltración de estos, y no un indicador de cambios en el tipo de respuesta inmune.

El estudio de los cambios transcripcionales asociados a diversas enfermedades autoinmunes en el órgano diana ha sido empleado por múltiples grupos con el objetivo de identificar las vías de señalización o los procesos implicados en distintas fases de estas patologías (183,184). Sin embargo, el uso directo del tejido diana como fuente de material genético genera limitaciones en el análisis de los datos conforme aumenta la heterogeneidad de las células contenidas en la muestra (185). En este trabajo hemos demostrado la expresión de PD-L1 por parte de las CFTs en tejido de pacientes con EAT, sin embargo, los resultados transcriptómicos obtenidos del proyecto GTEx muestran únicamente un ligero aumento de su expresión en los tiroides con infiltrados extensos con respecto a los controles. Esto podría explicarse por la progresiva pérdida de parénquima tiroideo que ocurre paralelamente a la infiltración de la glándula en las EAT, y que podría enmascarar los cambios sufridos por las CFTs en respuesta al microambiente inflamatorio.

Basándonos en los resultados obtenidos mediante el análisis de los datos transcriptómicos, podemos identificar varios ejes de coestimulación y coinhibición de la respuesta inmune que podrían estar implicados en el

mantenimiento o atenuación de los procesos autoinmunes en el tiroides durante distintas fases de la enfermedad. Sin embargo, el estudio del papel específico de los CFTs en el control de las respuestas autorreactivas requerirá el uso de técnicas alternativas que permitan el análisis específico de las células de interés.

Adicionalmente, el uso conjunto de la plataforma Cibersort (149) y el análisis de los datos transcriptómicos del proyecto GTEx nos han permitido describir la composición del infiltrado presente en estas glándulas. Los resultados obtenidos indican que las principales células presentes en los tejidos con tiroiditis focal y extendida son macrófagos M2 y células CD4 de memoria en reposo. Se observó además un aumento específico de genes asociados a una respuesta T CD4 de tipo Th1 en los tejidos con pequeños infiltrados linfoides, cambios que se intensifican en las muestras con infiltrados más extensos. Estos resultados apoyarían el trabajo previo realizado por nuestro grupo, en el que mediante el uso de arrays de RNA se identificó una firma de interferón en los tiroides de un pequeño número de pacientes con EG. Adicionalmente, en dicho estudio se observó el aumento de diversos genes ligados a macrófagos M2, cuya presencia fue confirmada en estos tejidos mediante inmunofluorescencia indirecta (11).

La implicación de distintas vías de coestimulación y coinhibición en las enfermedades autoinmunes ha sido ampliamente descrita en modelos animales, y en menor medida en humanos (186). La mayor parte de dichos estudios se han centrado en la expresión de moléculas inmunomoduladoras en las propias células del sistema inmune, a pesar de lo cual, algunos trabajos en modelos animales sugieren un posible papel de diversos órganos diana en el control de las respuestas autorreactivas (187).

En base a lo expuesto en este trabajo puede deducirse que, el eje formado por PD-1/PD-L1 podría tener un papel activo en el control de las respuestas autoinmunes en humanos. La expresión de PD-L1 en células foliculares tiroideas en respuesta a un microambiente inflamatorio podría constituir un mecanismo de tolerancia periférica. Este proceso podría tener una especial importancia en el tiroides que, unido a la prevalencia de tiroiditis focal en la población general, podría explicar la alta incidencia de cuadros de autoinmunidad tiroidea asociados a los tratamientos bloqueantes anti-PD-1 y anti-PD-L1 empleados como terapia en diversos tipos de tumores (135–137).

Los resultados descritos contribuyen a explicar, al menos parcialmente, la lenta progresión de las enfermedades autoinmunes del tiroides. Hemos demostrado que la expresión de PD-L1 se produce de forma clara en el tiroides de pacientes con EAT, y que esta puede ser inducida *in vitro* por un estímulo proinflamatorio

DISCUSIÓN

como el IFN- γ , cuya acción en el órgano diana y las CMSPs ha sido descrita por diversos estudios (11,188). Aunque hemos demostrado la capacidad de las células foliculares tiroideas de inhibir la proliferación de linfocitos T previamente estimulados *in vitro*, no hemos podido asociar dicha acción a la expresión en estas de PD-L1. Lo cual estaría en consonancia con el papel de PD-1 en el mantenimiento del estado de exhaustion en células T, pero no en su establecimiento (189). Por ello se necesitarán experimentos adicionales para investigar su efecto en otros aspectos asociados a la activación de los linfocitos, la polarización de su respuesta, o su implicación en fases posteriores de la respuesta. La expresión de PD-L1, y su posible interacción con los linfocitos infiltrantes, instan a reinterpretar la expresión ectópica de HLA de clase II en las CFTs y su efecto sobre los linfocitos autorreactivos (8,190). Adicionalmente no se puede descartar un efecto directo sobre los propios CFTs producido por la señalización a través de PD-L1, como ya se ha demostrado en líneas tumorales, donde la unión de PD-1 confiere a las células tumorales cierto grado de resistencia a la lisis mediada por células citotóxicas y a la apoptosis mediada por fármacos (191).

El análisis de los datos transcriptómicos muestran la expresión de múltiples receptores coinhibidores en el tiroides de donantes que presentan infiltrados linfoides, lo cual apoyaría la hipótesis de que una gran proporción de los linfocitos infiltrantes en estas glándulas se encuentran en estado de *exhaustion* (61). Estos resultados hacen necesario investigar la posible expresión de otros ligandos inmunomoduladores por parte de las CFTs que pudiesen contribuir al control de las respuestas autoinmunes.

El presente trabajo, y el artículo fruto de los resultados obtenidos (192), constituyen la primera demostración directa de la expresión de PD-L1 en las células foliculares tiroideas de pacientes con EAT. Estos resultados son similares a los descritos recientemente en células β pancreáticas de pacientes con diabetes de tipo I (171,175), y sientan las bases para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento de las enfermedades autoinmunes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La expresión de PD-1 se encuentra significativamente aumentada en los linfocitos T infiltrantes de tiroides con respecto a los circulantes en pacientes con enfermedad de Graves.
2. PD-L1, pero no PD-L2, se expresa tirocitos del 86% de las glándulas de pacientes con enfermedades autoinmunes del tiroides (EAT) evaluadas. Por el contrario, solo se detectaron tirocitos PD-L1+ en el 25% de las muestras de pacientes con bocio multinodular (BMN), estas presentaron generalmente un menor número de células positivas que las glándulas autoinmunes.
3. No se ha podido establecer una relación directa entre la presencia o extensión de los infiltrados linfoides y la expresión de PD-L1 en tirocitos adyacentes a estos. Sin embargo, si se ha encontrado una correlación entre la expresión relativa de IFNG y la expresión de PD-L1 en tirocitos en las glándulas estudiadas, siendo esta relación independiente del diagnóstico de los pacientes.
4. Se ha demostrado que la estimulación mediante IFN- γ induce la expresión de PD-L1, pero no PD-L2, en tirocitos de pacientes con enfermedad de Graves o con bocio multinodular. Por el contrario, en las líneas celulares de tiroides evaluadas, la estimulación mediante IFN- γ inducía la expresión tanto de PD-L1 como de PD-L2.
5. Se ha conseguido diseñar un protocolo de cocultivo adecuado para evaluar el papel de distintas moléculas en la interacción entre tirocitos y células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) o linfocitos infiltrantes del tiroides (LITs). Mediante su uso hemos demostrado la capacidad de los tirocitos autólogos, pero no de células TPC-1, para inhibir la proliferación de CMSPs previamente activados mediante anti-CD3/CD28, aunque no hemos encontrado evidencias de que este efecto se deba a la señalización del eje formado por PD-1 y PD-L1.
6. El análisis de los datos de expresión génica cedidos por el proyecto GTEx ha permitido evaluar las diferencias presentes en tiroides con distintos grados de infiltración linfocitaria. Este análisis ha puesto de manifiesto el aumento de expresión de diversos correceptores inhibidores en el grupo de muestras con infiltrados extensos (ELI), los cuales podrían tener un papel relevante en la cronificación de la respuesta autoinmune.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Madariaga AG, Santos Palacios S, Guillén-Grima F, Galofré JC. The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in Europe: A meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(3):923–31.
2. McLeod DSA, Cooper DS. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine*. 2012;42(2):252–65.
3. Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K. The epidemiology of Graves' disease: Evidence of a genetic and an environmental contribution. *J Autoimmun* [Internet]. 2010;34(3):J307–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2009.11.019>
4. Smith TJ, Hegedüs L. Graves' Disease. Longo DL, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Oct 20;375(16):1552–65. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMr1510030>
5. Kemp EH, Metcalfe RA, Smith KA, Woodroffe MN, Watson PF, Weetman AP. Detection and localization of chemokine gene expression in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59(2):207–13.
6. Grubeck-Loebenstein B, Buchan G, Chantry D, Kassal H, Londei M, Pirich K, et al. Analysis of intrathyroidal cytokine production in thyroid autoimmune disease: thyroid follicular cells produce interleukin-1 alpha and interleukin-6. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1989;77(3):324–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2680182>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1542067>
7. Zheng RQH, Abney E, Chu CQ, Field M, Grubeck-Loebenstein B, Maini RN, et al. Detection of interleukin-6 and interleukin-1 production in human thyroid epithelial cells by non-radioactive in situ hybridization and immunohistochemical methods. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2008 Jun 28;83(2):314–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.1991.tb05634.x>
8. Hanafusa T, Chiovato L, Doniach D, Pujol-Borrell R, Russell RCG, Bottazzo GF. Aberrant Expression of Hla-Dr Antigen on Thyrocytes in Graves' Disease: Relevance for Autoimmunity. *Lancet*. 1983;322(8359):1111–5.
9. Todd I, Pujol-Borrell R, Hammond L, Bottazzo G, Feldmann M. Interferon- γ induces HLA-DR expression by thyroid epithelium. *Clin Exp Immunol*. 1985;61:265–73.
10. Smith TJ, Sciaky D, Phipps RP, Jennings TA. CD40 expression in human thyroid tissue: Evidence for involvement of multiple cell types in autoimmune and neoplastic diseases. *Thyroid*. 1999;9(8):749–735.
11. Ruiz-Riol M, Armengol Barnils MDP, Colobran Oriol R, Sánchez Pla A, Borràs Serres FE, Lucas-Martin A, et al. Analysis of the cumulative changes in Graves' disease thyroid glands points to IFN signature, plasmacytoid DCs and alternatively activated macrophages as chronicity determining factors. *J Autoimmun* [Internet]. 2011;36(3–4):189–200. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2011.01.002>
12. Acharya SH, Avenell A, Philip S, Burr J, Bevan JS, Abraham P. Radioiodine therapy (RAI) for Graves' disease (GD) and the effect on

- ophthalmopathy: A systematic review. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69(6):943–50.
13. Kurashima C, Hirokawa K. Focal lymphocytic infiltration in thyroids of elderly people. *Histopathological and immunohistochemical studies. Surv Synth Pathol Res* [Internet]. 1985;4(5–6):457–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3879816>
14. Williams ED, Doniach I. The post-mortem incidence of focal thyroiditis. *J Pathol Bacteriol* [Internet]. 1962 Jan;83:255–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14007149>
15. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW. Autoreactive T Cells in Healthy Individuals. *J Immunol* [Internet]. 2004;172(10):5967–72. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.172.10.5967>
16. Pelanda R, Torres RM. Central B-Cell tolerance: Where selection begins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(4):1–15.
17. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* (80-). 2003;301(5638):1374–7.
18. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2014;14(6):377–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3667>
19. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* [Internet]. 2010;11(1):7–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1818>
20. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* [Internet]. 2010;11(1):21–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1817>
21. ElTanbouly MA, Noelle RJ. Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020 Oct 19; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-00454-2>
22. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* [Internet]. 2000 Oct 5;343(14):1020–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018170>
23. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(1):258–63.
24. Baeyens A, Fang V, Chen C, Schwab SR. Exit Strategies: S1P Signaling and T Cell Migration. *Trends Immunol*. 2015;36(12):778–87.
25. Niederkorn JY. See no evil, hear no evil, do no evil: The lessons of immune privilege. *Nat Immunol*. 2006;7(4):354–9.
26. Zhang S, Zhang X, Wang K, Xu X, Li M, Zhang J, et al. Newly Generated CD4 + T Cells Acquire Metabolic Quiescence after Thymic Egress . *J Immunol*. 2018;200(3):1064–77.

BIBLIOGRAFÍA

27. Tu E, Chia CPZ, Chen W, Zhang D, Park SA, Jin W, et al. T Cell Receptor-Regulated TGF- β Type I Receptor Expression Determines T Cell Quiescence and Activation. *Immunity* [Internet]. 2018;48(4):745-759.e6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29669252>
28. Tzachanis D, Freeman GJ, Hirano N, Van Puijenbroek AAFL, Delfs MW, Berezovskaya A, et al. Tob is a negative regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells. *Nat Immunol*. 2001;2(12):1174–82.
29. Wu J, Lingrel JB. KLF2 inhibits Jurkat T leukemia cell growth via upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1. *Oncogene*. 2004;23(49):8088–96.
30. Carlson CM, Endrizzi BT, Wu J, Ding X, Weinreich MA, Walsh ER, et al. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature*. 2006;442(7100):299–302.
31. Bista P, Mele DA, Baez DV, Huber BT. Lymphocyte quiescence factor Dpp2 is transcriptionally activated by KLF2 and TOB1. *Mol Immunol* [Internet]. 2008 Aug;45(13):3618–23. Available from: <file:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan PhD/Dev of drug R cell line/nihms579608.pdf>
32. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 2001;194(6):769–79.
33. Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, Steinman RM. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med*. 2002;196(8):1091–7.
34. DeSilva DR, Feeser WS, Tancula EJ, Scherle PA. Anergic T cells are defective in both jun NH2-terminal kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Exp Med* [Internet]. 1996 May 1;183(5):2017–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642312>
35. Rocha B, Tanchot C, Von Boehmer H. Clonal anergy blocks in vivo growth of mature T cells and can be reversed in the absence of antigen. *J Exp Med*. 1993;177(5):1517–21.
36. Essery G, Feldmann M, Lamb JR. Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes. *Immunol*. 1988;64(3):413–7.
37. Eltanbouly MA, Zhao Y, Nowak E, Li J, Schaafsma E, Mercier I Le, et al. VISTA is a checkpoint regulator for naïve T cell quiescence and peripheral tolerance. 2020;0524.
38. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - A brief history and perspective. *Eur J Immunol*. 2007;37(SUPPL. 1).
39. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* [Internet]. 1995 Aug 1;155(3):1151–64. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636184>
40. Apostolou I, Von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*. 2004;199(10):1401–8.
 41. Thorstenson KM, Khoruts A. Generation of Anergic and Potentially Immunoregulatory CD25 + CD4 T Cells In Vivo After Induction of Peripheral Tolerance with Intravenous or Oral Antigen . *J Immunol*. 2001;167(1):188–95.
 42. Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood*. 2003;101(12):4862–9.
 43. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1219–27.
 44. Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. Naturally anergic and suppressive CD25+CD4+ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol*. 2000;12(8):1145–55.
 45. Hori S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* (80-) [Internet]. 2003 Feb 14;299(5609):1057–61. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1079490>
 46. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2003 Apr 3;4(4):330–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni904>
 47. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*. 2001;27(1):18–20.
 48. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27(1):20–1.
 49. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*. 2001;2(4):301–6.
 50. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2008 Jul;8(7):523–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566595>
 51. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1353–62.
 52. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause

- autologous target cell death. *Immunity*. 2004;21(4):589–601.
53. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(12):1206–12.
54. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006;118(2):240–9.
55. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J Immunol*. 2008;180(9):5916–26.
56. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(8):486–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3862>
57. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* [Internet]. 2011;12(6):492–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2035>
58. Zhou X, Ramachandran S, Mann M, Popkin DL. Role of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) in understanding viral immunology: Past, present and future. *Viruses*. 2012;4(11):2650–69.
59. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJD, Suresh M, Altman JD, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*. 1998;188(12):2205–13.
60. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Plückthun A, Elliott T, et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med* [Internet]. 1998 May 4;187(9):1383–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9565631><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2212278><https://rupress.org/jem/article/187/9/1383/7614/Induction-and-Exhaustion-of-Lymphocytic>
61. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. 2009;10(1):29–37.
62. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439(7077):682–7.
63. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006;443(7109):350–4.
64. Im SJ, Hashimoto M, Gerner MY, Lee J, Kissick HT, Burger MC, et al. Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* [Internet]. 2016;537(7620):417–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature19330>
65. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-

- inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):227–42.
66. Fuertes Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, Speiser DE. Inhibitory receptors beyond T cell exhaustion. *Front Immunol*. 2015;6(JUN):1–14.
67. Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, McGavern DB, Oldstone MBA. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* [Internet]. 2006 Nov 15;12(11):1301–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
68. Brooks DG, Ha SJ, Elsaesser H, Sharpe AH, Freeman GJ, Oldstone MBA. IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(51):20428–33.
69. Roberto Tinoco, Victor Alcalde, Yating Yang, Karsten Sauer and EIZ. TGF- β Signaling in T cells is Essential for CD8 T Cell Suppression and Viral Persistence In Vivo. *Immunity*. 2009;17(1):145–57.
70. Brooks DG, Teyton L, Oldstone MBA, McGavern DB. Intrinsic Functional Dysregulation of CD4 T Cells Occurs Rapidly following Persistent Viral Infection. *J Virol*. 2005;79(16):10514–27.
71. Oxenius A, Zinkernagel RM, Hengartner H. Comparison of activation versus induction of unresponsiveness of virus- specific CD4+ and CD8+ T cells upon acute versus persistent viral infection. *Immunity*. 1998;9(4):449–57.
72. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2019;37:457–95.
73. Boon T, Coulie PG, Van Den Eynde BJ, Van Der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:175–208.
74. Zhang Z, Liu S, Zhang B, Qiao L, Zhang Y, Zhang Y. T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(February).
75. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2018;33(4):547–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.012>
76. Frebel H, Nindl V, Schuepbach RA, Braunschweiler T, Richter K, Vogel J, et al. Programmed death 1 protects from fatal circulatory failure during systemic virus infection of mice. *J Exp Med*. 2012;209(13):2485–99.
77. Hayter SM, Cook MC. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2012;11(10):754–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2012.02.001>
78. Rosenblum MD, Remedios KA, Abbas AK. Mechanisms of human autoimmunity. *J Clin Invest*. 2015;125(6):2228–33.
79. Cheng MH, Anderson MS. Monogenic Autoimmunity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2012;30(1):393–427. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-020711-074953%5Cnpapers3://publication/doi/10.1146/annurev->

- immunol-020711-074953
80. Stegert M, Bock M, Trendelenburg M. Clinical presentation of human C1q deficiency: How much of a lupus? *Mol Immunol* [Internet]. 2015;67(1):3–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.007>
81. Walport MJ, Davies KA, Botto M. C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology* [Internet]. 1998;199(2):265–85. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0171-2985\(98\)80032-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0171-2985(98)80032-6)
82. Ahonen P, Myllärniemi S, Sipilä I, Perheentupa J. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N Engl J Med* [Internet]. 1990 Jun 28;322(26):1829–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2348835>
83. Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, et al. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* [Internet]. 1997 Dec;17(4):393–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398839>
84. Moraes-Vasconcelos D, Costa-Carvalho BT, Torgerson TR, Ochs HD. Primary immune deficiency disorders presenting as autoimmune diseases: IPEX and APECED. *J Clin Immunol*. 2008;28(SUPPL. 1):11–9.
85. Goodnow CC. Multistep Pathogenesis of Autoimmune Disease. *Cell*. 2007;130(1):25–35.
86. Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol* [Internet]. 2017 Jun 20;18(7):716–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28632714>
87. Bogdanos DP, Smyk DS, Rigopoulou EI, Mytilinaiou MG, Heneghan MA, Selmi C, et al. Twin studies in autoimmune disease: Genetics, gender and environment. *J Autoimmun* [Internet]. 2012;38(2–3):J156–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2011.11.003>
88. Gutierrez-Arcelus M, Rich SS, Raychaudhuri S. Autoimmune diseases - connecting risk alleles with molecular traits of the immune system. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2016 Mar;17(3):160–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907721>
89. Cárdenas-Roldán J, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. How do autoimmune diseases cluster in families? A systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2013;11(1).
90. Cotsapas C, Voight BF, Rossin E, Lage K, Neale BM, Wallace C, et al. Pervasive sharing of genetic effects in autoimmune disease. *PLoS Genet*. 2011;7(8).
91. Sfriso P, Ghirardello A, Botsios C, Tonon M, Zen M, Bassi N, et al. Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *J Leukoc Biol*. 2010;87(3):385–95.
92. Ercolini AM, Miller SD. The role of infections in autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*. 2009;155(1):1–15.
93. De Luca F, Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol*. 2019;195(1):74–85.

BIBLIOGRAFÍA

94. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* [Internet]. 1989 Nov 18;299(6710):1259–60. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.299.6710.1259>
95. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: A comprehensive update. *J Intern Med*. 2015;278(4):369–95.
96. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol* [Internet]. 2014;35(3):347–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.04.004>
97. Tedeschi SK, Bermas B, Costenbader KH. Sexual disparities in the incidence and course of SLE and RA. *Clin Immunol* [Internet]. 2013;149(2):211–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2013.03.003>
98. Chitnis T. Role of puberty in multiple sclerosis risk and course. *Clin Immunol* [Internet]. 2013;149(2):192–200. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2013.03.014>
99. Tomer Y, Huber A. The etiology of autoimmune thyroid disease: A story of genes and environment. *J Autoimmun* [Internet]. 2009;32(3–4):231–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2009.02.007>
100. Vestergaard P. Smoking and thyroid disorders - A meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2002;146(2):153–61.
101. Boscarino JA. Posttraumatic stress disorder and physical illness: Results from clinical and epidemiologic studies. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1032:141–53.
102. Li HS, Jiang HY, Carayanniotis G. Modifying effects of iodine on the immunogenicity of thyroglobulin peptides. *J Autoimmun*. 2007;28(4):171–6.
103. Oppenheim Y, Ban Y, Tomer Y. Interferon induced Autoimmune Thyroid Disease (AITD): A model for human autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2004;3(5):388–93.
104. Tomer Y, Davies TF. Infection, Thyroid Disease, and Autoimmunity. *Endocr Rev* [Internet]. 1993 Feb;14(1):107–20. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv-14-1-107>
105. Cox SP, Phillips DIW, Osmond C. Does infection initiate graves disease?: A population based 10 year study. *Autoimmunity*. 1989;4(1–2):43–9.
106. Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, Hegedüs L. Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2001 Feb;86(2):930–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158069>
107. Zamani M, Spaepen M, Bex M, Bouillon R, Cassiman JJ. Primary role of the HLA class II DRB1*0301 allele in Graves disease. *Am J Med Genet*. 2000;95(5):432–7.
108. Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1995 Jan;80(1):41–5.

- Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.80.1.7829637>
109. Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, Owen CJ, Herington S, Donaldson PT, et al. The codon 620 tryptophan allele of the Lymphoid Tyrosine Phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5862–5.
 110. Kuryłowicz A, Kula D, Ploski R, Skorka A, Jurecka-Lubieniecka B, Zebracka J, et al. Association of CD40 gene polymorphism (C-1T) with susceptibility and phenotype of Graves' disease. *Thyroid.* 2005;15(10):1119–24.
 111. Pujol-Borrell R, Álvarez-Sierra D, Jaraquemada D, Marín-Sánchez A, Colobran R. Central Tolerance Mechanisms to TSHR in Graves' Disease: Contributions to Understand the Genetic Association. *Horm Metab Res* [Internet]. 2018 Dec;50(12):863–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30396220>
 112. Marín-Sánchez A, Álvarez-Sierra D, González O, Lucas-Martin A, Sellés-Sánchez A, Rudilla F, et al. Regulation of TSHR Expression in the Thyroid and Thymus May Contribute to TSHR Tolerance Failure in Graves' Disease Patients via Two Distinct Mechanisms. *Front Immunol* [Internet]. 2019;10(July):1695. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31379878>
 113. Brand OJ, Barrett JC, Simmonds MJ, Newby PR, McCabe CJ, Bruce CK, et al. Association of the thyroid stimulating hormone receptor gene (TSHR) with Graves' disease. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2009;18(9):1704–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19244275>
 114. Hayashi M, Kouki T, Takasu N, Sunagawa S, Komiya I. Association of an A/C single nucleotide polymorphism in programmed cell death-ligand 1 gene with Graves' disease in Japanese patients. *Eur J Endocrinol.* 2008;158(6):817–22.
 115. Newby PR, Roberts-Davies EL, Brand OJ, Heward JM, Franklyn JA, Gough SCL, et al. Tag SNP screening of the PDCD1 gene for association with Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2007 Jul [cited 2019 Feb 22];67(1):125–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17490403>
 116. Mitchell AL, Cordell HJ, Soemedi R, Owen K, Skinningsrud B, Wolff AB, et al. Programmed death ligand 1 (PD-L1) gene variants contribute to autoimmune Addison's disease and graves' disease susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):5139–45.
 117. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992;11(11):3887–95.
 118. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* 1996;8(5):765–72.
 119. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-

- like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141–51.
120. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* [Internet]. 2000;192(7):1027–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11015443>
121. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* [Internet]. 2001;2(3):261–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11224527> <http://www.nature.com/doi/10.1038/85330>
122. Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, Ibañez-Vea M, Breckpot K, Kochan G, et al. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(31):51936–45. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/17232>
123. Chemnitz JM, Parry R V., Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J Immunol*. 2004;173(2):945–54.
124. Inozume T, Hanada K, Wang QJ, Ahmadzadeh M, Wunderlich JR, Rosenberg SA, et al. Selection of CD8+PD-1+ Lymphocytes in Fresh Human Melanomas Enriches for Tumor-reactive T Cells. *J Immunother* [Internet]. 2010 Nov;33(9):956–64. Available from: <http://journals.lww.com/00002371-201011000-00004>
125. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009;114(8):1537–44.
126. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12293–7.
127. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793–800.
128. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2012 Apr;24(2):207–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791511001841>
129. Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden M V., et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(8):4712–7.
130. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies

- in cancer: Mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol*. 2018;8(MAR):1–14.
131. Blank C, Kuball J, Voelkl S, Wiendl H, Becker B, Walter B, et al. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer*. 2006;119(2):317–27.
 132. Wong RM, Scotland RR, Lau RL, Wang C, Korman AJ, Kast WM, et al. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *Int Immunol*. 2007;19(10):1223–34.
 133. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(12):717–34.
 134. Sun L, Zhang L, Yu J, Zhang Y, Pang X, Ma C, et al. Clinical efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 inhibitors for the treatment of advanced or metastatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–13.
 135. Byun DJ, Wolchok JD, Rosenberg LM, Girotra M. Cancer immunotherapy — immune checkpoint blockade and associated endocrinopathies. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2017; Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrendo.2016.205>
 136. Chang LS, Barroso-Sousa R, Tolaney SM, Hodi FS, Kaiser UB, Min L. Endocrine toxicity of cancer immunotherapy targeting immune checkpoints. *Endocr Rev*. 2018;40(1):17–65.
 137. de Filette J, Jansen Y, Schreuer M, Everaert H, Velkeniers B, Neyns B, et al. Incidence of Thyroid-Related Adverse Events in Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2016;101(September):jc20162300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27571185>
 138. Kobayashi T, Iwama S, Yasuda Y, Okada N, Tsunekawa T, Onoue T, et al. Patients with antithyroid antibodies are prone to develop destructive thyroiditis by nivolumab: A prospective study. *J Endocr Soc*. 2018;2(3):241–51.
 139. Sakakida T, Ishikawa T, Uchino J, Chihara Y, Komori S, Asai J, et al. Clinical features of immune-related thyroid dysfunction and its association with outcomes in patients with advanced malignancies treated by PD-1 blockade. *Oncol Lett*. 2019;18(2):2140–7.
 140. Belfiore A, Mauerhoff T, Pujol-Borrell R, Badenhop K, Buscema M, Mirakian R, et al. De novo HLA Class II and enhanced HLA Class I molecule expression in SV40 transfected human thyroid epithelial cells. *J Autoimmun*. 1991;4(3):397–414.
 141. Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, Dom G, Hébrant A, van Staveren WCG, et al. Thyroid cancer cell lines: An overview. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3(NOV):1–9.
 142. Lee JJ, Foukakis T, Hashemi J, Grimelius L, Heldin NE, Wallin G, et al. Molecular cytogenetic profiles of novel and established human anaplastic thyroid carcinoma models. *Thyroid*. 2007;17(4):289–301.

143. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676–82.
144. Lonsdale J, Thomas J, Salvatore M, Phillips R, Lo E, Shad S, et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Jun 29;45(6):580–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.2653>
145. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):1–21.
146. Carbon S, Douglass E, Good BM, Unni DR, Harris NL, Mungall CJ, et al. The Gene Ontology resource: enriching a Gold mine. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021 Jan 8;49(D1):D325–34. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D325/6027811>
147. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* [Internet]. 2000 May;25(1):25–9. Available from: http://www.nature.com/articles/ng0500_25
148. Fabregat A, Sidiropoulos K, Garapati P, Gillespie M, Hausmann K, Haw R, et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D481–7.
149. Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods* [Internet]. 2015;12(5):453–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3337>
150. Mezzadra R, Sun C, Jae LT, Gomez-Eerland R, de Vries E, Wu W, et al. Identification of CMTM6 and CMTM4 as PD-L1 protein regulators. *Nature* [Internet]. 2017;1–27. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature23669>
151. Plate M, Li T, Wang Y, Mo X, Zhang Y, Ma D, et al. Identification and characterization of CMTM4, a novel gene with inhibitory effects on HeLa cell growth through Inducing G2/M phase accumulation. *Mol Cells*. 2010;29(4):355–61.
152. Burr ML, Sparbier CE, Chan Y-C, Williamson JC, Woods K, Beavis PA, et al. CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity. *Nature* [Internet]. 2017;549(7670):101–5. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature23643>
153. Al-Alwan M, Du Q, Hou S, Nashed B, Fan Y, Yang X, et al. Follicular Dendritic Cell Secreted Protein (FDC-SP) Regulates Germinal Center and Antibody Responses. *J Immunol*. 2007;178(12):7859–67.
154. Radens CM, Blake D, Jewell P, Barash Y, Lynch KW. Meta-analysis of transcriptomic variation in T-cell populations reveals both variable and consistent signatures of gene expression and splicing. *RNA* [Internet]. 2020 Oct;26(10):1320–33. Available from: <http://rnajournal.cshlp.org/lookup/doi/10.1261/rna.075929.120>
155. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu*

- Rev Immunol. 2005;23:515–48.
156. Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and Chromosomal Localization of the Human PD-1 Gene (PDCD1). *Genomics* [Internet]. 1994 Oct;23(3):704–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088875438471562X>
157. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol*. 2003;33(10):2706–16.
158. Wang J, Yoshida T, Nakaki F, Hiai H, Okazaki T, Honjo T. Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(33):11823–8.
159. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2008;26(1):677–704. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
160. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(3):153–67.
161. Fleury M, Belkina AC, Proctor EA, Zammitti C, Simms RW, Lauffenburger DA, et al. Increased Expression and Modulated Regulatory Activity of Coinhibitory Receptors PD-1, TIGIT, and TIM-3 in Lymphocytes From Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* [Internet]. 2018 Apr;70(4):566–77. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.40399>
162. Wang Y, Pang N, Wang X, Liu Y, Wang X, Wang L, et al. Percentages of PD-1+CD4+T cells and PD-L1+DCs are increased and sPD-1 level is elevated in patients with immune thrombocytopenia. *Hum Vaccines Immunother* [Internet]. 2018;14(4):832–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1342913>
163. Jiao Q, Liu C, Yang Z, Ding Q, Wang M, Li M, et al. Upregulated PD-1 expression is associated with the development of systemic lupus erythematosus, but not the PD-1.1 Allele of the PDCD1 gene. *Int J Genomics*. 2014;2014:10–2.
164. Margolick JB, Hsu SM, Volkman DJ, Burman KD, Fauci AS. Immunohistochemical characterization of intrathyroid lymphocytes in Graves' disease. Interstitial and intraepithelial populations. *Am J Med*. 1984;76(5):815–21.
165. Bene MC, Derennes V, Faure G, Thomas JL, Duheille J, Leclerc J. Graves' disease: In situ localization of lymphoid T cell subpopulations. *Clin Exp Immunol*. 1983;52(2):311–6.
166. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature* [Internet]. 2017;542(7639):110–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28150777>
167. Gu-Trantien C, Migliori E, Buisseret L, De Wind A, Brohée S, Garaud S, et

- al. CXCL13-producing T FH cells link immune suppression and adaptive memory in human breast cancer. *JCI Insight* [Internet]. 2017;2(11):1–17. Available from:
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.91487>;e91487.%5Cnhttps://
168. Mohr A, Trésallet C, Monot N, Bauvois A, Abiven D, Atif M, et al. Tissue Infiltrating LT α i—Like Group 3 Innate Lymphoid Cells and T Follicular Helper Cells in Graves' and Hashimoto's Thyroiditis. *Front Immunol*. 2020;11(April):1–12.
169. Zhang J, Ren M, Zeng H, Guo Y, Zhuang Z, Feng Z, et al. Elevated follicular helper T Cells and expression of IL-21 in thyroid tissues are involved in the pathogenesis of Graves' disease. *Immunol Res*. 2015 Jun;62(2):163–74.
170. Lucas-Martin A, Foz-Sala M, Todd I, Bottazzo GF, Pujol-Borrell R. Occurrence of Thyrocyte HLA Class II Expression in a Wide Variety of Thyroid Diseases: Relationship With Lymphocytic Infiltration and Thyroid Autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1988 Feb;66(2):367–75. Available from:
<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem-66-2-367>
171. Colli ML, Hill JLE, Marroquí L, Chaffey J, Dos RS, Leete P, et al. PDL1 is expressed in the islets of people with type 1 diabetes and is up-regulated by interferons- α and- γ via IRF1 induction. *EBioMedicine* [Internet]. 2018;36:367–75. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.040>
172. Wang Y, Wang H, Yao H, Li C, Fang JY, Xu J. Regulation of PD-L1: Emerging routes for targeting tumor immune evasion. *Front Pharmacol*. 2018;9(MAY):1–13.
173. Shen X, Zhang L, Li J, Li Y, Wang Y, Xu Z. Recent Findings in the Regulation of Programmed Death Ligand 1 Expression. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Jun 14;10(June):1–25. Available from:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01337/full>
174. Ritprajak P, Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2015;51(3):221–8. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.11.014>
175. Osum KC, Burrack AL, Martinov T, Sahli NL, Mitchell JS, Tucker CG, et al. Interferon-gamma drives programmed death-ligand 1 expression on islet β cells to limit T cell function during autoimmune diabetes. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):8295. Available from:
<http://www.nature.com/articles/s41598-018-26471-9>
176. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 2018;36:411–33.
177. Massart C, Gibassier J, Le Gall F, Raoul ML, Beurtin F, Genetet B, et al. Thyroid cell survival in coculture with autologous peripheral or intrathyroidal lymphocytes. *Clin Endocrinol* [Internet]. 1995;42(4):379–87. Available from:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7750192
178. Massart C, Gibassier J, Genetet N, Raoul ML, Baron M, Le Gall F, et al. Effect of lymphocytes on hormonal secretion by autologous thyrocytes cultured in monolayers. *J Mol Endocrinol*. 1996;17(3):185–95.
 179. Weetman AP, Cohen S, Makgoba MW, Borysiewicz LK. Expression of an intercellular adhesion molecule, ICAM-1, by human thyroid cells. *J Endocrinol* [Internet]. 1989 Jul;122(1):185-NP. Available from: https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/122/1/joe_122_1_021.xml
 180. Vargas F, Tolosa E, Sospedra M, Catalfamo M, Lucas-Martin A, Obiols G, et al. Characterization of neural cell adhesion molecule (NCAM) expression in thyroid follicular cells: Induction by cytokines and over-expression in autoimmune glands. *Clin Exp Immunol*. 1994;98(3):478–88.
 181. Salmaso C, Olive D, Pesce G, Bagnasco M. Costimulatory molecules and autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity*. 2002;35(3):159–67.
 182. Cho BA, Yoo SK, Song YS, Kim SJ, Lee KE, Shong M, et al. Transcriptome Network Analysis Reveals Aging-Related Mitochondrial and Proteasomal Dysfunction and Immune Activation in Human Thyroid. *Thyroid*. 2018;28(5):656–66.
 183. Pascual V, Chaussabel D, Banchereau J. A genomic approach to human autoimmune diseases. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2010;28(1):535–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20192809>
 184. Banchereau R, Cepika A-M, Pascual V. Systems approaches to human autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2013;25(5):598–605. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055331>
 185. Bryant PA, Smyth GK, Robins-Browne R, Curtis N. Detection of gene expression in an individual cell type within a cell mixture using microarray analysis. *PLoS One*. 2009;4(2).
 186. Zhang Q, Vignali DAA. Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity. *Immunity* [Internet]. 2016 May;44(5):1034–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761316301467>
 187. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* [Internet]. 2006;203(4):883–95. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20051776>
 188. Kuang M, Wang S, Wu M, Ning G, Yao Z, Li L. Expression of IFN α -inducible genes and modulation of HLA-DR and thyroid stimulating hormone receptors in Graves' disease. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2010;319(1–2):23–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015465>
 189. Odorizzi PM, Pauken KE, Paley MA, Sharpe A, John Wherry E. Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8 $^{+}$ T cells. *J Exp Med*. 2015;212(7):1125–37.

BIBLIOGRAFÍA

190. Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Chiovato L, Bottazzo GF. Lectin-induced expression of DR antigen on human cultured follicular thyroid cells. *Nature* [Internet]. 1983 Jul 1;304(5921):71–3. Available from: <http://www.nature.com/articles/304071a0>
191. Azuma T, Yao S, Zhu G, Flies AS, Flies SJ, Chen L. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood*. 2008;111(7):3635–43.
192. Álvarez-Sierra D, Marín-Sánchez A, Ruiz-Blázquez P, de Jesús Gil C, Iglesias-Felip C, González Ó, et al. Analysis of the PD-1/PD-L1 axis in human autoimmune thyroid disease: Insights into pathogenesis and clues to immunotherapy associated thyroid autoimmunity. *J Autoimmun* [Internet]. 2019 Sep;103(March):102285. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.05.013>

ANEXOS

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

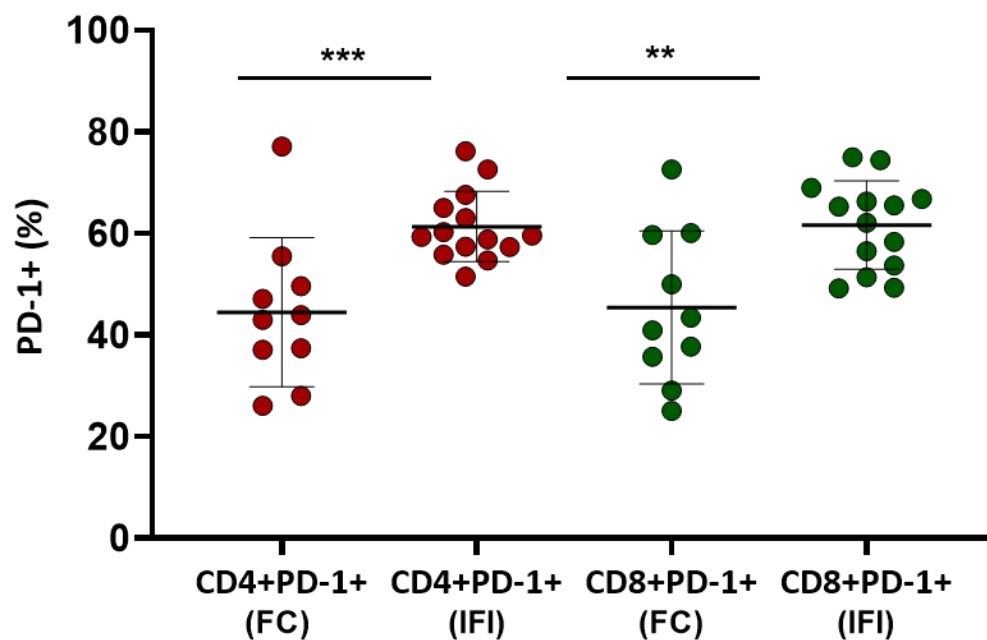


Figura suplementaria 1. Expresión de PD-1 en linfocitos infiltrantes CD4 y CD8 en tiroides de pacientes con enfermedad de Graves cuantificados mediante citometría de flujo (FC) o inmunofluorescencia indirecta (IFI). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

cambia ren la figura B la leyenda del X,
no es PDL1 sino PDL2

Figura suplementaria 2. Expresión de (A) PD-L1 y (B) PD-L2 en CFTs de suspensiones celulares obtenidas de tejido tiroideo fresco mediante digestión enzimática. Se muestra la expresión cuantificada para cada anticuerpo con sus respectivos controles de isotipo.

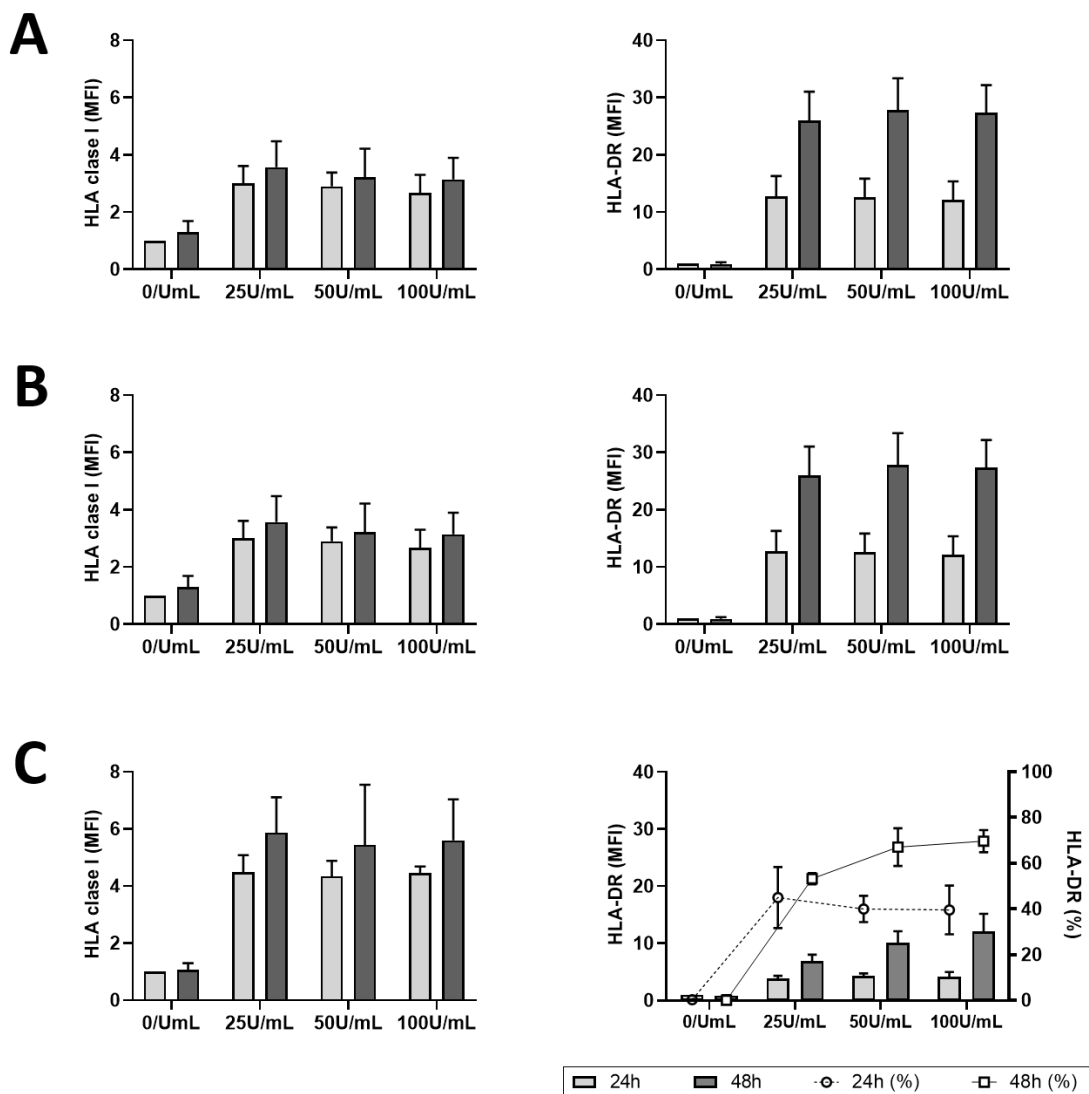


Figura suplementaria 3. Análisis mediante citometría de flujo de la MFI para HLA de clase I y HLA-DR tras la estimulación mediante IFN- γ en las líneas celulares (A) HT93, (B) TPC-1, y (C) HTh83. En la figura (C) se muestra además el cambio en el porcentaje de células HTh83 positivas para HLA-DR.

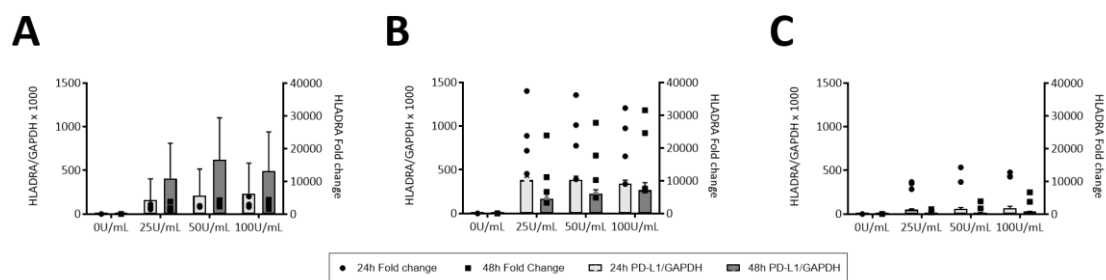


Figura suplementaria 4. Análisis mediante qPCR de la expresión relativa de HLA-DRA tras la estimulación mediante IFN- γ en las líneas celulares (A) HT93, (B) TPC-1, y (C) HTh83. En el eje Y izquierdo la expresión génica relativa se representa normalizada con respecto a GAPDH mediante barras, y en el eje Y derecho se representa mediante puntos el incremento de expresión con respecto a la situación basal.

