

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 491**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2011 PCT/EP2011/053127**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012 WO12019786**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2011 E 11710147 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2603604**

54 Título: **Método y kit para diagnóstico y/o pronóstico de tolerancia en trasplante de hígado**

30 Prioridad:

09.08.2010 EP 10382224

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.11.2017

73 Titular/es:

**HOSPITAL CLINIC DE BARCELONA (50.0%)
C/ Villaroel, 170
08036 Barcelona, ES y
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS Y
DIGESTIVAS (CIBEREHD) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ FUEYO, ALBERTO;
LOZANO SALVATELLA, JUAN JOSÉ;
MARTÍNEZ LLORDELLA, MARC;
RIMOLA CASTELLA, ANTONI y
BOHNE, FELIX**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 643 491 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y kit para diagnóstico y/o pronóstico de tolerancia en trasplante de hígado**Campo de la invención**

La presente invención se enmarca en el campo de la medicina humana. Más específicamente, la presente invención se centra en un método y un kit para diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* del estado de tolerancia de un paciente que se va a someter a trasplante de hígado que comprende la evaluación del nivel de reservas de hierro sistémicas y/o intrahepáticas en una muestra biológica obtenida del paciente investigado y la comparación con el nivel de reservas de hierro de una muestra de referencia o con un umbral determinado previamente.

Estado de la técnica

La supervivencia a largo plazo de los injertos trasplantados depende de forma crítica de la administración a largo plazo de fármacos inmunosupresores para prevenir el rechazo del injerto. Dichos fármacos son muy eficaces para prevenir el rechazo de injerto, pero también están asociados a graves efectos secundarios, tales como nefrotoxicidad y un mayor riesgo de infecciones oportunistas y tumores, así como complicaciones metabólicas, como diabetes, hiperlipidemia e hipertensión arterial. Dados los efectos secundarios de los fármacos inmunosupresores, la inducción de tolerancia definida como un estado en el cual el injerto mantiene la función normal en ausencia de inmunosupresión crónica constituye una de las metas principales de investigación en la inmunología de trasplante. La inducción de tolerancia es posible en un gran número de modelos experimentales de trasplante en roedores. No obstante, la aplicación de dichos tratamientos experimentales en el ámbito clínico ha fracasado en gran medida. Una de las razones del fracaso de la aplicación clínica de tratamientos experimentales de inducción de tolerancia en seres humanos tiene que ver con la falta de una herramienta de precisión para diagnosticar la tolerancia de forma no invasiva en los receptores del trasplante humanos. Las últimas publicaciones señalan la urgente necesidad de contar con dicha herramienta (N. Najafian et al 2006 and Newell et al. 2006). Por otra parte, se ha notificado en ocasiones el mantenimiento de la función del aloinjerto normal pese a la completa interrupción de todos los fármacos inmunosupresores en trasplante de órganos a nivel clínico, en particular, tras el trasplante de hígado. Los pacientes que aceptan espontáneamente los injertos se consideran convencionalmente tolerantes "operativamente" y proporcionan una prueba conceptual de que se puede conseguir realmente la tolerancia inmunológica en los seres humanos. El trasplante de hígado es la única situación clínica en la que tiene lugar espontáneamente la tolerancia en una proporción sustancial de los pacientes. De hecho, se puede conseguir retirar completamente la inmunosupresión en aproximadamente un 21 % de los pacientes (Lerut, J. et al 2006). Lamentablemente, actualmente no existe ningún medio para identificar a estos pacientes antes de tratar de retirar la inmunosupresión. Por esta razón, rara vez se intenta interrumpir completamente la inmunosupresión en el trasplante de hígado y, por tanto, muchos pacientes continúan con una inmunosupresión innecesaria, con los problemas para la salud y económicos que ello conlleva.

Las tentativas anteriores para identificar la tolerancia en trasplante, sobre todo en receptores de riñón y de hígado, han recurrido a ensayos funcionales específicos de antígeno o a pruebas no específicas de antígeno. En los ensayos funcionales, se desafía los linfocitos T del receptor con antígenos donadores ya sea *in vitro* o *in vivo* (J. Cai et al 2004), (J. Cai et al 2004) y (E. Jankowska- Gan E et al 2002), (P. Sagoo et al. 2010). Estos ensayos son muy valiosos desde el punto de vista mecánico, ya que se trata de las únicas pruebas capaces de revelar qué rutas son las responsables de la especificidad del estado de tolerancia. Lamentablemente, estos ensayos resultan difíciles de realizar, varían enormemente de un laboratorio a otro (resulta difícil la normalización) y requieren la disponibilidad de células de donador criopreservadas cuidadosamente. Por estas razones, los ensayos funcionales no son los óptimos para una aplicación clínica a gran escala y, hoy por hoy, se emplean únicamente en determinados laboratorios muy especializados y básicamente con fines de investigación.

Las pruebas de control inmune no específicas de antígeno constituyen una variedad de las metodologías dirigidas a la caracterización fenotípica del sistema inmune del receptor sin la utilización de desafíos de antígeno del donador. Entre estas pruebas, se han empleado para identificar biomarcadores característicos de tolerancia en humanos el estudio de los patrones de distribución de la longitud de CDR3 del receptor de linfocitos T (TcLandscape), la inmunofenotipificación de glóbulos de la sangre por citometría de flujo y la elaboración de perfiles de expresión génica. Se ha empleado la técnica TcLandscape en sangre periférica para discriminar entre receptores de riñón tolerantes y receptores que experimentan rechazo crónico. (S. Brouard et al. 2005). Sin embargo, esta técnica es cara, hoy por hoy solamente está disponible en un laboratorio (Inserm 643 and TcLand Expression en Nantes, Francia), y no se ha validado nunca en trasplante de hígado. La inmunofenotipificación de sangre periférica ha sido utilizada con muestras de sangre periférica de receptores de trasplante tolerantes tanto de hígado como de riñón. Los autores de la invención conocen al menos cuatro de los estudios que abordan esta metodología. En el primero de ellos, de la universidad de Pittsburgh en Estados Unidos (G.V. Mazariegos et al 2003), se afirma que la relación entre subconjuntos de células dendríticas pDC y mDC podría servir para discriminar entre receptores tolerantes y no tolerantes en trasplante de hígado pediátrico. En el segundo estudio, de Kioto (Y. Li et al 2004), se afirma que una mayor relación entre linfocitos T delta-1 y delta-2-gamma-delta en la sangre periférica es más frecuente en

receptores de hígado tolerantes que en los no tolerantes. En el tercer estudio, coordinado por los autores de la invención (Martínez-Llordella et al 2007), se observó un mayor número de linfocitos T CD4⁺CD25⁺ y una mayor relación de linfocitos T delta-1 a delta-2-gamma-delta en la sangre periférica de receptores de hígado tolerantes en comparación con los receptores no tolerantes. Sin embargo, en un estudio posterior realizado por el mismo grupo, se cuestionó el valor de la relación entre delta-1 y delta-