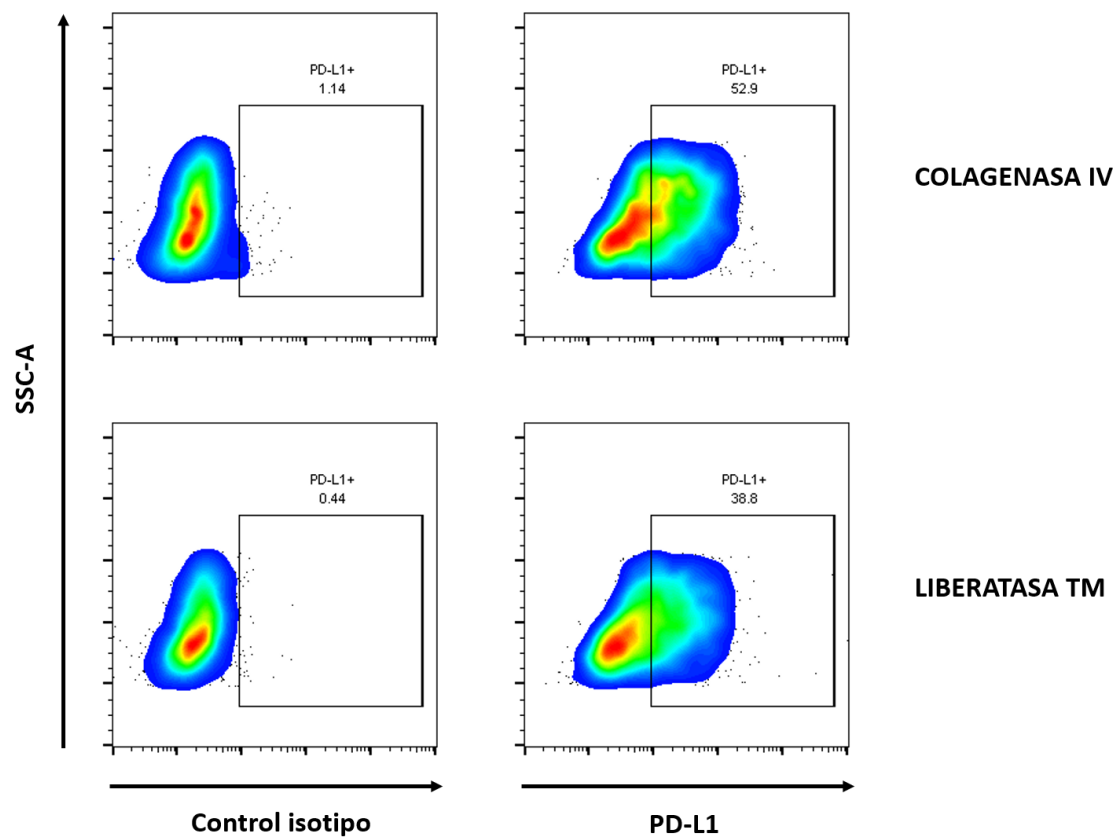


Figura suplementaria 5. Expresión espontánea de PD-L1 tras 24 horas de cultivo en dos muestras pertenecientes al mismo paciente y digeridas con colagenasa IV o Liberasa TM.

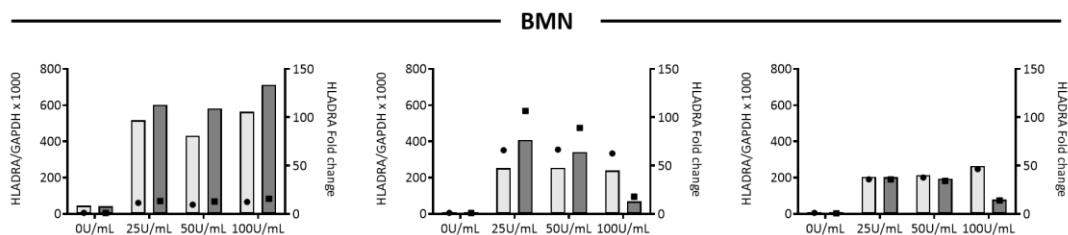
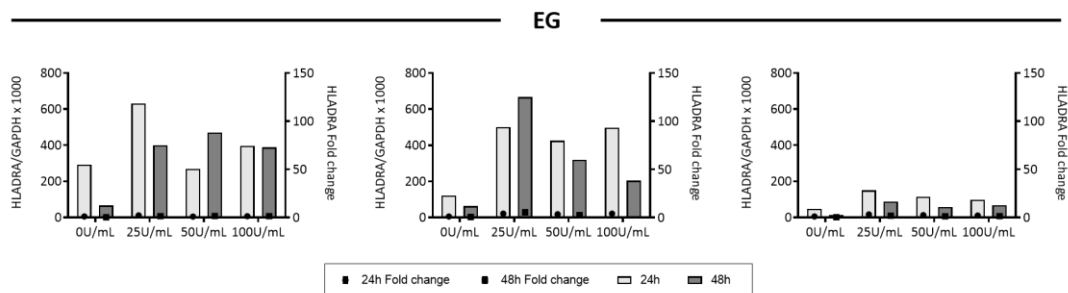
A**B**

Figura suplementaria 6. Análisis mediante qPCR de la expresión génica relativa de HLA-DRA en respuesta a la estimulación mediante distintas dosis de IFN- γ durante 24 y 48 horas en cultivos primarios de CFTs de pacientes con (A) BMN o (B) EG. En el eje Y izquierdo la expresión génica relativa se representa normalizada con respecto a GAPDH mediante barras, y en el eje Y derecho se representa mediante puntos el incremento de expresión con respecto a la situación basal. Debido a la variabilidad entre las muestras los resultados se representan de forma individualizada.

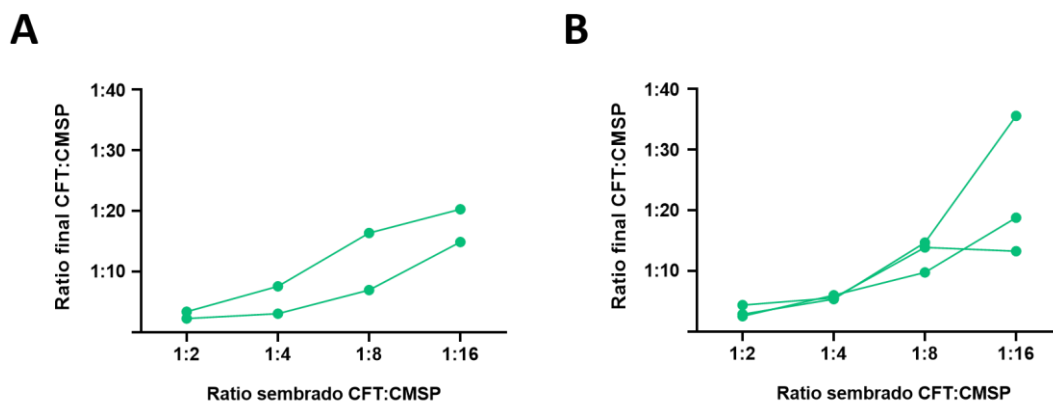


Figura suplementaria 7. Representación gráfica de la relación entre la proporción de CFT:CMSP teórico sembradas a día 0 (eje X), y proporción de CFT:CMSP sin estimular recuperadas en el día +3 (eje Y) en (A) muestras de donantes de órganos, y (B) muestras de pacientes con enfermedad de Graves.

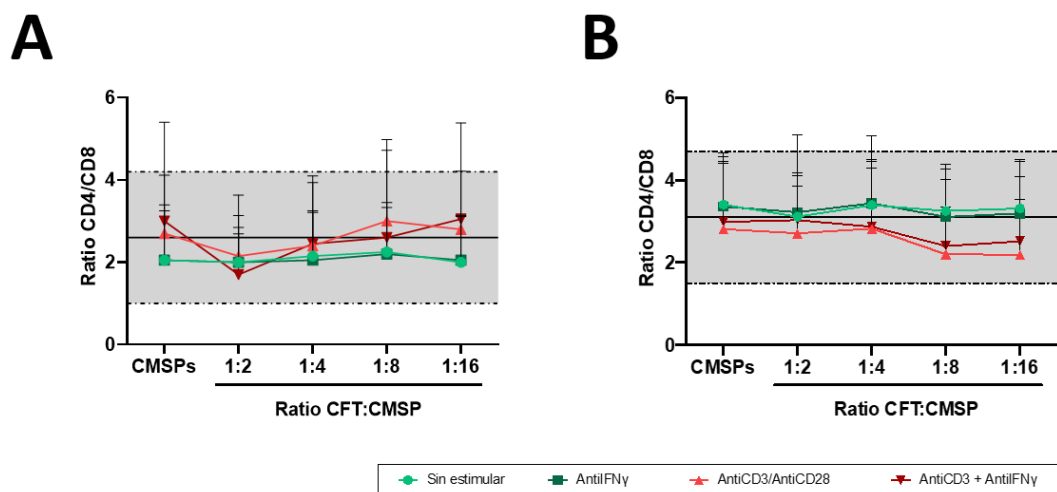


Figura suplementaria 8. Ratio CD4/CD8 en las distintas condiciones experimentales de cocultivo en (A) donantes de órganos y (B) pacientes con enfermedad de Graves. El área gris de cada gráfica representa la media (línea continua) \pm la desviación estándar en las muestras previamente a su cultivo.

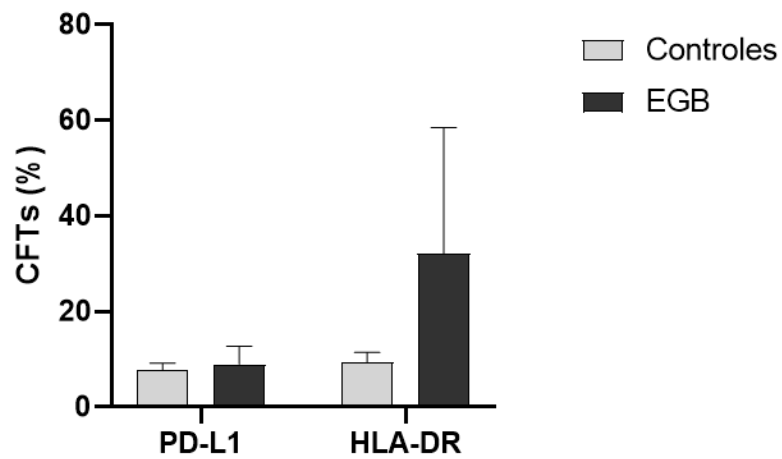


Figura suplementaria 9. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión basal de PD-L1 y HLA-DR en CFTs de suspensiones celulares obtenidas tras la digestión enzimática de tejido tiroideo de donantes de órganos y pacientes con enfermedad de Graves. .

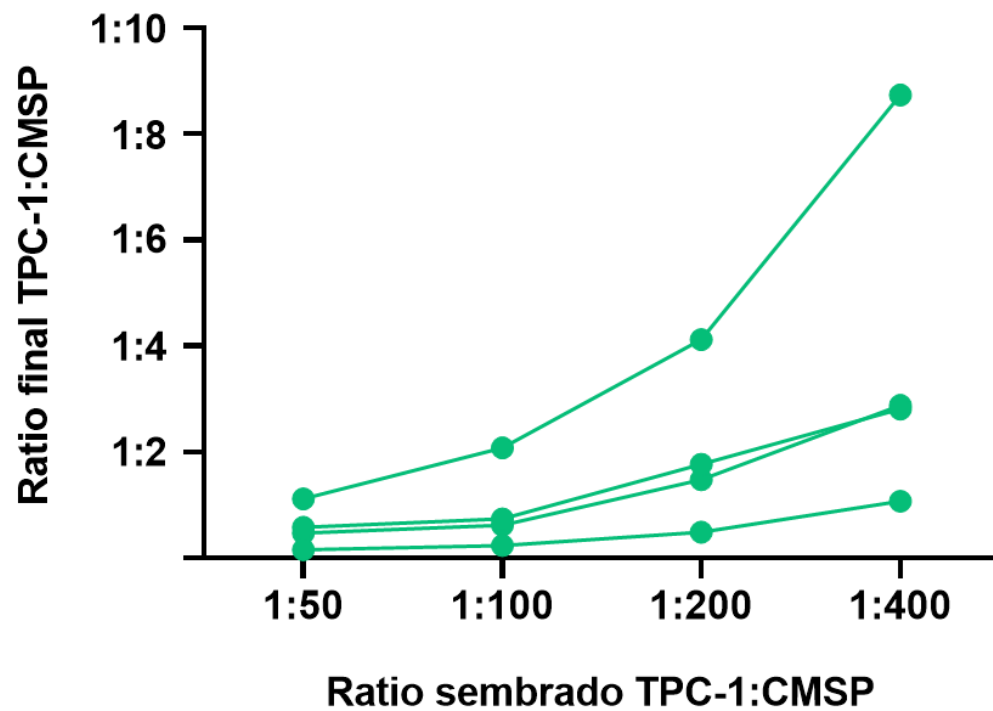


Figura suplementaria 10. Representación gráfica de la relación entre la proporción de TPC-1:CMSP teórico sembradas a día 0 (eje X), y proporción de TPC-1:CMSP sin estimular recuperadas en el día +3 (eje Y).

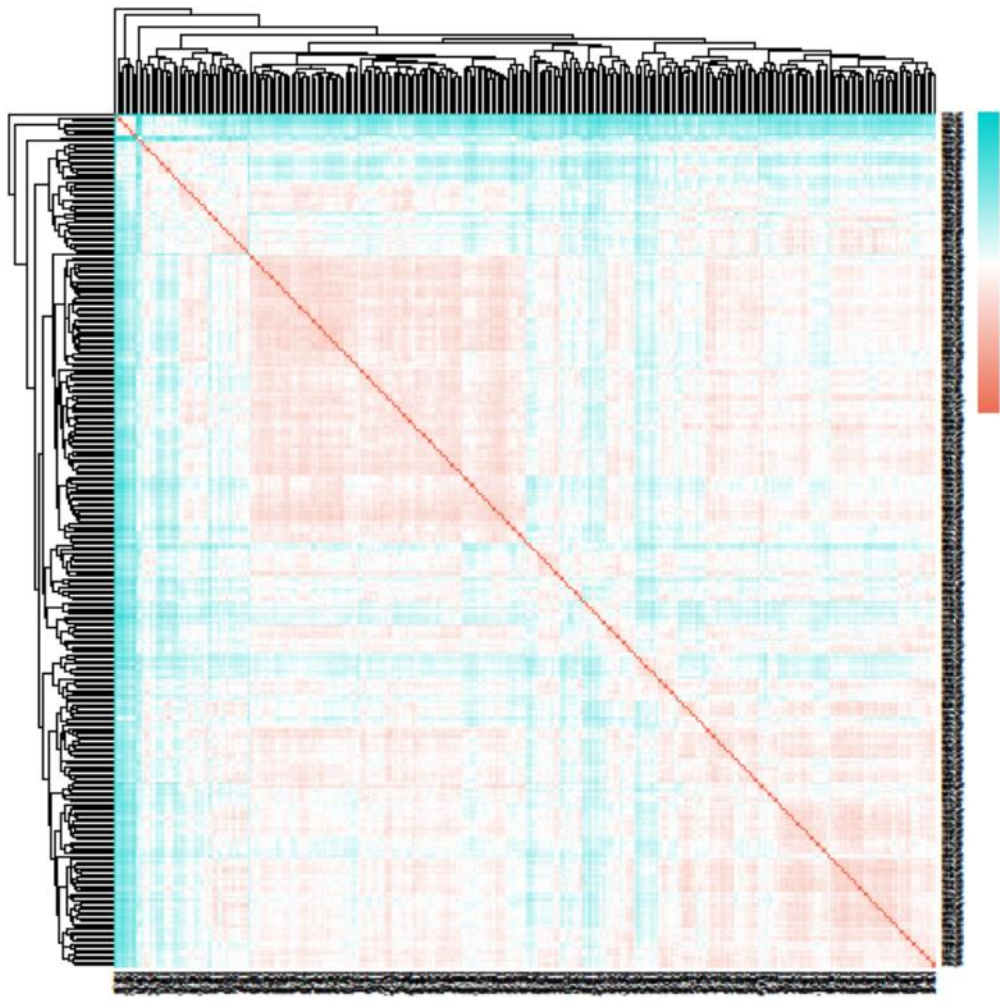


Figura suplementaria 11. Representación mediante heatmap de la distancia euclidiana entre las muestras analizadas. Las muestras que presentan menor distancia euclidiana entre sí (más semejantes) se muestran en rojo, mientras que las que presentan mayor distancia entre sí se muestran en azul.

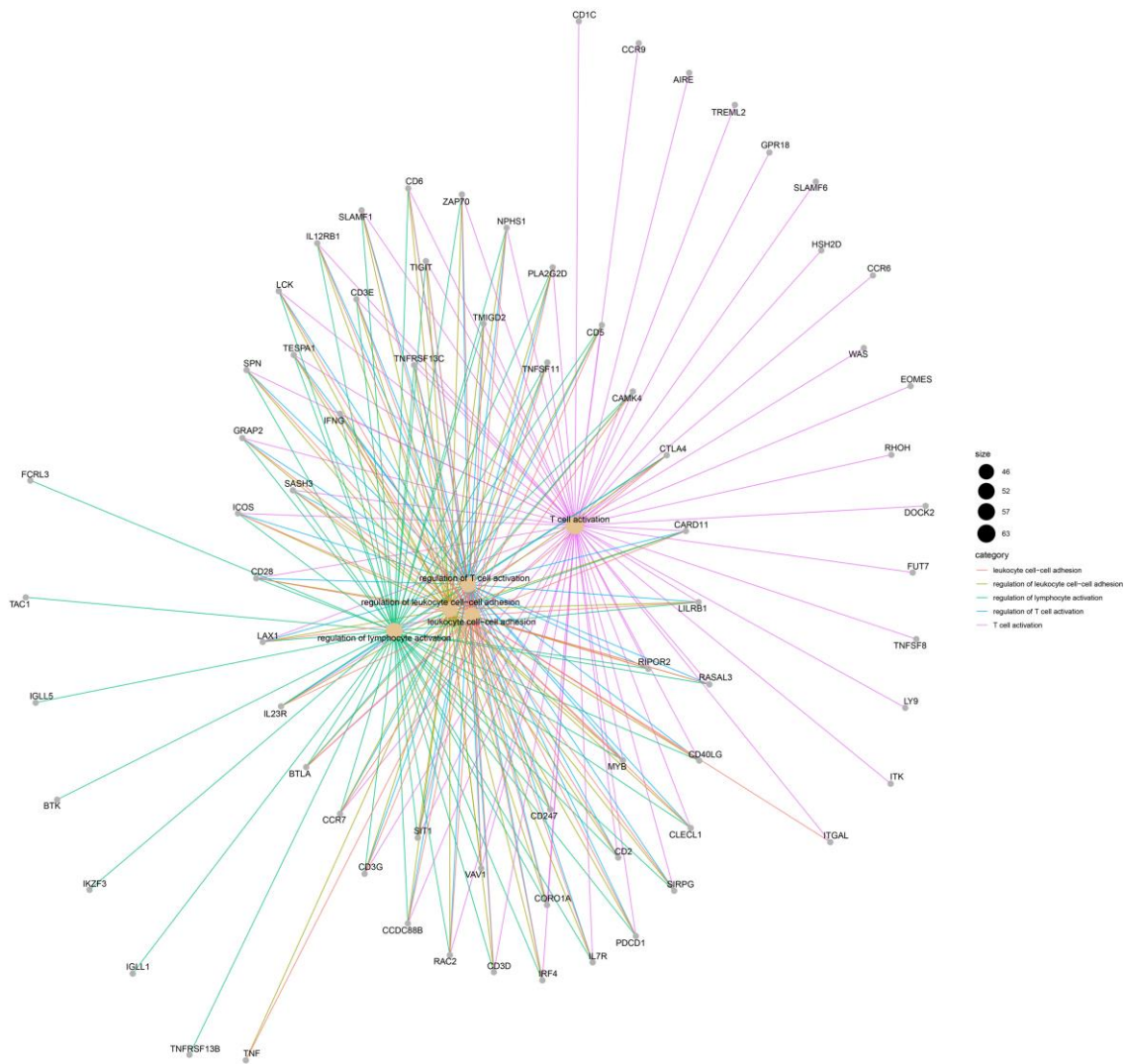


Figura suplementaria 12. Red de genes encontrados en los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de procesos biológicos en la comparación entre muestras de tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI) y tejidos con infiltración extensa (ELI). Cada gen se representa unido con los términos a los que pertenece. Los términos GO enriquecidos se muestran como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes que los forman y que se han encontrado diferencialmente expresados.

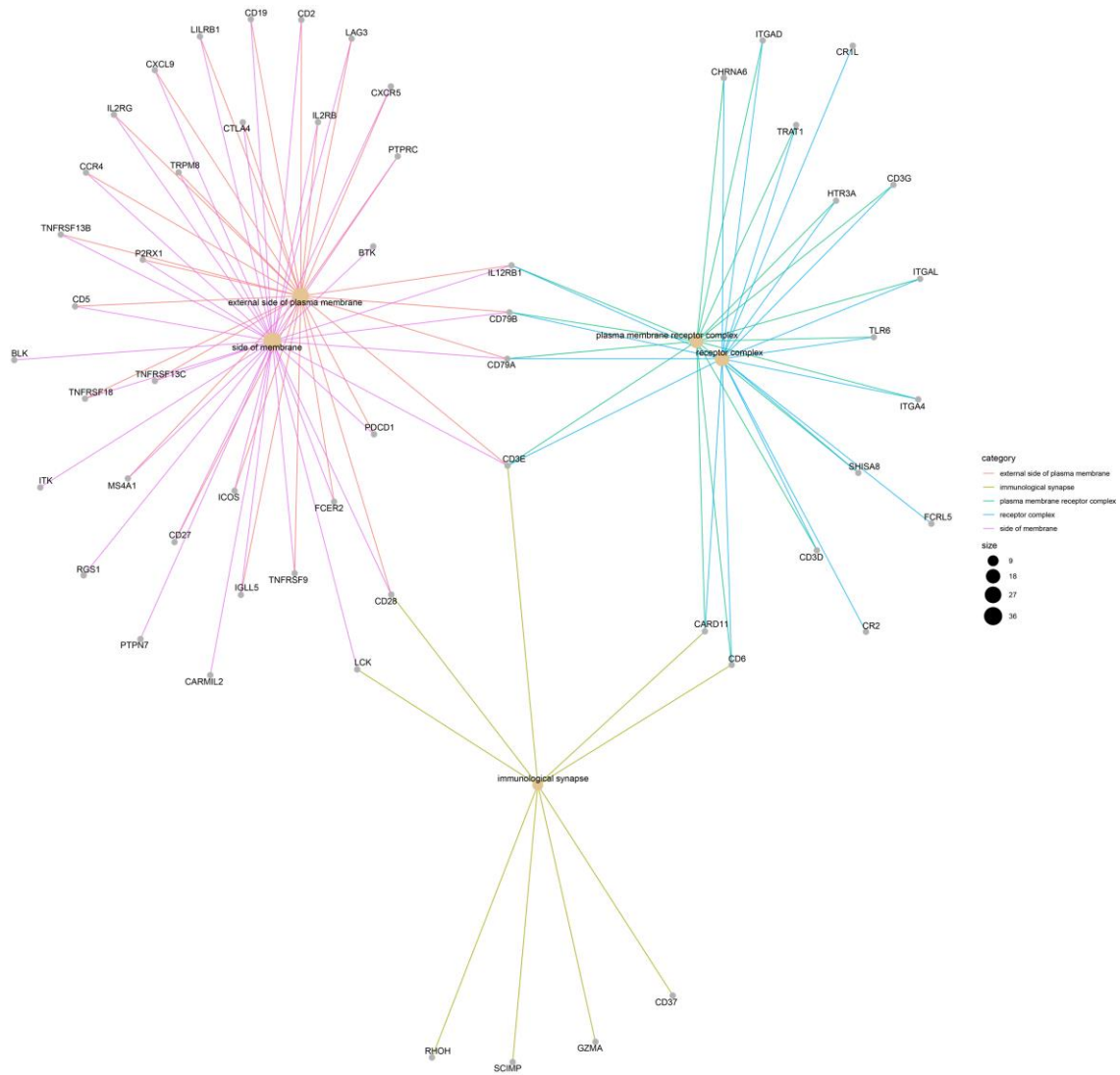


Figura suplementaria 13. Red de genes encontrados en los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de componentes celulares en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI). Cada gen se representa unido con los términos a los que pertenece. Los términos GO enriquecidos se muestran como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes que los forman y que se han encontrado diferencialmente expresados.

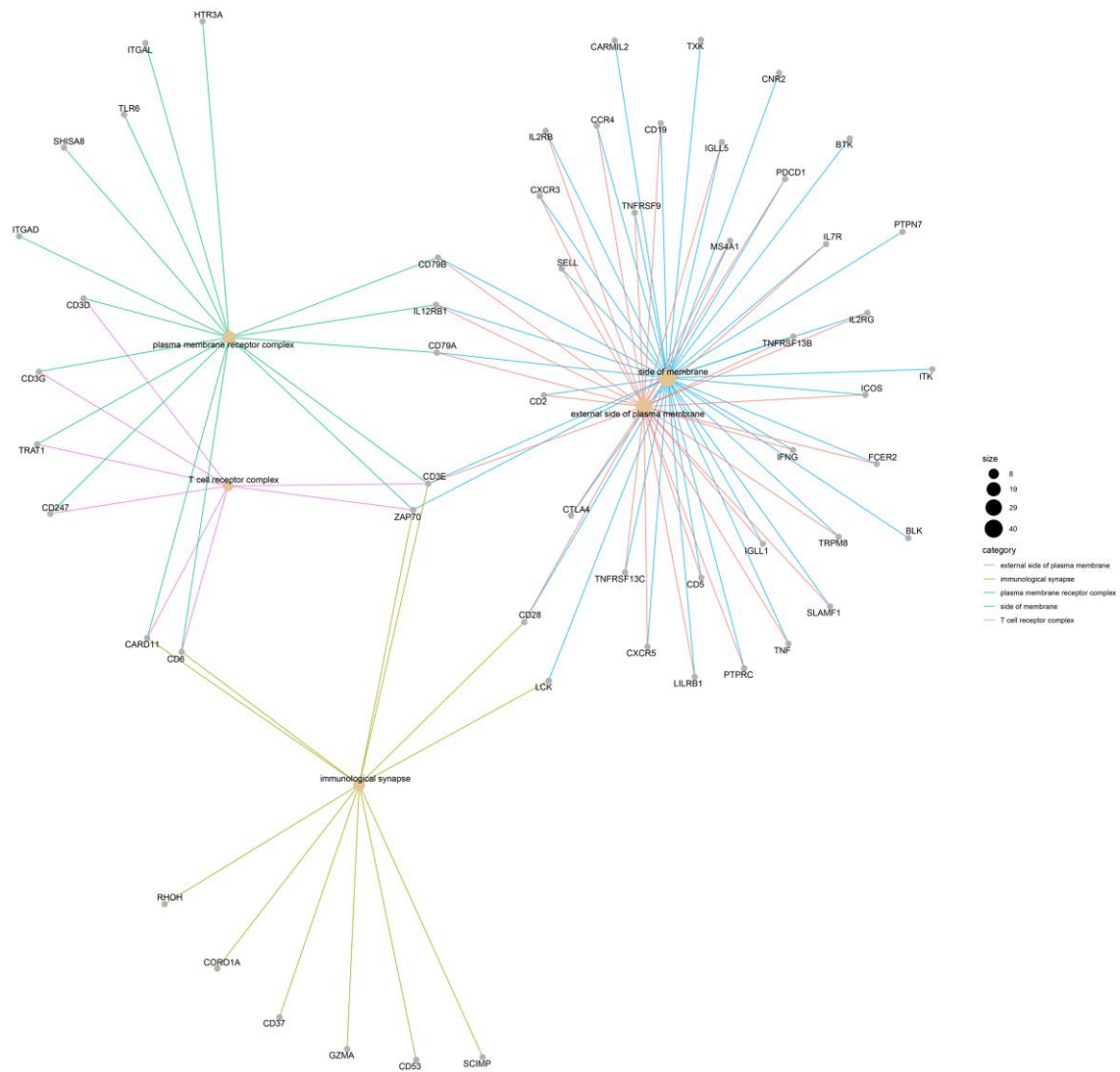


Figura suplementaria 14. Red de genes encontrados en los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de componentes celulares en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con infiltración extensa (ELI). Cada gen se representa unido con los términos a los que pertenece. Los términos GO enriquecidos se muestran como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes que los forman y que se han encontrado diferencialmente expresados.

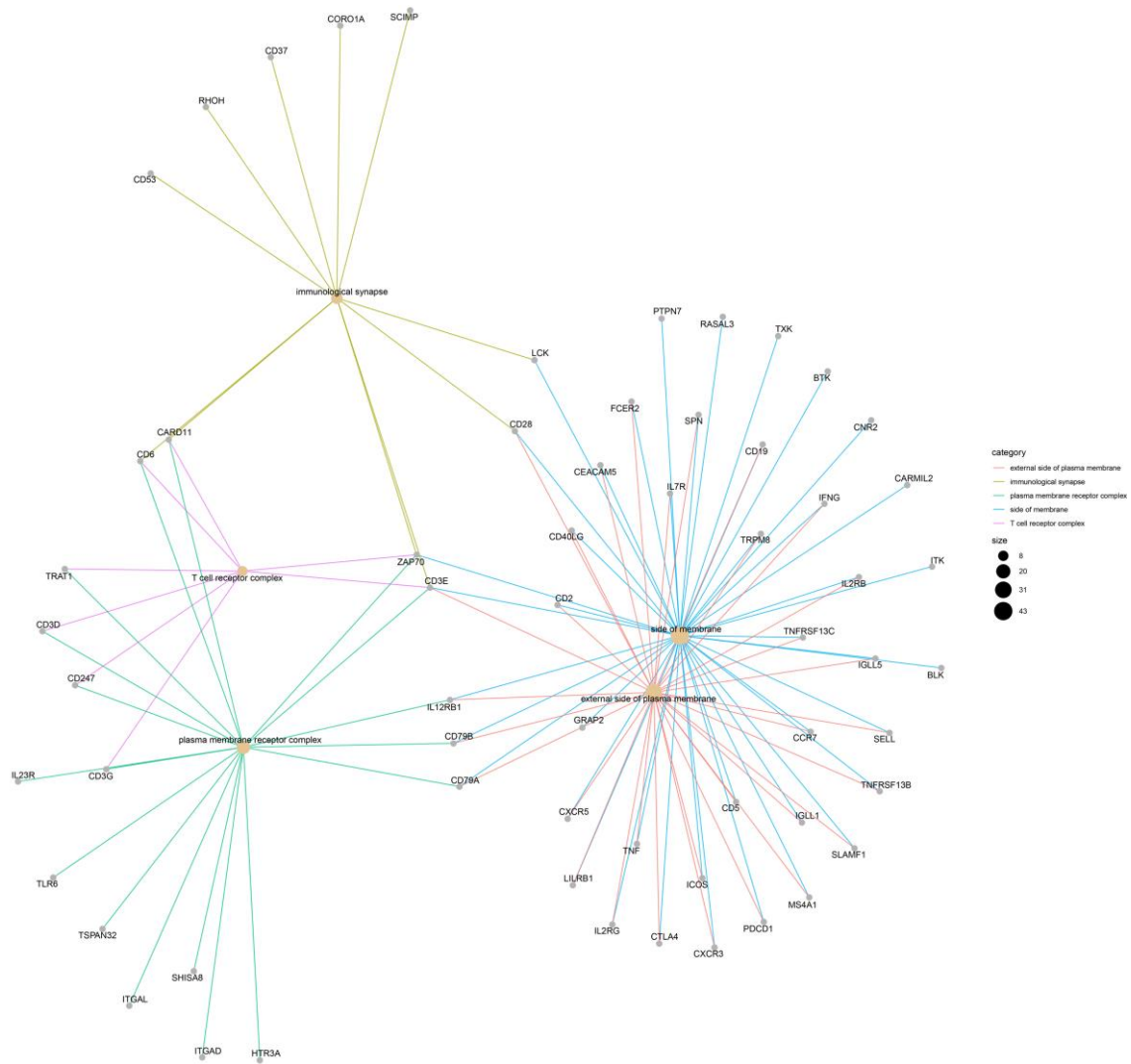


Figura suplementaria 15. Red de genes encontrados en los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de componentes celulares en la comparación entre muestras de tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI) y tejidos con infiltración extensa (ELI). Cada gen se representa unido con los términos a los que pertenece. Los términos GO enriquecidos se muestran como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes que los forman y que se han encontrado diferencialmente expresados.

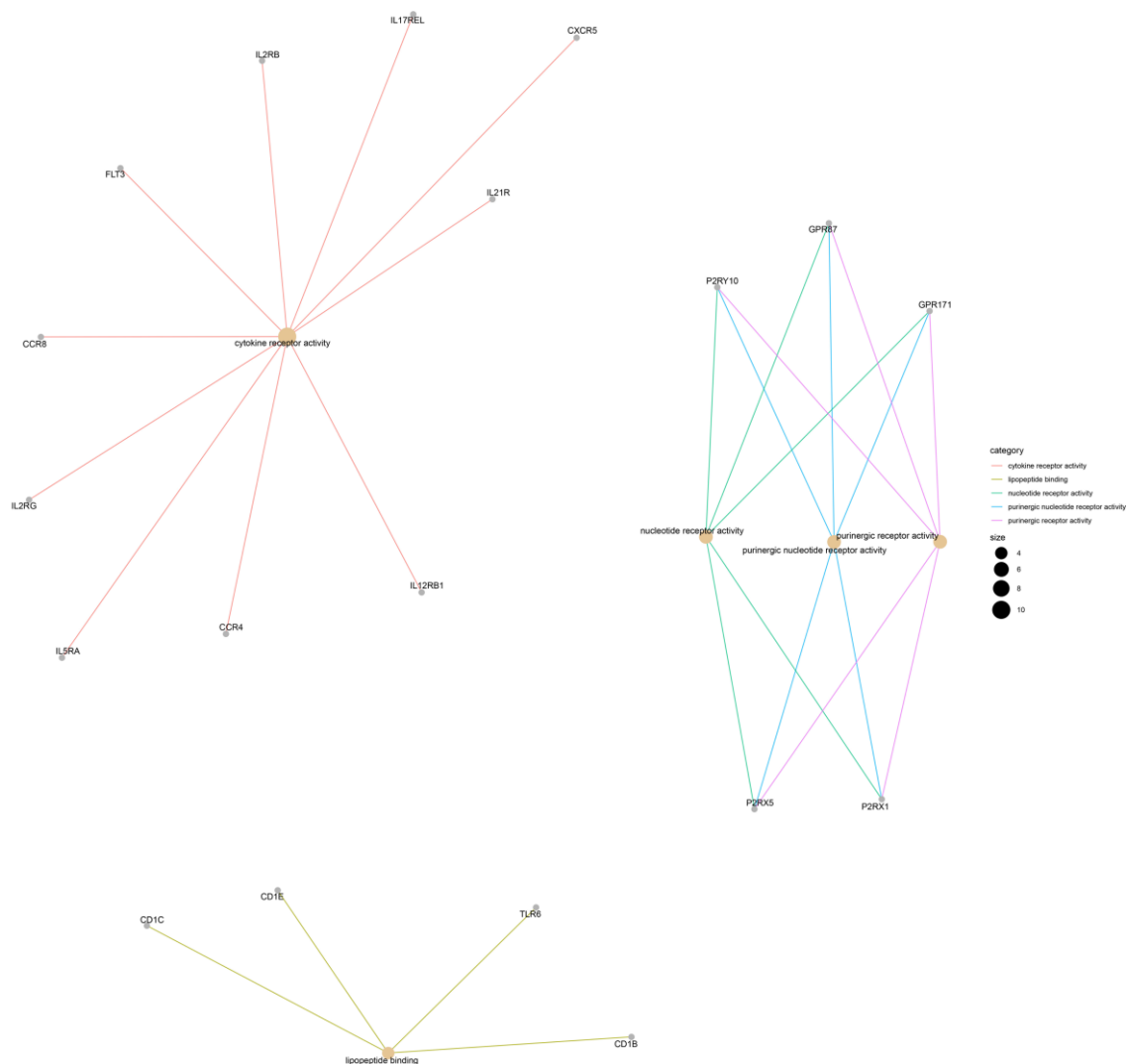


Figura suplementaria 16. Red de genes encontrados en los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de funciones celulares en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI). Cada gen se representa unido con los términos a los que pertenece. Los términos GO enriquecidos se muestran como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes que los forman y que se han encontrado diferencialmente expresados.

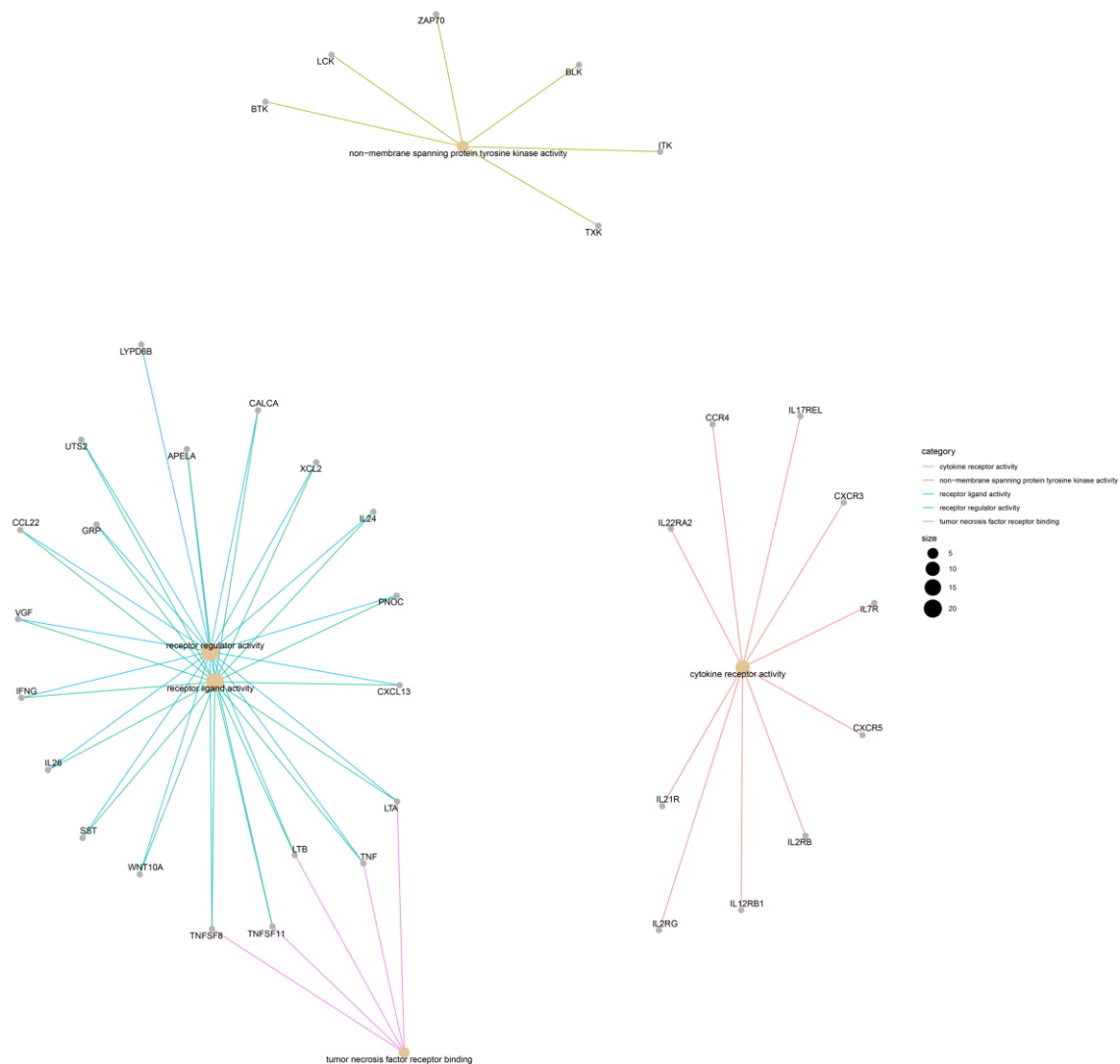


Figura suplementaria 17. Red de genes encontrados en los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de funciones celulares en la comparación entre tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con infiltración extensa (ELI). Cada gen se representa unido con los términos a los que pertenece. Los términos GO enriquecidos se muestran como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes que los forman y que se han encontrado diferencialmente expresados.

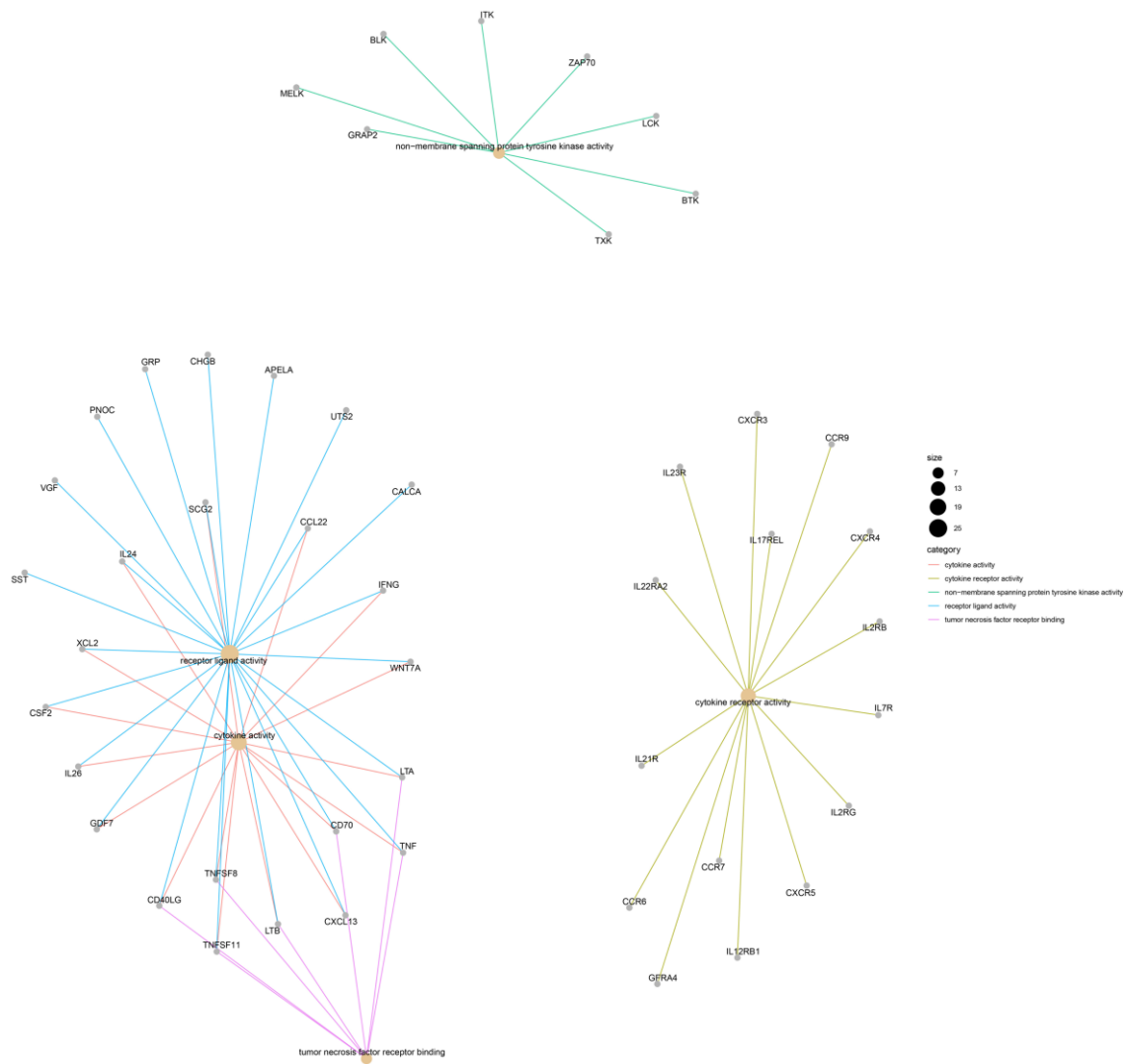


Figura suplementaria 18. Red de genes encontrados en los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de funciones celulares en la comparación entre muestras de tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI) y tejidos con infiltración extensa (ELI). Cada gen se representada unido con los términos a los que pertenece. Los términos GO enriquecidos se muestran como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes que los forman y que se han encontrado diferencialmente expresados.

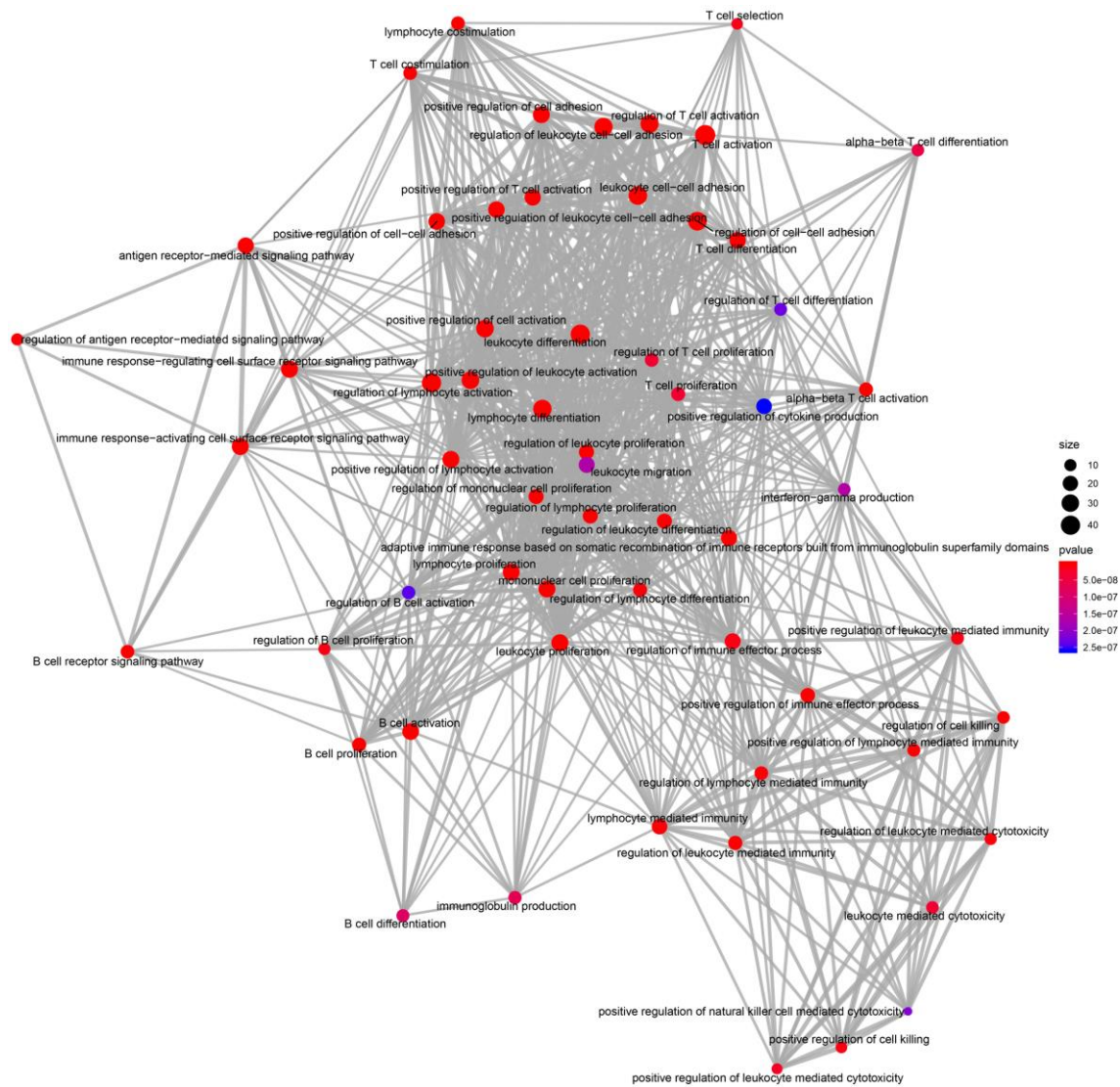


Figura suplementaria 19. Mapas de relación entre los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de procesos biológicos en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI). Los términos GO más enriquecidos se representan relacionados entre sí según su similitud. El tamaño de cada nodo y su color representan el número de genes enriquecidos y el p-valor para dicho término.

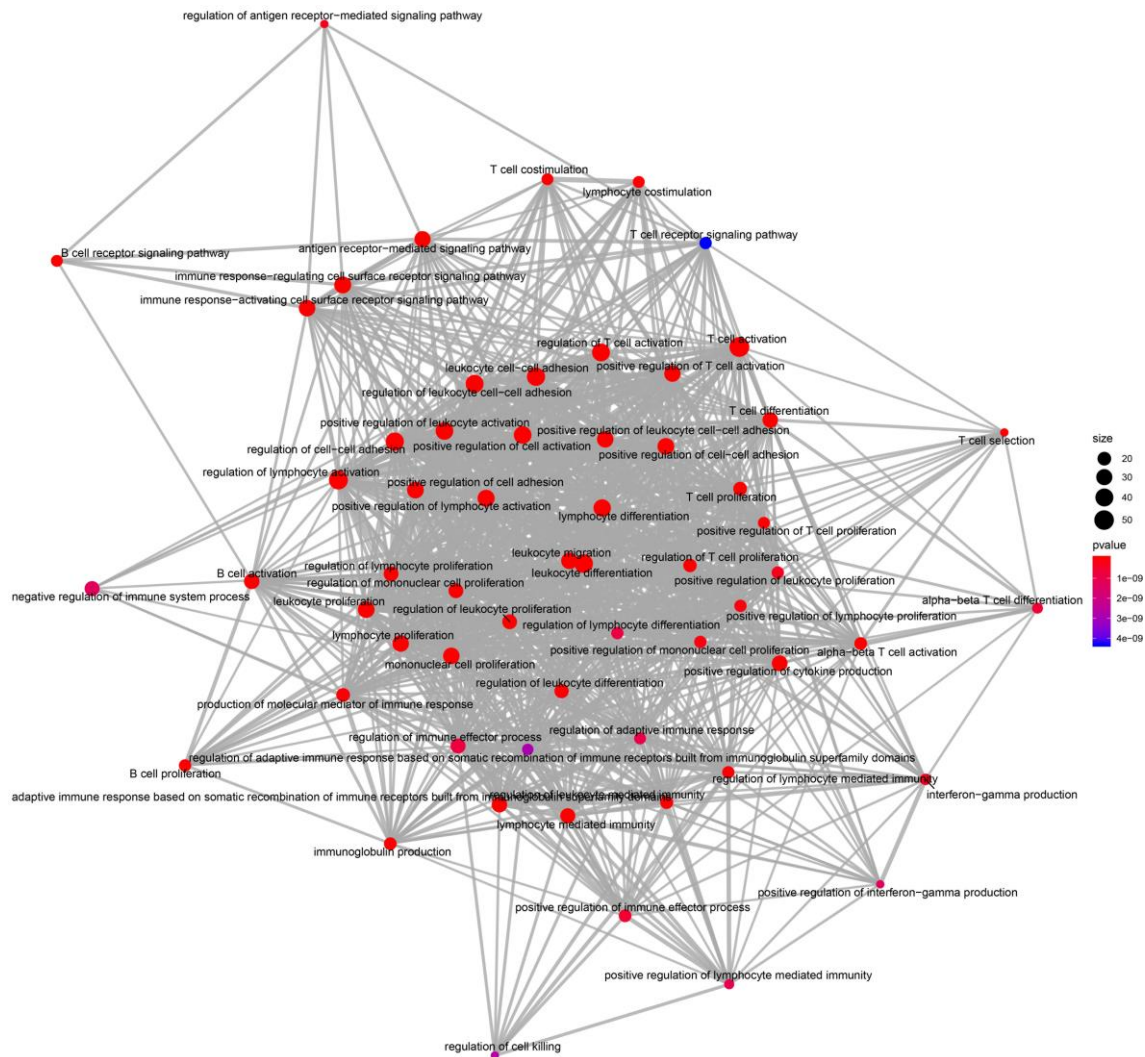


Figura suplementaria 20. Mapas de relación entre los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de procesos biológicos en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con infiltrados extensos (ELI). Los términos GO más enriquecidos se representan relacionados entre sí según su similitud. El tamaño de cada nodo y su color representan el número de genes enriquecidos y el p-valor para dicho término.

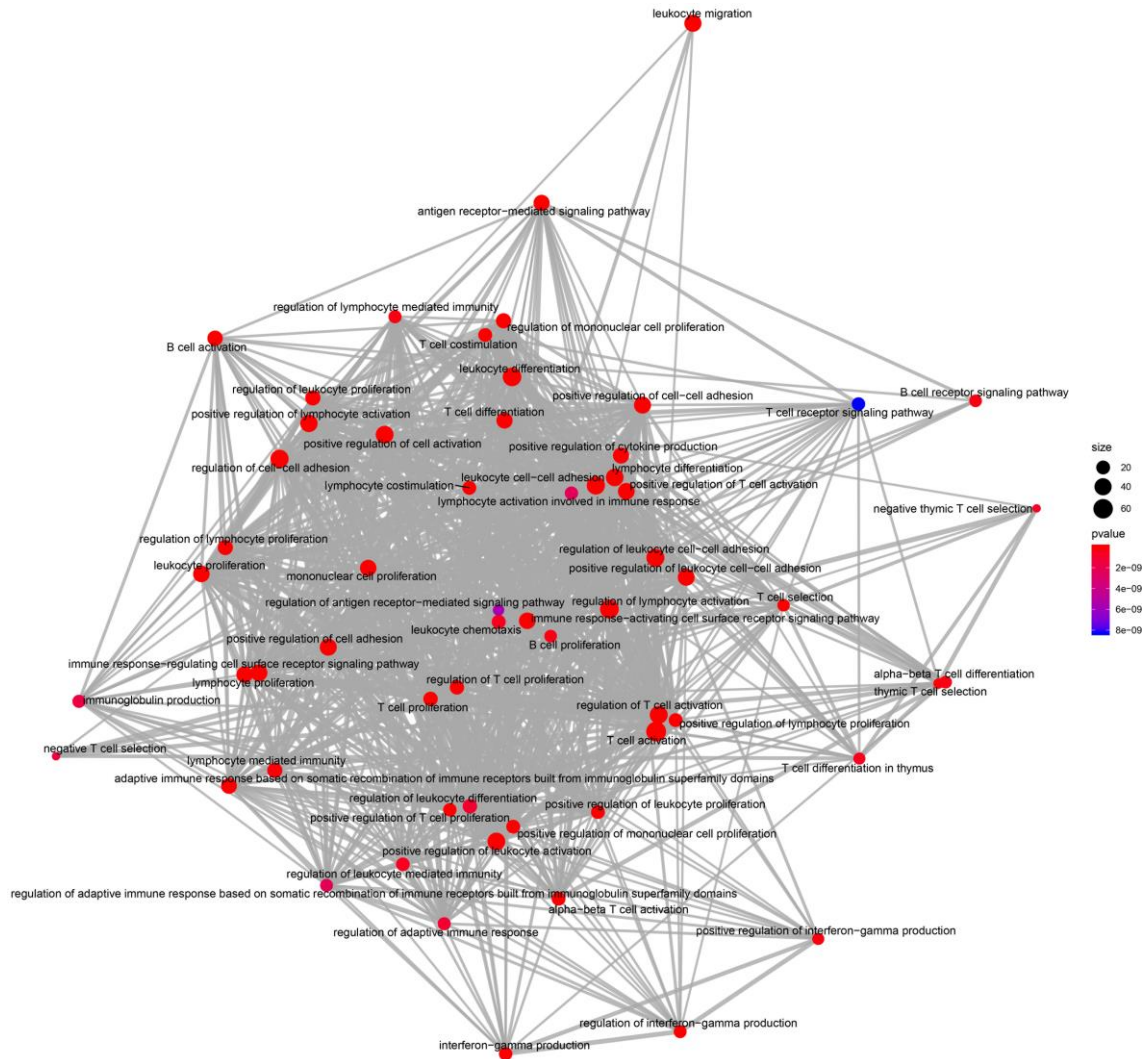


Figura suplementaria 21. Mapas de relación entre los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de procesos biológicos en la comparación entre muestras de tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI) y tejidos con infiltrados extensos (ELI). Los términos GO más enriquecidos se representan relacionados entre sí según su similitud. El tamaño de cada nodo y su color representan el número de genes enriquecidos y el p-valor para dicho término.

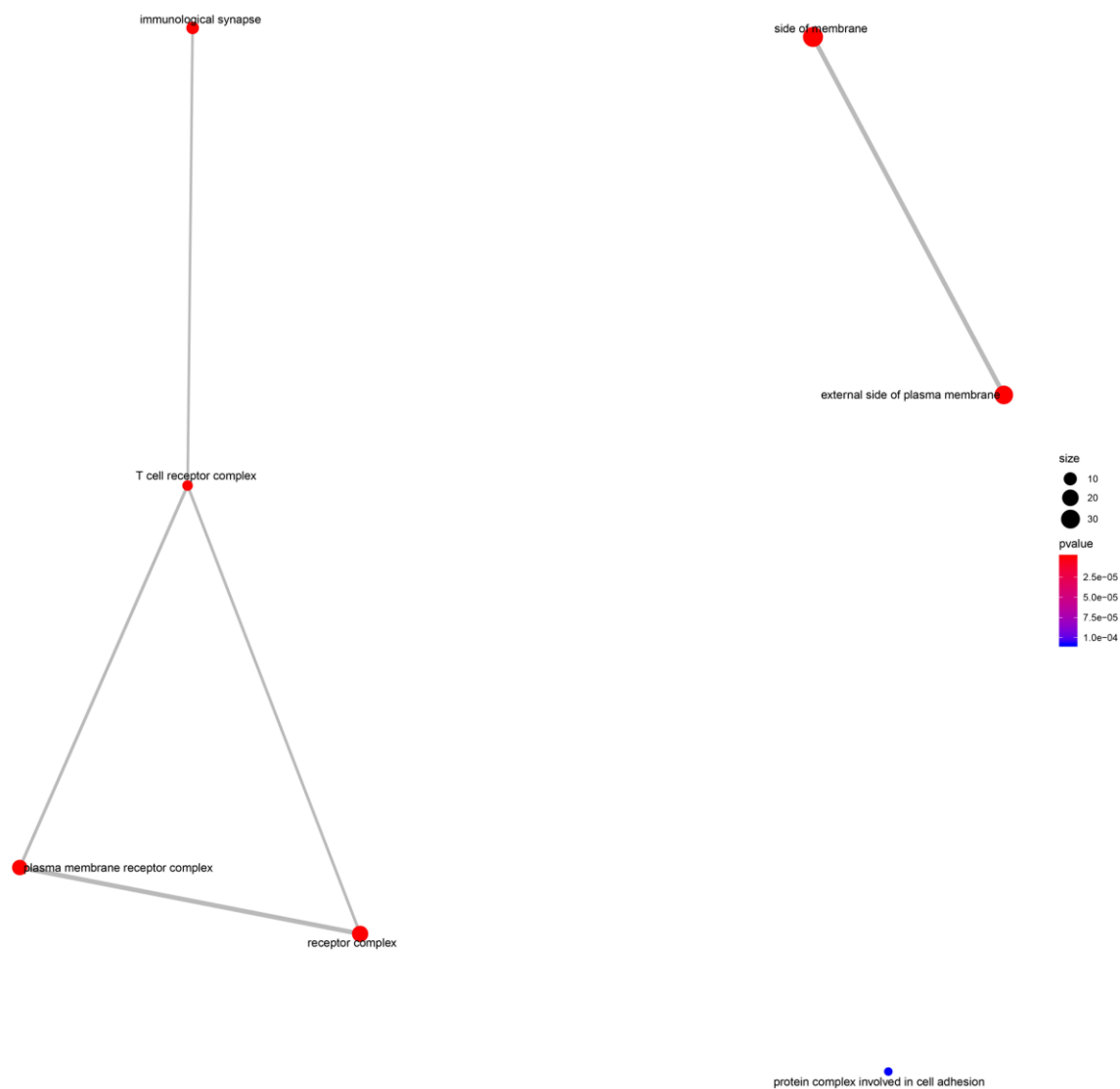


Figura suplementaria 22. Mapas de relación entre los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de componentes celulares en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI). Los términos GO más enriquecidos se representan relacionados entre sí según su similitud. El tamaño de cada nodo y su color representan el número de genes enriquecidos y el p-valor para dicho término.

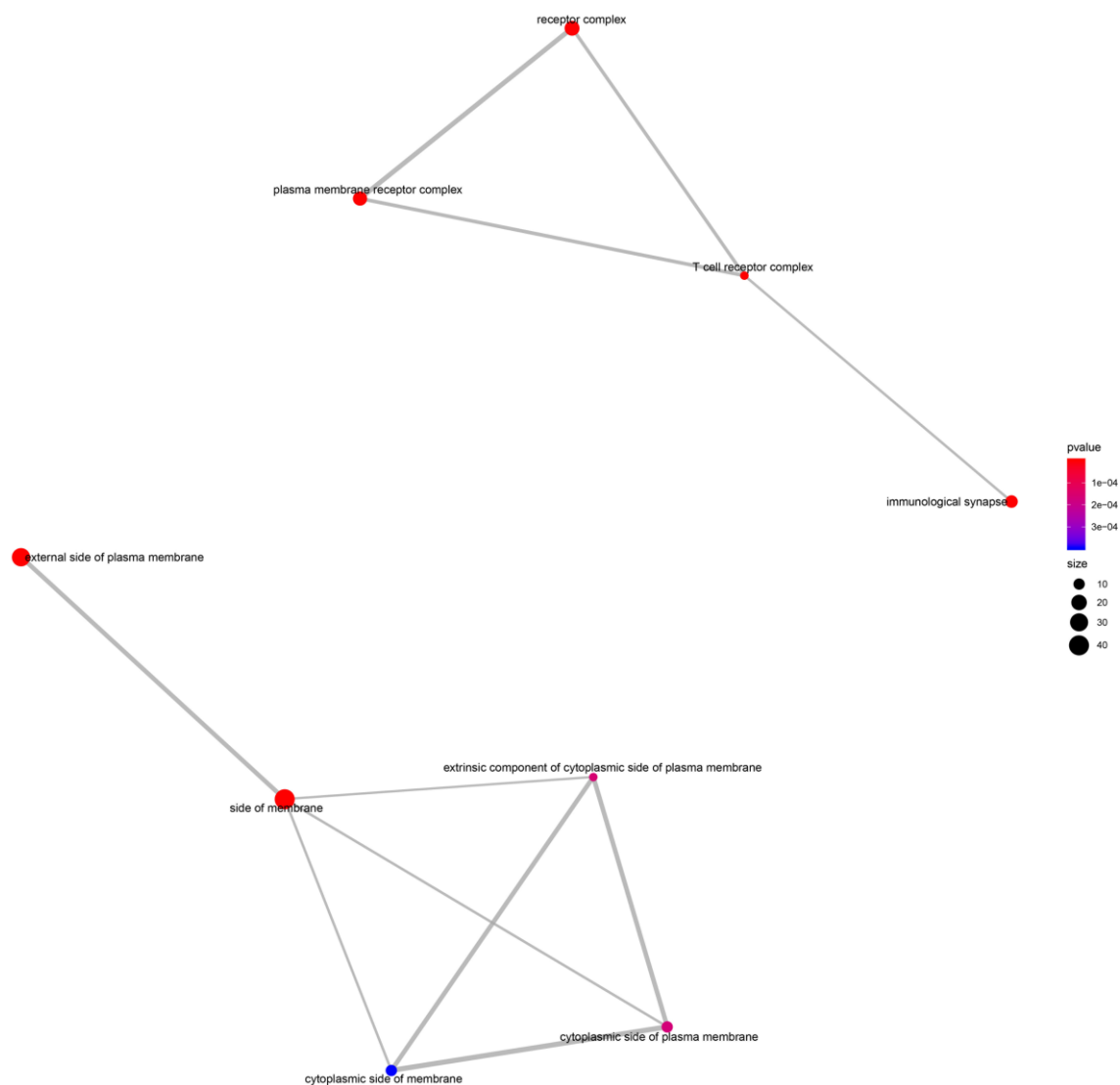


Figura suplementaria 23. Mapas de relación entre los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de componentes celulares en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con infiltrados extensos (ELI). Los términos GO más enriquecidos se representan relacionados entre sí según su similitud. El tamaño de cada nodo y su color representan el número de genes enriquecidos y el p-valor para dicho término.

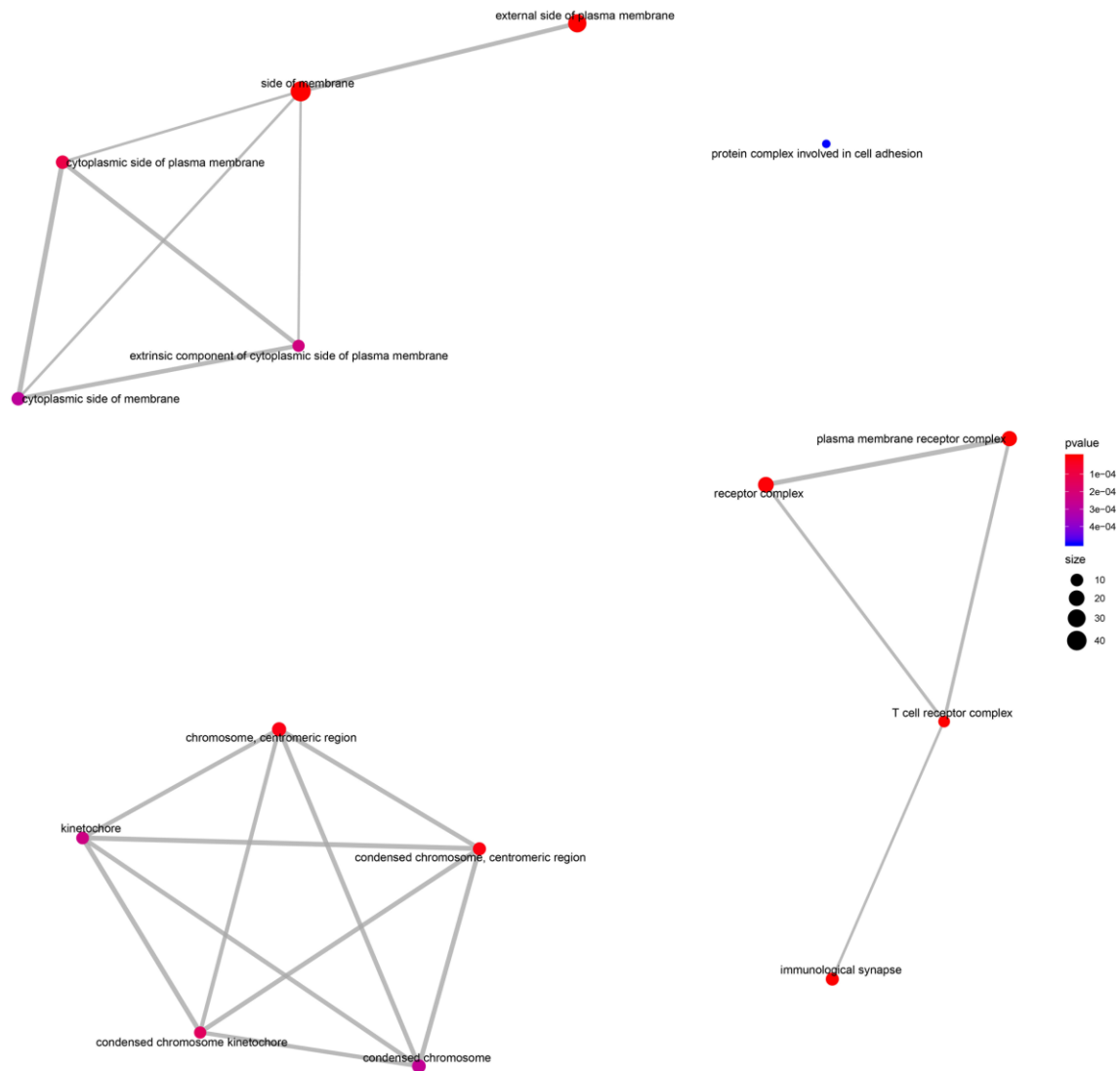


Figura suplementaria 24. Mapas de relación entre los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de componentes celulares en la comparación entre muestras de tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI) y tejidos con infiltrados extensos (ELI). Los términos GO más enriquecidos se representan relacionados entre sí según su similitud. El tamaño de cada nodo y su color representan el número de genes enriquecidos y el p-valor para dicho término.

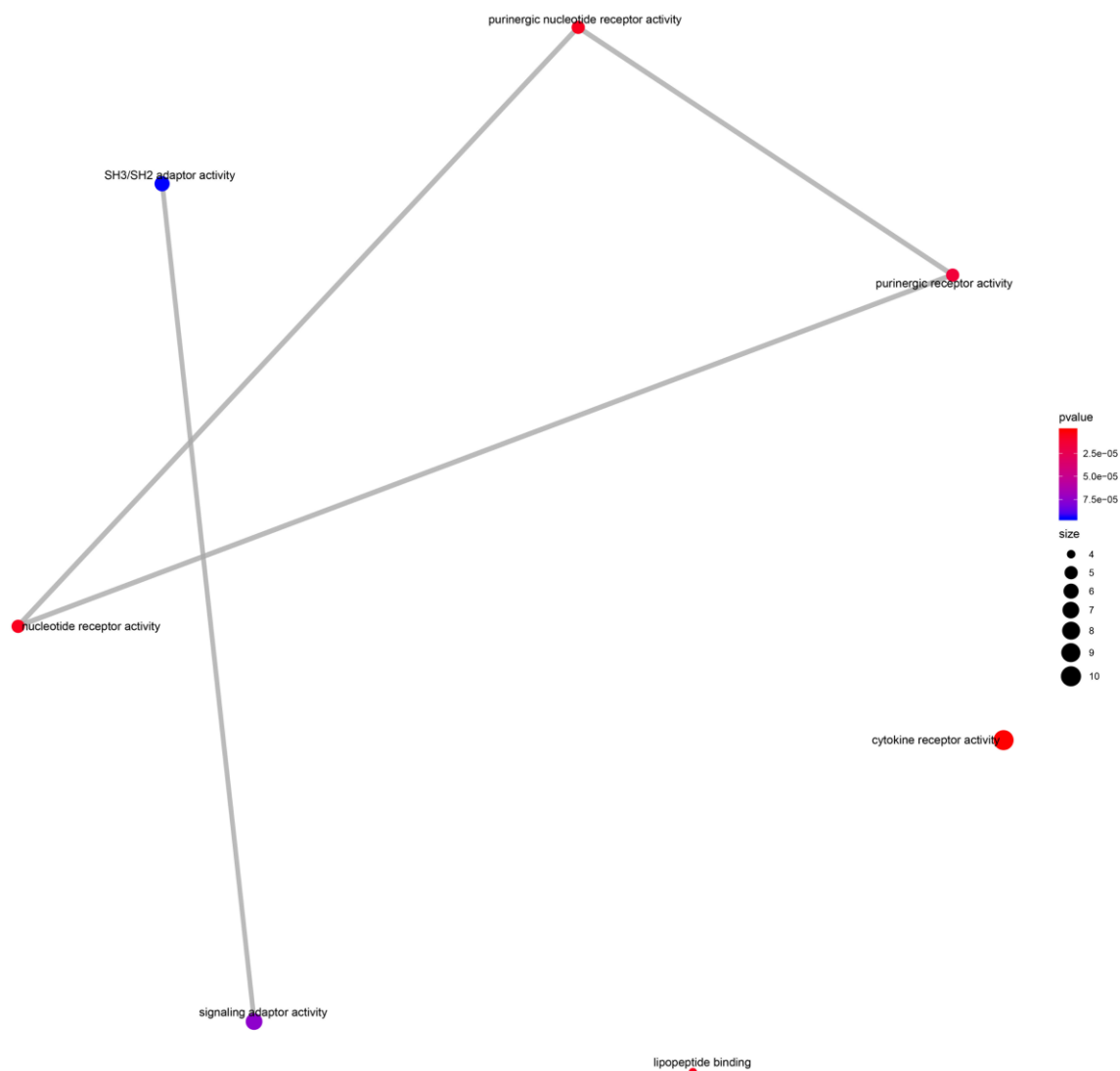


Figura suplementaria 25. Mapas de relación entre los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de funciones celulares en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI). Los términos GO más enriquecidos se representan relacionados entre sí según su similitud. El tamaño de cada nodo y su color representan el número de genes enriquecidos y el p-valor para dicho término.

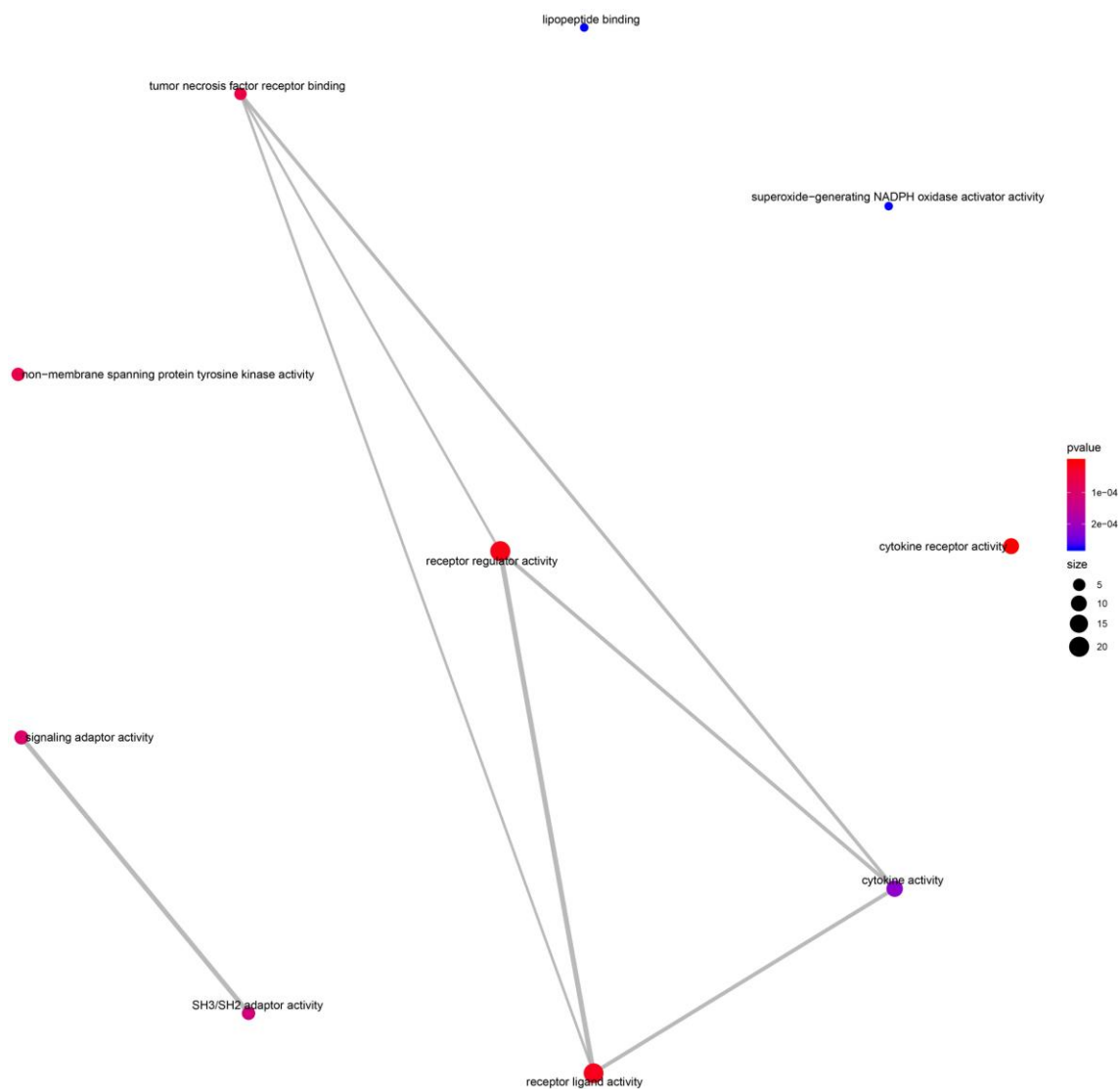


Figura suplementaria 26. Mapas de relación entre los términos de Gene Ontologys más representados para la categoría de funciones celulares en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con infiltrados extensos (ELI). Los términos GO más enriquecidos se representan relacionados entre sí según su similitud. El tamaño de cada nodo y su color representan el número de genes enriquecidos y el p-valor para dicho término.

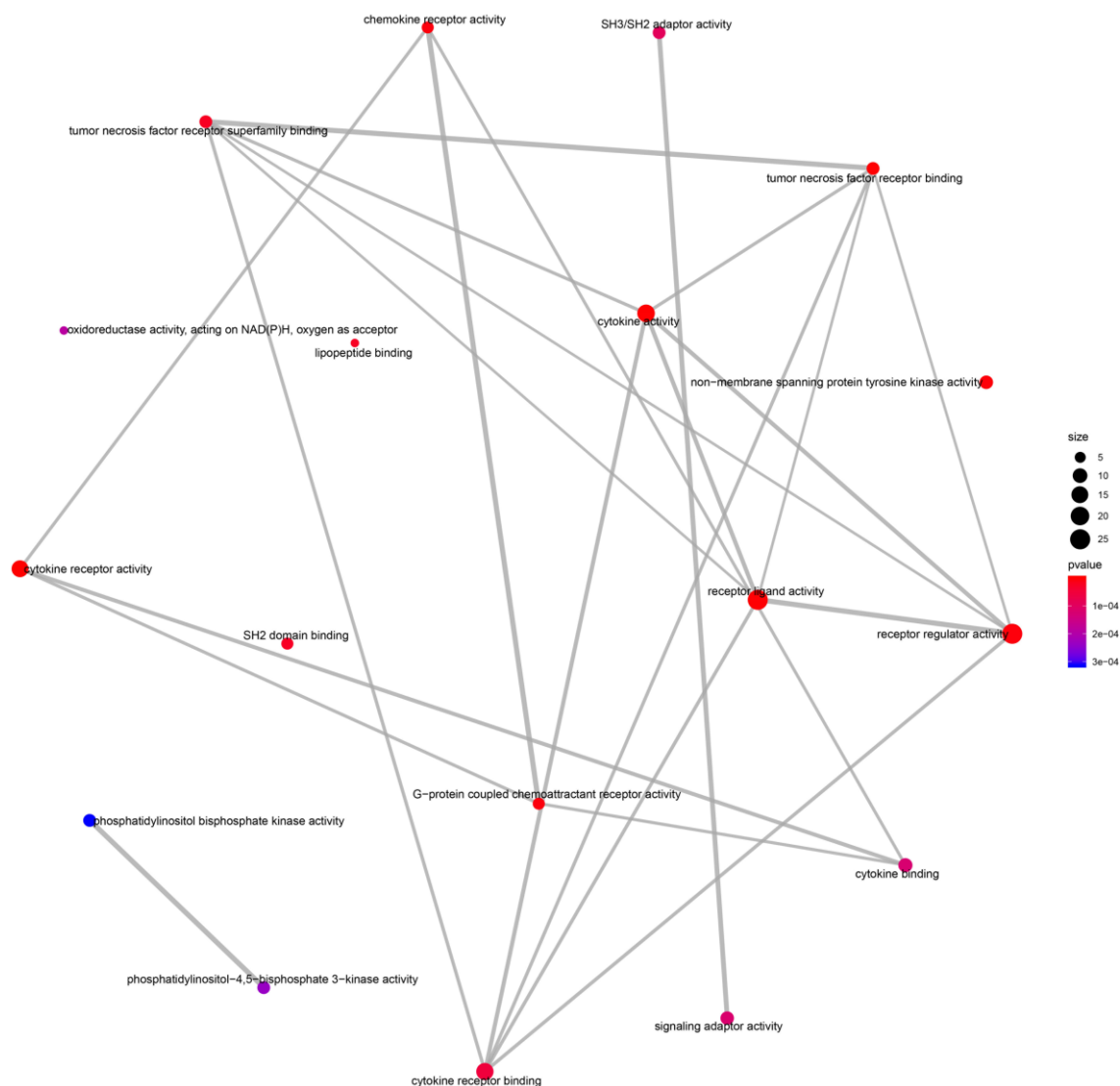


Figura suplementaria 27. Mapas de relación entre los términos de Gene Ontology más representados para la categoría de funciones celulares en la comparación entre muestras de tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI) y tejidos con infiltrados extensos (ELI). Los términos GO más enriquecidos se representan relacionados entre sí según su similitud. El tamaño de cada nodo y su color representan el número de genes enriquecidos y el p-valor para dicho término.

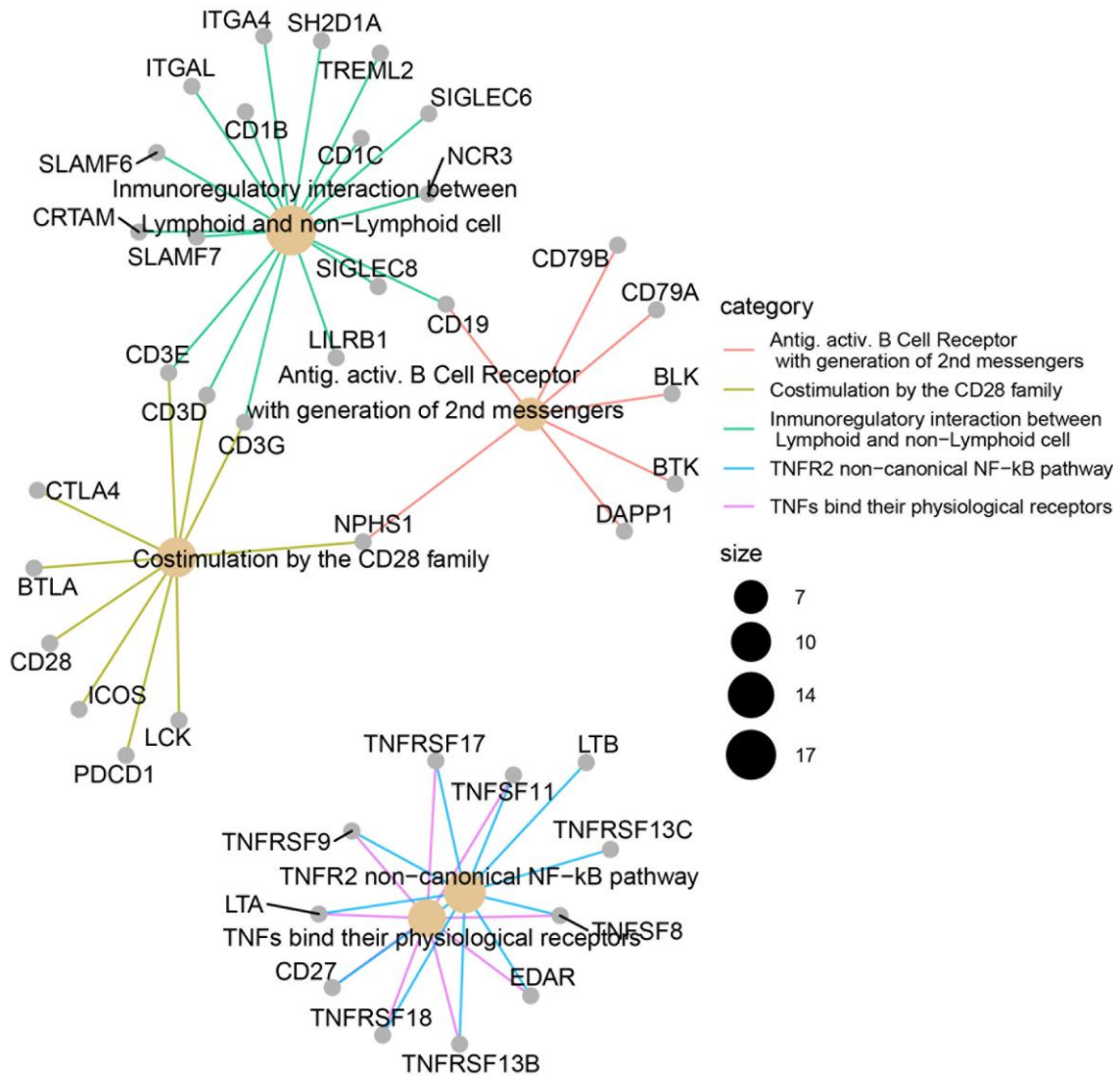


Figura suplementaria 28. Red de genes encontrados en los términos de Reactome más representados en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI). Cada gen se representa unido con los términos a los que pertenece. Los términos enriquecidos se muestran como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes que los forman y que se han encontrado diferencialmente expresados.

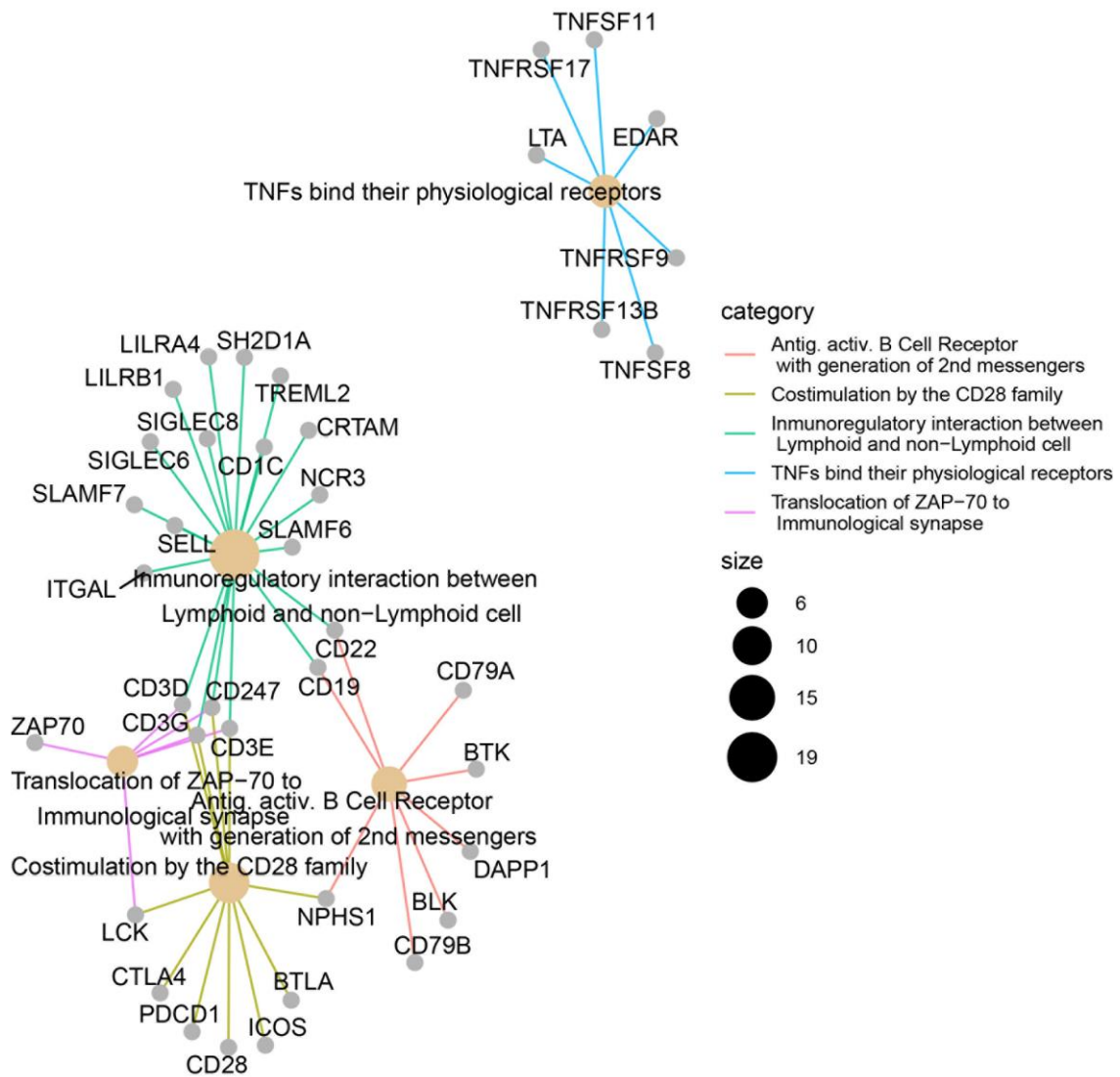


Figura suplementaria 29. Red de genes encontrados en los términos de Reactome más representados en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con infiltración extensa (ELI). Cada gen se representa unido con los términos a los que pertenece. Los términos enriquecidos se muestran como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes que los forman y que se han encontrado diferencialmente expresados.

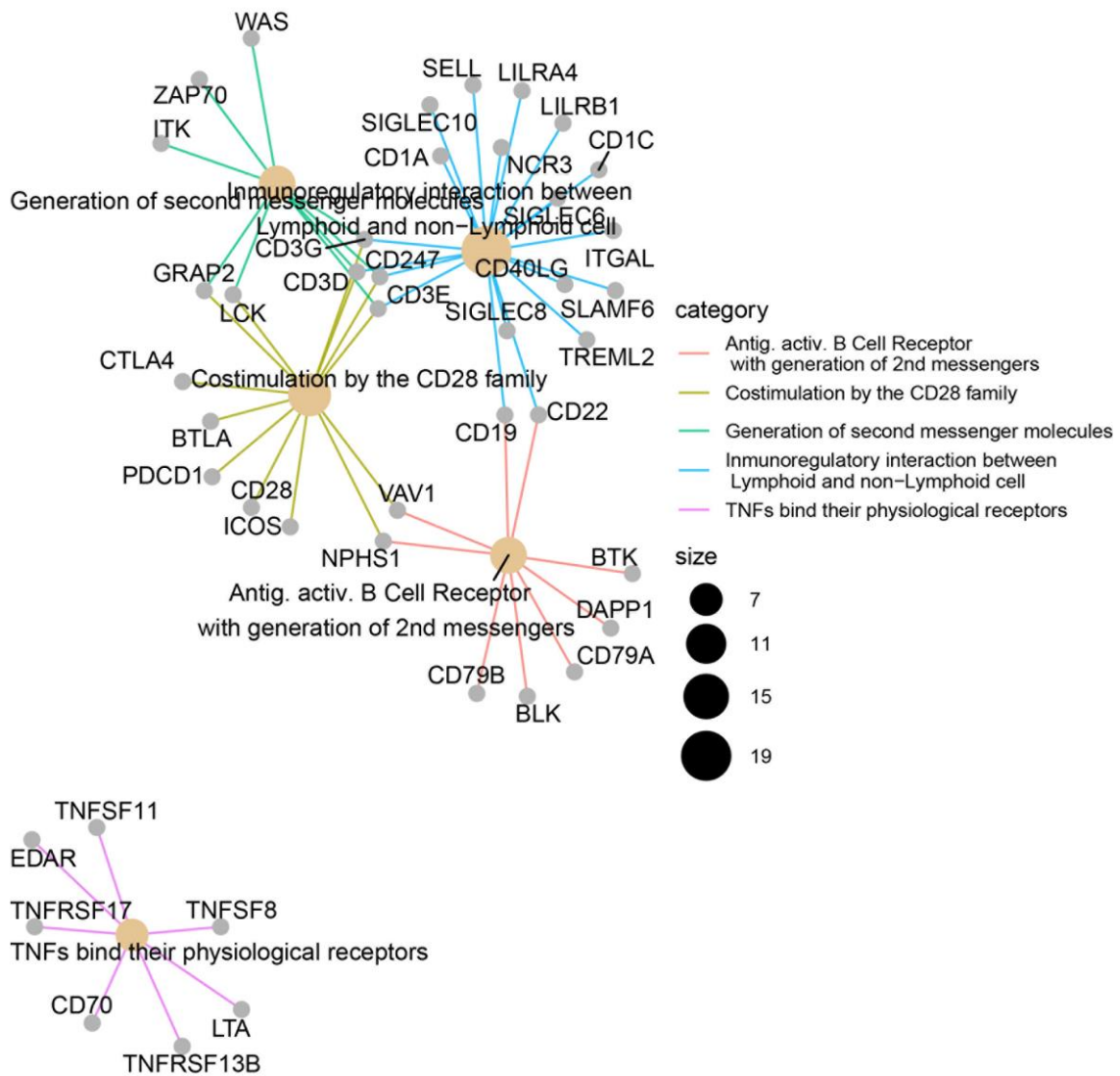


Figura suplementaria 30. Red de genes encontrados en los términos de Reactome más representados en la comparación entre muestras de tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI) y tejidos con infiltración extensa (ELI). Cada gen se representa unido con los términos a los que pertenece. Los términos enriquecidos se muestran como nodos cuyo tamaño es proporcional al número de genes que los forman y que se han encontrado diferencialmente expresados.

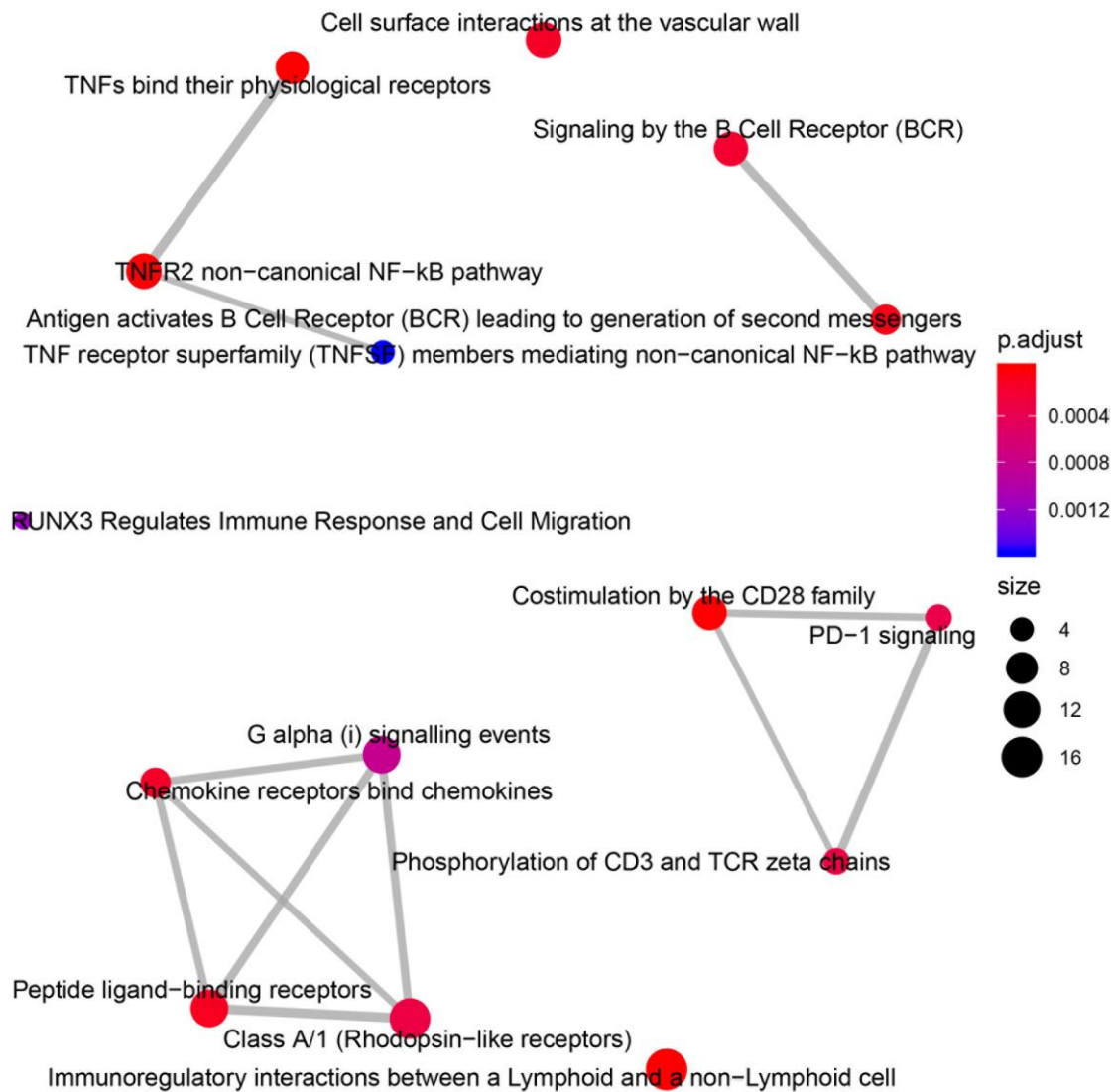


Figura suplementaria 31. Mapa de los términos de Reactome más representados en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI). Los términos se asocian en base a su similitud. El tamaño de los nodos es proporcional al número de genes encontrados para el término al que representan, y su color indica el p-valor obtenido.

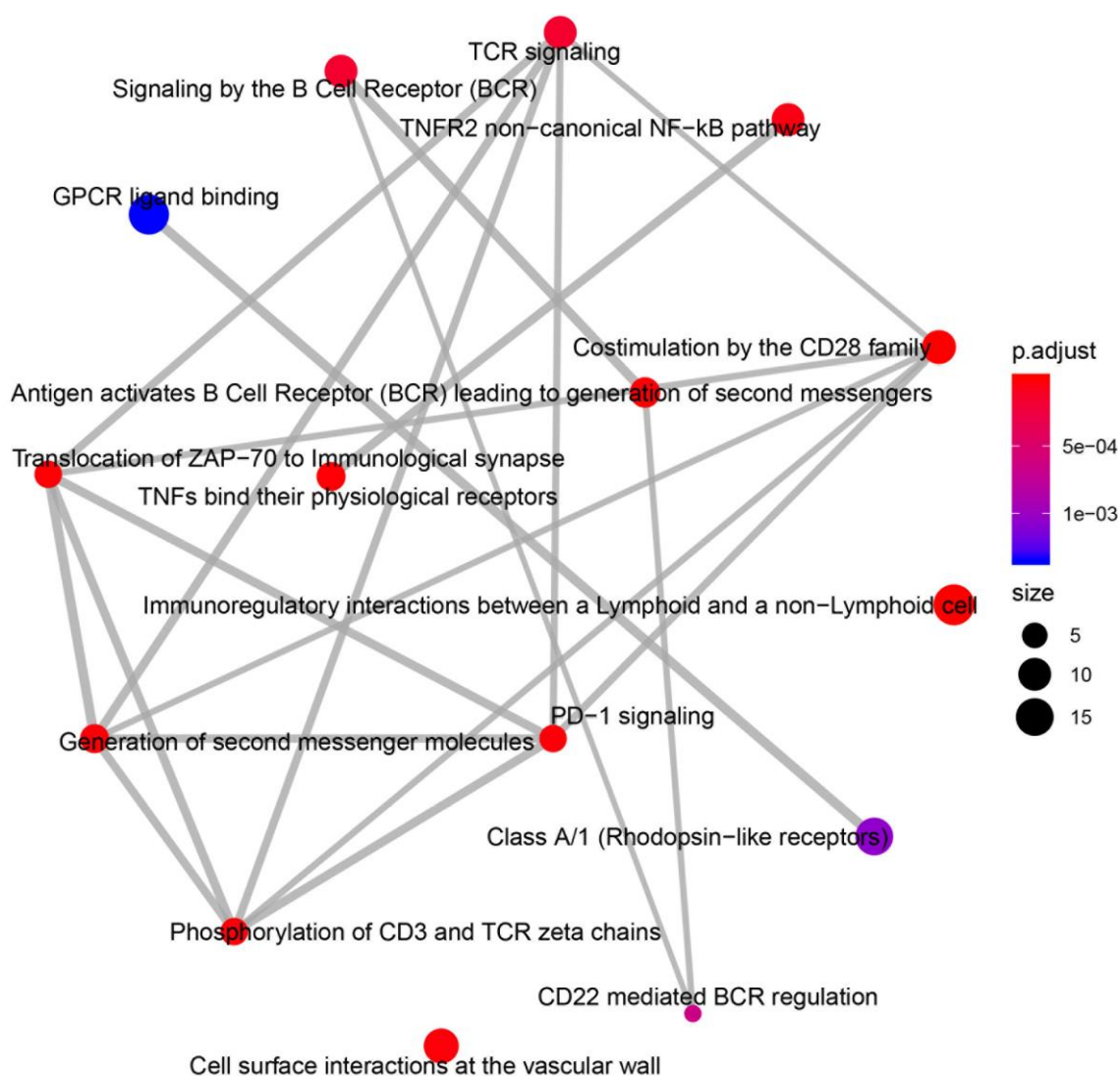


Figura suplementaria 32. Mapa de los términos de Reactome más representados en la comparación entre muestras de tejidos no infiltrados (NIT) y tejidos con infiltración extensa (ELI). El tamaño de los nodos es proporcional al número de genes encontrados para el término al que representan, y su color indica el p-valor obtenido.

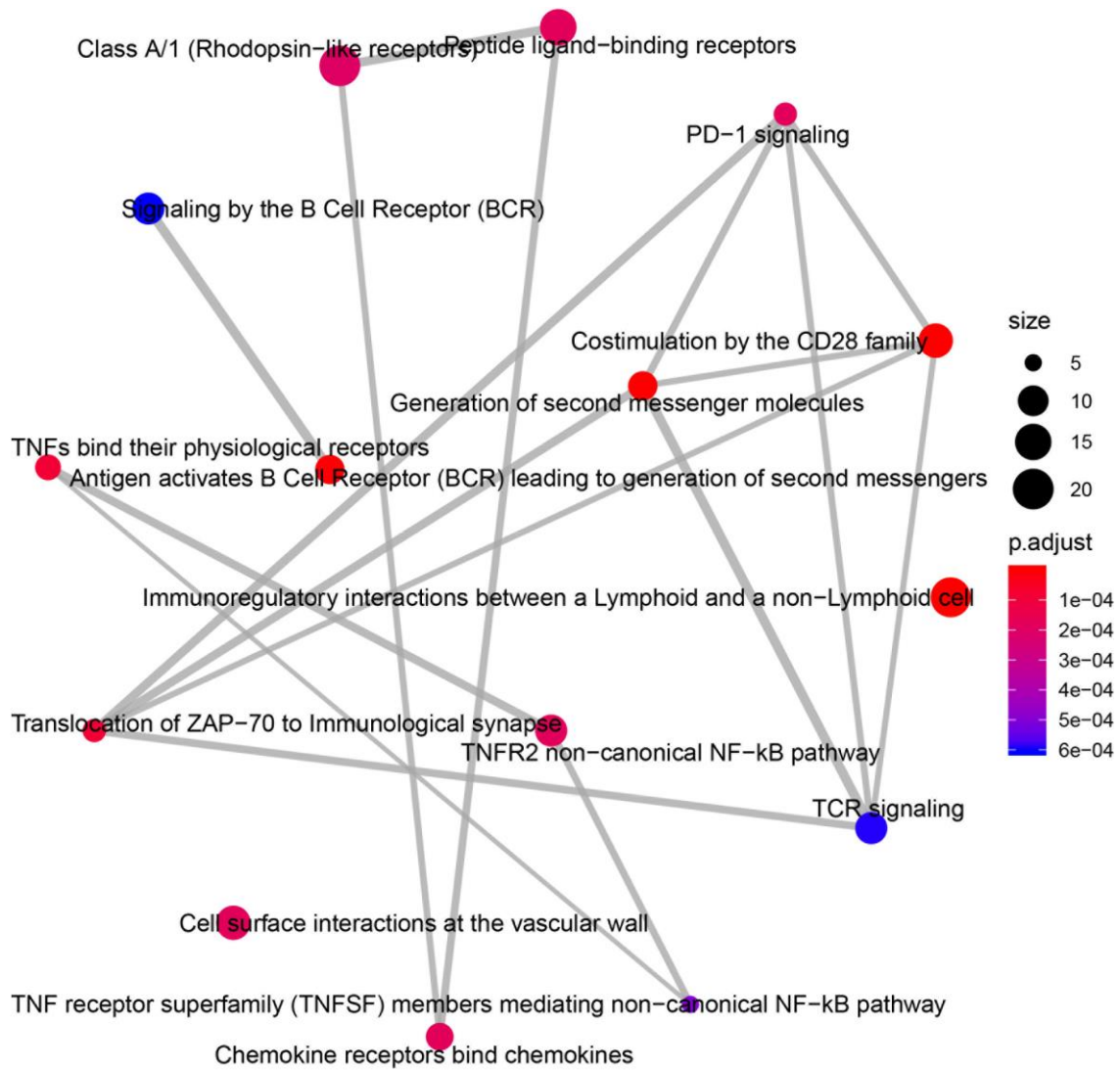


Figura suplementaria 33. Mapa de los términos de Reactome más representados en la comparación entre muestras de tejidos con pequeños infiltrados focales (SFI) y tejidos con infiltración extensa (ELI). El tamaño de los nodos es proporcional al número de genes encontrados para el término al que representan, y su color indica el p-valor obtenido.

[illegible]

Input Sample	B cells naive	B cells memory	Plasma cells	T cells CD8 naive	T cells CD4 memory resting	T cells CD4 memory activated	T cells follicular helper	T cells regulatory gamma delta	T cells NK cells resting	T cells NK cells activated	Monocytes M0	Macrophages M0	Macrophages M1	Macrophages M2	Dendritic cells resting	Dendritic cells activated	Mast cells resting	Mast cells activated	Eosinophils	Neutrophils	p-value	Pearson Correlation	BMS
UTER-13018-0028-SM-SL28H	0.048		0.052				0.075		0.084	0.011	0.06	0.038	0.185	0.181							0.587	0.016	1.099
UTER-13018-0028-SM-SL28H	0.059			0.167			0.022		0.074	0.008	0.053		0.068	0.192			0.05				0.724	-0.003	1.107
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.159				0.25		0.103		0.106	0.008	0.046	0.005	0.088	0.037			0.017				0.779	-0.008	1.093
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.146		0.037						0.125	0.05	0.027	0.025	0.1				0.095			0.055	0.716	-0.001	1.087
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.085			0.083			0.015		0.137	0.046		0.124		0.032		0.031	0.032				0.564	0.018	1.121
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.023		0.015	0.07					0.145		0.035	0.031	0.021	0.15		0.034	0.074				0.984	-0.037	1.124
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.179		0.068	0.078			0.069		0.093	0.026		0.036		0.037							0.821	-0.013	1.104
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.201			0.052	0.016				0.107	0.023	0.054		0.022	0.157		0.014	0.071				0.912	-0.023	1.105
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.062			0.041	0.013	0.199			0.143	0.06	0.015	0.063	0.018					0.018	0.095		0.829	-0.014	1.096
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.112			0.09	0.047		0.004		0.181	0.047		0.033	0.22			0.028			0.028		0.839	0.014	1.104
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.15		0.006	0.127		0.211	0.033		0.085	0.035	0.051			0.035		0.005	0.05				0.817	-0.012	1.111
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.148			0.100			0.124		0.162	0.038				0.038		0.011	0.028				0.595	0.014	1.115
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.16			0.139			0.036		0.129	0.049		0.056		0.073		0.01		0.024			0.783	-0.008	1.115
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.041			0.023	0.095				0.079	0.054				0.103		0.053	0.064				0.826	-0.013	1.130
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.136			0.243		0.049	0.091		0.079	0.018	0.053	0.012	0.026	0.036							0.678	0.004	1.136
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.058			0.206					0.163	0.008	0.078	0.072	0.056			0.013	0.038				0.752	-0.005	1.138
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.108	0.036		0.023	0.018				0.093	0.062		0.024		0.008		0.011					0.884	-0.038	1.113
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.108			0.142			0.101		0.085	0.021				0.008							0.833	0.186	1.035
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.075				0.082				0.048	0.058	0.033		0.032	0.206			0.07				0.954	-0.028	1.116
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.083			0.012	0.17		0.074		0.033	0.033	0.055		0.011	0.152		0.017	0.02				0.511	0.026	1.097
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.043			0.059		0.18	0.088		0.057	0.02	0.092		0.091			0.008					0.392	0.043	1.061
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.101			0.058		0.04	0.105		0.102	0.042						0.081					0.988	0.041	1.103
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.122						0.044		0.168	0.061				0.159		0.014	0.06				0.679	0.004	1.103
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.079			0.133		0.191	0.1		0.095	0.067						0.089					0.896	-0.020	1.103
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.126			0.086		0.261	0.021		0.157	0.047			0.020	0.234		0.061					0.929	-0.024	1.110
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.132			0.101	0.064		0.166		0.18	0.016	0.103	0.043	0.067			0.023		0.016			0.695	0.002	1.129
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.074			0.103	0.025	0.178	0.016		0.093	0.026	0.033	0.121	0.04			0.007					0.542	-0.019	1.105
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.153			0.147		0.223	0.153		0.085	0.043		0.059	0.082			0.028	0.005			0.01	0.728	-0.002	1.115
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.073			0.073		0.258	0.096		0.049	0.052	0.065		0.117	0.221							0.876	-0.017	1.112
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.148			0.072		0.017			0.106		0.011	0.122				0.018	0.066			0.07	0.677	0.004	1.096
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.036		0.051	0.028			0.148		0.037	0.104	0.077		0.046	0.109		0.06					0.572	0.017	1.096
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.06		0.014				0.06		0.093	0.01	0.077		0.04			0.011	0.077				0.972	-0.032	1.091
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.048			0.109			0.164		0.087	0.035	0.065	0.052	0.077	0.036							0.480	0.030	1.108
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.083			0.059			0.029		0.099	0.095	0.038		0.005	0.045		0.089		0.019			0.506	0.027	1.104
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.013			0.239	0.045				0.137	0.045			0.02	0.066		0.104	0.031				0.807	-0.031	1.148
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.105			0.043		0.109	0.078		0.063	0.01	0.042		0.055			0.068					0.985	-0.039	1.101
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.133			0.133		0.259	0.021		0.063	0.028		0.04		0.168		0.01					0.562	-0.012	1.105
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.084			0.087			0.106		0.093	0.042	0.041	0.037	0.094			0.044		0.01			0.691	0.003	1.125
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.118			0.163		0.12	0.178		0.087	0.06	0.057			0.004		0.051		0.031			0.772	-0.007	1.127
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.149			0.139		0.216	0.08		0.089	0.009	0.081		0.027	0.172		0.036					0.765	-0.006	1.101
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.158			0.116		0.195	0.016		0.081	0.064	0.021	0.035	0.027			0.018	0.035				0.897	-0.020	1.141
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.074			0.052		0.201	0.021		0.094	0.066		0.027	0.117	0.046						0.037	0.641	0.009	1.121
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.162			0.054		0.244	0.071		0.089	0.047		0.011	0.022			0.039		0.093			0.678	0.004	1.129
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.173			0.195		0.099			0.056	0.025	0.057		0.062			0.05					0.869	-0.017	1.091
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.201		0.162	0.11		0.165	0.179		0.059	0.005	0.02	0.011	0.028	0.025		0.035					0.399	-0.042	1.081
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.155	0.017	0.106	0.152		0.194	0.068	0.027	0.083	0.028	0.008	0.018	0.016			0.048					0.170	0.091	1.067
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.074			0.074		0.207	0.017		0.154	0.029	0.028		0.027	0.117	0.046						0.614	-0.012	1.087
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.166	0.028	0.129	0.152		0.191	0.02		0.052	0.033	0.000	0.013	0.099			0.036					0.009	-0.257	0.983
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.061			0.037	0.044				0.074	0.011	0.053	0.118	0.069	0.025		0.117	0.064		0.024		0.667	0.005	1.099
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.21			0.093			0.001	0.012	0.11	0.039	0.065	0.057	0.036	0.057		0.04					0.712	0.000	1.108
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.123			0.079	0.03		0.117		0.142	0.045	0.046	0.035	0.082			0.082					0.821	-0.013	1.123
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.179			0.067		0.133	0.127		0.104	0.04		0.044	0.019	0.018		0.014					0.614	-0.012	1.087
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.232			0.093		0.103	0.075		0.075	0.028	0.024	0.016		0.072		0.072					0.892	-0.019	1.119
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.114			0.074		0.032			0.047	0.017	0.028		0.008			0.038					0.697	0.002	1.097
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.153			0.02	0.08	0.201	0.129		0.129	0.017	0.061	0.03		0.109		0.146					0.791	-0.009	1.098
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.024					0.148	0.111		0.031	0.056	0.109		0.03			0.015	0.068				0.992	-0.047	1.102
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.052		0.042		0.043		0.093		0.107	0.018	0.044	0.02	0.012	0.166	0.008		0.001	0.076			0.797	-0.013	1.106
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.078		0.08	0.16			0.011		0.043	0.028		0.029	0.021			0.043					0.434	-0.037	1.075
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.093		0.077	0.088		0.026			0.065	0.054	0.026	0.01	0.103			0.145		0.001			0.982	-0.036	1.100
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.061			0.105	0.076	0.099			0.094	0.057		0.027		0.056		0.046					0.993	-0.049	1.116
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.197			0.028	0.204		0.017		0.107	0.018	0.044	0.02	0.012	0.029		0.02	0.066				0.758	-0.006	1.099
UTER-13030-0030-SM-SL28H	0.204			0.067	0.037		0.096		0.107														

Gene	B cells			T cells			CD4 T cells			CD8 T cells			NK cells			Macrophages			Dendritic			Mast cells			Pleural		
	cells	memory	plasma	cells	CD4	CD8	cells	CD4	CD8	cells	CD4	CD8	cells	CD4	CD8	cells	CD4	CD8	cells	CD4	CD8	cells	CD4	CD8	cells	CD4	CD8
CD4	0.032	0.03	0.075	0.032	0.03	0.075	0.032	0.03	0.075	0.032	0.03	0.075	0.032	0.03	0.075	0.032	0.03	0.075	0.032	0.03	0.075	0.032	0.03	0.075	0.032	0.03	0.075
CD8	0.041	0.027	0.065	0.041	0.027	0.065	0.041	0.027	0.065	0.041	0.027	0.065	0.041	0.027	0.065	0.041	0.027	0.065	0.041	0.027	0.065	0.041	0.027	0.065	0.041	0.027	0.065
CD4+CD8	0.141	0.051	0.097	0.141	0.051	0.097	0.141	0.051	0.097	0.141	0.051	0.097	0.141	0.051	0.097	0.141	0.051	0.097	0.141	0.051	0.097	0.141	0.051	0.097	0.141	0.051	0.097
CD4+CD8+CD45RO	0.184	0.032	0.194	0.184	0.032	0.194	0.184	0.032	0.194	0.184	0.032	0.194	0.184	0.032	0.194	0.184	0.032	0.194	0.184	0.032	0.194	0.184	0.032	0.194	0.184	0.032	0.194
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.068	0.028	0.099	0.068	0.028	0.099	0.068	0.028	0.099	0.068	0.028	0.099	0.068	0.028	0.099	0.068	0.028	0.099	0.068	0.028	0.099	0.068	0.028	0.099	0.068	0.028	0.099
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127	0.048	0.028	0.127
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.103	0.044	0.05	0.103	0.044	0.05	0.103	0.044	0.05	0.103	0.044	0.05	0.103	0.044	0.05	0.103	0.044	0.05	0.103	0.044	0.05	0.103	0.044	0.05	0.103	0.044	0.05
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.139	0.061	0.095	0.139	0.061	0.095	0.139	0.061	0.095	0.139	0.061	0.095	0.139	0.061	0.095	0.139	0.061	0.095	0.139	0.061	0.095	0.139	0.061	0.095	0.139	0.061	0.095
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.044	0.032	0.066	0.044	0.032	0.066	0.044	0.032	0.066	0.044	0.032	0.066	0.044	0.032	0.066	0.044	0.032	0.066	0.044	0.032	0.066	0.044	0.032	0.066	0.044	0.032	0.066
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.078	0.061	0.095	0.078	0.061	0.095	0.078	0.061	0.095	0.078	0.061	0.095	0.078	0.061	0.095	0.078	0.061	0.095	0.078	0.061	0.095	0.078	0.061	0.095	0.078	0.061	0.095
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.058	0.061	0.095	0.058	0.061	0.095	0.058	0.061	0.095	0.058	0.061	0.095	0.058	0.061	0.095	0.058	0.061	0.095	0.058	0.061	0.095	0.058	0.061	0.095	0.058	0.061	0.095
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.094	0.051	0.085	0.094	0.051	0.085	0.094	0.051	0.085	0.094	0.051	0.085	0.094	0.051	0.085	0.094	0.051	0.085	0.094	0.051	0.085	0.094	0.051	0.085	0.094	0.051	0.085
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.129	0.1	0.139	0.129	0.1	0.139	0.129	0.1	0.139	0.129	0.1	0.139	0.129	0.1	0.139	0.129	0.1	0.139	0.129	0.1	0.139	0.129	0.1	0.139	0.129	0.1	0.139
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.011	0.028	0.309	0.011	0.028	0.309	0.011	0.028	0.309	0.011	0.028	0.309	0.011	0.028	0.309	0.011	0.028	0.309	0.011	0.028	0.309	0.011	0.028	0.309	0.011	0.028	0.309
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.071	0.138	0.119	0.071	0.138	0.119	0.071	0.138	0.119	0.071	0.138	0.119	0.071	0.138	0.119	0.071	0.138	0.119	0.071	0.138	0.119	0.071	0.138	0.119	0.071	0.138	0.119
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.074	0.045	0.241	0.074	0.045	0.241	0.074	0.045	0.241	0.074	0.045	0.241	0.074	0.045	0.241	0.074	0.045	0.241	0.074	0.045	0.241	0.074	0.045	0.241	0.074	0.045	0.241
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.041	0.039	0.039	0.041	0.039	0.039	0.041	0.039	0.039	0.041	0.039	0.039	0.041	0.039	0.039	0.041	0.039	0.039	0.041	0.039	0.039	0.041	0.039	0.039	0.041	0.039	0.039
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.125	0.055	0.054	0.125	0.055	0.054	0.125	0.055	0.054	0.125	0.055	0.054	0.125	0.055	0.054	0.125	0.055	0.054	0.125	0.055	0.054	0.125	0.055	0.054	0.125	0.055	0.054
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.14	0.104	0.104	0.14	0.104	0.104	0.14	0.104	0.104	0.14	0.104	0.104	0.14	0.104	0.104	0.14	0.104	0.104	0.14	0.104	0.104	0.14	0.104	0.104	0.14	0.104	0.104
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.222	0.09	0.281	0.222	0.09	0.281	0.222	0.09	0.281	0.222	0.09	0.281	0.222	0.09	0.281	0.222	0.09	0.281	0.222	0.09	0.281	0.222	0.09	0.281	0.222	0.09	0.281
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.114	0.029	0.22	0.114	0.029	0.22	0.114	0.029	0.22	0.114	0.029	0.22	0.114	0.029	0.22	0.114	0.029	0.22	0.114	0.029	0.22	0.114	0.029	0.22	0.114	0.029	0.22
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.155	0.096	0.02	0.155	0.096	0.02	0.155	0.096	0.02	0.155	0.096	0.02	0.155	0.096	0.02	0.155	0.096	0.02	0.155	0.096	0.02	0.155	0.096	0.02	0.155	0.096	0.02
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.154	0.068	0.051	0.154	0.068	0.051	0.154	0.068	0.051	0.154	0.068	0.051	0.154	0.068	0.051	0.154	0.068	0.051	0.154	0.068	0.051	0.154	0.068	0.051	0.154	0.068	0.051
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.074	0.088	0.315	0.074	0.088	0.315	0.074	0.088	0.315	0.074	0.088	0.315	0.074	0.088	0.315	0.074	0.088	0.315	0.074	0.088	0.315	0.074	0.088	0.315	0.074	0.088	0.315
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.022	0.14	0.11	0.022	0.14	0.11	0.022	0.14	0.11	0.022	0.14	0.11	0.022	0.14	0.11	0.022	0.14	0.11	0.022	0.14	0.11	0.022	0.14	0.11	0.022	0.14	0.11
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.014	0.123	0.123	0.014	0.123	0.123	0.014	0.123	0.123	0.014	0.123	0.123	0.014	0.123	0.123	0.014	0.123	0.123	0.014	0.123	0.123	0.014	0.123	0.123	0.014	0.123	0.123
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.106	0.051	0.075	0.106	0.051	0.075	0.106	0.051	0.075	0.106	0.051	0.075	0.106	0.051	0.075	0.106	0.051	0.075	0.106	0.051	0.075	0.106	0.051	0.075	0.106	0.051	0.075
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.081	0.039	0.139	0.081	0.039	0.139	0.081	0.039	0.139	0.081	0.039	0.139	0.081	0.039	0.139	0.081	0.039	0.139	0.081	0.039	0.139	0.081	0.039	0.139	0.081	0.039	0.139
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.209	0.06	0.249	0.209	0.06	0.249	0.209	0.06	0.249	0.209	0.06	0.249	0.209	0.06	0.249	0.209	0.06	0.249	0.209	0.06	0.249	0.209	0.06	0.249	0.209	0.06	0.249
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.139	0.049	0.072	0.139	0.049	0.072	0.139	0.049	0.072	0.139	0.049	0.072	0.139	0.049	0.072	0.139	0.049	0.072	0.139	0.049	0.072	0.139	0.049	0.072	0.139	0.049	0.072
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.076	0.015	0.165	0.076	0.015	0.165	0.076	0.015	0.165	0.076	0.015	0.165	0.076	0.015	0.165	0.076	0.015	0.165	0.076	0.015	0.165	0.076	0.015	0.165	0.076	0.015	0.165
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.091	0.039	0.039	0.091	0.039	0.039	0.091	0.039	0.039	0.091	0.039	0.039	0.091	0.039	0.039	0.091	0.039	0.039	0.091	0.039	0.039	0.091	0.039	0.039	0.091	0.039	0.039
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.093	0.142	0.148	0.093	0.142	0.148	0.093	0.142	0.148	0.093	0.142	0.148	0.093	0.142	0.148	0.093	0.142	0.148	0.093	0.142	0.148	0.093	0.142	0.148	0.093	0.142	0.148
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.03	0.075	0.069	0.048	0.075	0.069	0.048	0.075	0.069	0.048	0.075	0.069	0.048	0.075	0.069	0.048	0.075	0.069	0.048	0.075	0.069	0.048	0.075	0.069	0.048	0.075	0.069
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.068	0.15	0.182	0.068	0.15	0.182	0.068	0.15	0.182	0.068	0.15	0.182	0.068	0.15	0.182	0.068	0.15	0.182	0.068	0.15	0.182	0.068	0.15	0.182	0.068	0.15	0.182
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.062	0.12	0.182	0.062	0.12	0.182	0.062	0.12	0.182	0.062	0.12	0.182	0.062	0.12	0.182	0.062	0.12	0.182	0.062	0.12	0.182	0.062	0.12	0.182	0.062	0.12	0.182
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.125	0.068	0.03	0.125	0.068	0.03	0.125	0.068	0.03	0.125	0.068	0.03	0.125	0.068	0.03	0.125	0.068	0.03	0.125	0.068	0.03	0.125	0.068	0.03	0.125	0.068	0.03
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.06	0.073	0.181	0.06	0.073	0.181	0.06	0.073	0.181	0.06	0.073	0.181	0.06	0.073	0.181	0.06	0.073	0.181	0.06	0.073	0.181	0.06	0.073	0.181	0.06	0.073	0.181
CD4+CD8+CD45RO+CD45RO+	0.084	0.048	0.141	0.084	0.048	0.141	0.084	0.048	0.141	0.084	0.048	0.141	0.084	0.048	0.141	0.084	0.048	0.141	0.084	0.048	0.141	0.08					

Figura suplementaria 34. Tabla de resultados obtenida tras el análisis de los datos de RNAseq en tiroides mediante Cibersort. Las poblaciones celulares identificadas por el archivo de referencia LM22 se representan por columnas, mientras que las muestras analizadas se muestran en las distintas filas de la tabla. Para cada muestra, la presencia de las distintas poblaciones celulares se representa como un valor relativo normalizado sobre 1.

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1. Listado de tejidos congelados y experimentos de inmunofluorescencia indirecta para los que fueron empleados.

Tejido	Diagnóstico	PD-1	PD-L1	PD-L2	CMTM4	CMTM6
TB-290	HT	X	X			
TB-297	BMN		X	X		
TB-299	BMN		X	X		
TB-378	GD		X	X		
TB-385	HT	X	X	X		
TB-387	BMN		X	X		
TB392	BMN		X			
TB394	GD		X			
TB395	BMN		X			
TB398	BMN		X			
TB401	BMN		X			
TB-403	GD	X	X	X		
TB-406	BMN		X	X		
TB409	BMN		X			
TB413	GD		X			
TB414	BMN		X			
TB420	BMN		X			
TB421	GD	X	X			
TB428	GD		X			
TB430	GD	X	X			
TB439	BMN		X			
TB-441	HT		X	X		
TB442	GD	X	X			
TB443	GD	X	X			
TB-444	HT	X	X	X		
TB-446	GD	X	X	X		
TB-447	HT	X	X	X		
TB-450	GD	X	X	X		
TB-452	GD		X			
TB-455	GD		X	X		
TB-456	BMN		X	X		
TB-462	BMN		X	X		
TB464	GD	X	X			
THV-58	GD		X			
THV-61	BMN		X	X		
THV-63	HT	X	X	X		
THV-68	GD	X	X	X		
THV-69	BMN		X	X		
THV-1	GD				X	X
THV-3	GD				X	X
THV-8	GD				X	X
THV-15	GD				X	X
THV-21	GD				X	X
THV-23	BMN				X	X
THV-24	BNM				X	X
THV-25	GD				X	X
THV-26	BMN				X	X
THV-30	GD				X	X
THV-33	BMN				X	X
THV-43	BMN				X	X

Tabla suplementaria 2. Listado de anticuerpos y sus diluciones empleados en los experimentos de inmunofluorescencia indirecta.

	Dilución	Clon	Compañía
Anticuerpos primarios			
CD4	1:100	RIV6	Invitrogen
CD8	1:400	MEM-31	ImmunoTools
PD-1	1:200	NAT105	Biolegend
CK (wide spectrum)	1:600	Policlonal	Dako
PD-L1	1:200	D8T4X	Cell Signaling
PD-L1	1:200	29E.2A3	Biolegend
PD-L2	1:200	MIH14	ThermoFisher
PD-L2	1:200	Policlonal	Invitrogen
TPO	1:600	A-5	Santa Cruz
CD45	1:200	F10-89-4	Abcam
HLA-DR	1:200	L243	BD
CMTM4	1:200	Policlonal	ThermoFisher
CMTM6	1:400	Policlonal	Invitrogen
Anticuerpos secundarios			
AF488 Goat anti-Mouse IgG (H+L)	1:200	Policlonal	ThermoFisher
AF488 Goat anti-Mouse IgG2a	1:100	Policlonal	ThermoFisher
Cy5 Goat anti-Mouse IgG1	1:200	Policlonal	Jackson ImmunoResearch
Rhodamine red-X Goat anti-Mouse IgG2a	1:200	Policlonal	Jackson ImmunoResearch
DyLight550 Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	1:400	Policlonal	ThermoFisher
AF594 Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	1:400	Policlonal	ThermoFisher

Tabla suplementaria 3. Contenido final de las suspensiones celulares y el medio preparados para el establecimiento del cocultivo.

		Volumen	Anti-CD3 Anti-CD28	IL-2 (Dil.1:10)	Anti-IFN γ
PBMCs S/E					
	PBMCs Sin estimular	2mL	-	-	-
	PBMCs AntiIFN γ	2mL	-	-	20 μ L
PBMCs AntiCD3/AntiCD28					
	PBMCs AntiCD3/AntiCD28 + IL-2	2mL	25 μ L	2,5uL	-
	PBMCs AntiCD3/AntiCD28 + IL-2 + AntiIFN γ	2mL	25 μ L	2,5 μ L	20 μ L
Medio sin PBMCs					
	RPMI Sin estimular	0.25mL	-	-	-
	RPMI AntiIFN γ	0.25mL	-	-	2,5 μ L
	RPMI AntiCD3/AntiCD28 + IL-2	0.25mL	3,1 μ L	0,5 μ L	-
	RPMI AntiCD3/AntiCD28 + IL-2 + AntiIFN γ	0.25mL	3,1 μ L	0,5 μ L	2,5 μ L

Tabla suplementaria 4. Anticuerpos empleados para el análisis mediante citometría de flujo en los distintos experimentos realizados en CMSPs, eLITs, CFTs y líneas celulares.

Anticuerpo	Isotipo	Fluorocromo	Clon	Compañía	Referencia
Expresión de PD-1 en CMSPs y eLITs					
CD3	Ms IgG1	Pacific blue	UCHT1	BD Pharmigen	558117
CD4	Ms IgG1	FITC	SK3	BD Bioscience	345768
CD8	Ms IgG1	PerCP	SK1	BD Biosciences	345774
CD45RA	Ms IgG2b	PE-Cy7	HI100	Biolegend	304126
CD45RO	Ms IgG2a	BV510	UCHL1	Biolegend	304246
CCR7	Rat IgG2a	PE	3D12	BD Pharmigen	552176
PD-1	Ms IgG1	APC	EH12.2H7	Biolegend	329908
Expresión de PD-L1 y PD-L2 en CFTs y líneas celulares					
PD-L1	Ms IgG2b	APC	29E.2A3	Biolegend	329708
PD-L2	Ms IgG1	APC	MIH18	Biolegend	345508
HLA clase I (A/B/C)	Ms IgG1	FITC	G46-2.6	BD Pharmigen	555552
HLA-DR	Ms IgG2a	PE	L243	BD Biosciences	347401
Control de isotipo	Ms IgG1	APC	MOPC-21	Biolegend	400122
Control de isotipo	Ms IgG2b	APC	MCP-11	Biolegend	400322
Supresión de la proliferación de CMSPs por CFTs					
CD45	Ms IgG1	PE	HI30	Biolegend	304008
CD4	Ms IgG1	PE-Cy7	SK3	BD Biosciences	557852
CD8	Ms IgG1	APC-Cy7	RPA-T8	Biolegend	301016
PD-1	Ms IgG1	BV421	EH12.2H7	Biolegend	329920
CD45	Ms IgG1	FITC	HI30	Biolegend	304006
HLA-DR	Ms IgG2a	PE	L243	Biolegend	307606
PD-L1	Ms IgG2b	APC	29E.2A3	Biolegend	329708
Control de isotipo	Ms IgG2b	APC	MCP-11	Biolegend	400322

Tabla suplementaria 5. Concentración y calidad de las muestras de RNA obtenidas de cada condición experimental en los experimentos de estimulación de líneas celulares mediante IFN γ .

Tipo celular	Concentración IFN γ	Tiempo estimulación	[RNA] ng/ μ L	A260/280	A260/230
HT93 Réplica #1	0 U/mL	24h	334	2.01	1.23
	25 U/mL		333	2	2.01
	50 U/mL		291	2.01	1.55
	100 U/mL		186	2	1.54
	0 U/mL	48h	466	2.01	1.89
	25 U/mL		373	2.02	2.17
	50 U/mL		290	2.02	2.05
	100 U/mL		291	2.02	2.00
HT93 Réplica #2	0 U/mL	24h	379	1.96	1.89
	25 U/mL		429	1.97	2.08
	50 U/mL		462	1.98	1.84
	100 U/mL		403	1.98	2.00
	0 U/mL	48h	468	2.02	1.97
	25 U/mL		372	2.02	1.97
	50 U/mL		338	1.97	1.89
	100 U/mL		477	2.01	1.89
HT93 Réplica #3	0 U/mL	24h	424	2.00	1.82
	25 U/mL		520	1.99	2.01
	50 U/mL		507	1.99	1.55
	100 U/mL		335	1.96	1.54
	0 U/mL	48h	630	1.96	1.89
	25 U/mL		370	1.95	2.17
	50 U/mL		352	2.00	2.05
	100 U/mL		433	2.02	2.00
TPC-1 Réplica #1	0 U/mL	24h	518	1.98	2.02
	25 U/mL		452	1.98	1.55
	50 U/mL		516	1.95	2.00
	100 U/mL		515	1.96	1.83
	0 U/mL	48h	381	1.97	1.76
	25 U/mL		443	1.97	1.76
	50 U/mL		461	1.96	1.74
	100 U/mL		397	1.99	1.16
TPC-1 Réplica #2	0 U/mL	24h	752	1.73	1.75
	25 U/mL		626	1.92	1.86
	50 U/mL		677	1.87	1.86
	100 U/mL		745	1.75	1.72
	0 U/mL	48h	791	1.58	1.33
	25 U/mL		600	1.9	1.28
	50 U/mL		746	1.73	1.78
	100 U/mL		677	1.86	1.78
HTH-83 Réplica #1	0 U/mL	24h	611	1.93	2.01
	25 U/mL		502	1.97	1.69
	50 U/mL		561	1.95	1.76
	100 U/mL		615	1.92	2.00
	0 U/mL	48h	723	1.79	1.85
	25 U/mL		499	1.97	2.05
	50 U/mL		336	1.99	1.36
	100 U/mL		362	1.98	2.07
TPC-1 Réplica #3	0 U/mL	24h	315	1.99	1.78
	25 U/mL		421	1.98	2.1
	50 U/mL		329	1.98	2.09
	100 U/mL		399	1.98	2.08
	0 U/mL	48h	568	1.95	1.64
	25 U/mL		652	1.9	1.29
	50 U/mL		625	1.9	1.98
	100 U/mL		675	1.86	1.85
HTH-83 Réplica #2	0 U/mL	24h	442	1.98	1.94
	25 U/mL		535	1.95	2.05
	50 U/mL		494	1.97	1.75
	100 U/mL		526	1.96	1.99
	0 U/mL	48h	602	1.93	1.97
	25 U/mL		363	1.99	2.01
	50 U/mL		421	1.98	2.12
	100 U/mL		349	1.98	2.15
HTH-83 Réplica #3	0 U/mL	24h	487	1.97	2.03
	25 U/mL		554	1.95	1.94
	50 U/mL		516	1.96	2.00
	100 U/mL		428	1.98	1.96
	0 U/mL	48h	636	1.9	1.89
	25 U/mL		312	1.97	2.07
	50 U/mL		359	1.97	1.93
	100 U/mL		301	1.98	1.88

Tabla suplementaria 6. Concentración y calidad de las muestras de RNA obtenidas de cada condición experimental en los experimentos de estimulación de cultivos primarios de CFTs mediante IFN γ .

Tipo celular	Concentración IFN γ	Tiempo estimulación	[RNA] ng/ μ L	A260/280	A260/230
THV-54 (GD)	0 U/mL	24h	158	2.00	1.93
	25 U/mL		257	1.99	1.9
	50 U/mL		223	2.00	1.65
	100 U/mL		248	2.00	1.97
	0 U/mL	48h	298	2.00	2.00
	25 U/mL		346	2.00	1.89
	50 U/mL		287	2.00	1.82
	100 U/mL		258	1.99	2.09
THV-56 (GD)	0 U/mL	24h	295	1.99	1.7
	25 U/mL		348	1.99	2.02
	50 U/mL		233	1.96	2.00
	100 U/mL		193	1.97	1.6
	0 U/mL	48h	519	1.96	1.99
	25 U/mL		513	1.96	2.04
	50 U/mL		398	1.98	2.03
	100 U/mL		476	1.97	1.99
THV-57 (BMN)	0 U/mL	24h	481	1.98	1.96
	25 U/mL		393	1.99	1.33
	50 U/mL		759	1.7	1.73
	100 U/mL		786	1.58	1.6
	0 U/mL	48h	570	1.95	1.77
	25 U/mL		504	1.97	1.92
	50 U/mL		537	1.96	1.94
	100 U/mL		431	1.99	1.98
THV-59 (BMN)	0 U/mL	24h	90	1.98	0.4
	25 U/mL		82	1.99	2.1
	50 U/mL		85	1.98	1.05
	100 U/mL		71	1.67	1.86
	0 U/mL	48h	152	1,95	2,13
	25 U/mL		96	1,98	0,48
	50 U/mL		138	1,95	1,21
	100 U/mL		132	2.00	1,89
THV-60 (BMN)	0 U/mL	24h	485	1,97	1,98
	25 U/mL		327	1,98	2,07
	50 U/mL		410	1,99	1,41
	100 U/mL		386	1,98	2,06
	0 U/mL	48h	534	1,96	1,76
	25 U/mL		411	1,98	1,32
	50 U/mL		411	1,98	1,76
	100 U/mL		427	1,97	1,93
THV-62 (BMN)	0 U/mL	24h	194	1,97	1,81
	25 U/mL		248	1,97	2,11
	50 U/mL		213	1,98	1,98
	100 U/mL		266	1,98	1,97
	0 U/mL	48h	332	1,07	1,86
	25 U/mL		462	1,96	2.00
	50 U/mL		361	1,96	1,89
	100 U/mL		354	1,97	2,08

Tabla suplementaria 7. Concentración y calidad de las muestras de RNA obtenidas de muestras de tiroides congelados para la determinación de la expresión relativa de genes de IFN tipo I y tipo II.

Tejido	Patología	[RNA] ng/μL	A260/280	A260/230
TB-387	BMN	120	1,99	1,52
TB-406	BMN	139	1,99	1,95
TB-462	BMN	196	1,99	2,01
THV-61	BMN	190	1,98	1,95
THV-69	BMN	105	1,99	1,93
TB-297	BMN	218	2,01	1,97
TB-299	BMN	222	2,00	2,00
TB-456	BMN	229	2,00	1,99
TB-414	BMN	167	1,98	1,81
TB-398	BMN	270	1,99	1,72
TB-395	BMN	103	1,96	1,5
TB-420	BMN	231	2,00	1,61
TB-392	BMN	202	1,99	2,04
TB-401	BMN	339	2,01	0,73
TB-409	BMN	128	1,97	2,04
TB-439	BMN	123	1,97	1,66
THV-68	GD	300	1,99	2,07
THV-58	GD	394	2,00	1,56
TB-446	GD	128	2,00	1,98
TB-450	GD	159	1,99	1,68
TB-452	GD	463	1,99	2,02
TB-378	GD	236	1,99	1,94
TB-403	GD	147	1,99	1,86
TB-455	GD	565	1,96	2,01
TB-430	GD	367	1,99	2,04
TB-428	GD	402	1,99	1,7
TB-442	GD	406	2,00	1,46
TB-394	GD	186	1,98	1,66
TB-413	GD	286	2,00	1,35
TB-421	GD	301	1,98	1,67
TB-443	GD	595	1,92	1,99
TB-464	GD	157	1,72	1,72
TB-441	HT	221	1,99	2,03
TB-444	HT	157	1,99	2,06
THV-63	HT	759	1,73	1,62
TB-447	HT	163	1,98	1,99
TB-385	HT	323	1,99	1,65
TB-290	HT	687	1,85	1,76

Tabla suplementaria 8. Listado de sondas empleadas para la cuantificación de la expresión relativa de distintos genes mediante qPCR.

Gen	Fluorocromo	Referencia
GAPDH	FAM-MGB	Hs_99999905_m1
HLA-DRA1	FAM-MGB	Hs_00219578_m1
CD274	FAM-MGB	Hs_00204257_m1
PDCD1LG2	FAM-MGB	Hs_00228839_m1
IFNA1	FAM-MGB	Hs_03044218_g1
IFNA4	FAM-MGB	Hs_01652742_gH
IFNB1	FAM-MGB	Hs_01077958_s1
IFNG	FAM-MGB	Hs_00989291_m1
SOCS1	FAM-MGB	Hs_00705164_s1

Tabla suplementaria 9. Cuantificación de la expresión de PD-1 en células CD4+ y CD8+ infiltrantes en secciones de tiroides mediante inmunofluorescencia.

	CV ¹	CD4+	CD4+PD-1+ (%)	OF	CD8+	CD8+PD-1+ (%)	CD4/CD8 index
GD SAMPLES							
TB-446	6	312	55.8	6	155	69	2.0
TB-450	3	178	57.3	5	185	49.2	1.0
THV-68	6	263	57.4	7	271	66.8	1.0
TB-403	5	1721	54.7	8	683	58.3	2.5
TB-443	3	40	65	4	58	65.5	0.7
TB-442	6	73	72.6	5	86	66.3	0.8
TB-430	3	27	63	4	49	65.3	0.6
TB-421	4	559	67.6	5	556	62.1	1.0
TB-464	4	21	76.2	4	20	75	1.1
Mean	4.4	354.9	63.3	5.3	229.2	64.2	1.2
SD	1.3	541.7	7.7	1.4	236.6	7.2	0.6
HT SAMPLES							
TB-441	6	1123	60.3	8	586	56.5	1.9
TB-444	5	1368	59.6	6	682	49.3	2.0
TB-447	6	760	59.3	7	819	51.4	0.9
THV-63	5	451	58.8	5	809	74.4	0.6
TB-290	3	501	51.5	4	767	53.7	0.7
Mean	5	840.6	57.9	6	732.6	57.06	1.2
SD	1.2	397.3	3.6	1.6	98.2	10.1	0.7
GD + HT SAMPLES							
Mean	4.6	528.4	61.4	5.6	409.0	61.6	1.2
SD	1.3	536.1	6.9	1.5	316.3	8.7	0.6

Tabla suplementaria 10. Anticuerpos primarios anti-PD-L1 evaluados en las pruebas preliminares.

Origen e isotipo	Compañía	Referencia
mAb Ms IgG1	Abcam	ab109052
pAb Rb IgG	Thermo Fisher	PA-20343
mAb Ms IgG2b	Biolegend	329702
mAb Rb IgG	Cell Signalling	86744S

Tabla suplementaria 11. Anticuerpos primarios anti-PD-L2 evaluados en las pruebas preliminares.

Origen e isotipo	Compañía	Referencia
pAb Rb IgG	Thermo Fisher	PA520344
mAb Ms IgG1	Abcam	ab110182

Tabla suplementaria 12. Puntuación de la expresión de PD-L1 mediante inmunofluorescencia indirecta evaluada por dos observadores independientes en tejidos de pacientes con enfermedad de Graves (EG), tiroiditis de Hashimoto (HT) y bocio multinodular (BMN).

Tejido	Observador 1	Observador 2	Puntuación media
BMN			
THV-69	0	0	0
THV-61	0	0	0
TB-406	0	1	0,5
TB-297	0	0	0
TB-299	0	0	0
TB-387	0	1	0,5
TB-456	0	0	0
TB-462	0	0	0
TB-392	0	0	0
TB-395	0	0	0
TB-398	0	0	0
TB-401	0	0	0
TB-409	1	1	1.0
TB-414	0	0	0
TB-420	1	0	0,5
TB-439	0	0	0
		Media	0,2
GD			
TB-446	1	1	1
TB-450	0	1	0,5
THV-58	1	1	1
THV-68	2	1	1,5
TB-403	1	1	1
TB-452	1	1	1
TB-378	1	1	1
TB-455	1	1	1
TB-443	1	1	1
TB-442	1	1	1
TB-430	0	0	0
TB-428	0	0	0
TB-394	0	0	0
TB-421	1	1	1
TB-413	2	1	1,5
TB-464	0	1	0,5
		Media	0,8
HT			
TB-385	2	0	1
TB-441	1	1	2
TB-444	3	3	3
TB-447	1	0	0,5
THV-63	2	2	2
TB-290	2	2	2
		Media	1,75

Tabla suplementaria 13. Genes diferencialmente expresados en las distintas comparativas realizadas según el límite del p-valor ajustado aplicado.

	SFI vs NIT	ELI vs NIT	ELI vs SFI
upRegAdj0.01	517	2810	1128
downRegAdj0.01	19	1881	2111
upRegAdj0.05	673	3548	2174
downRegAdj0.05	85	3133	2863
upRegAdj0.15	911	4412	3537
downRegAdj0.15	278	4612	3811
upRegAdj0.25	1123	4985	4454
downRegAdj0.25	514	5573	4491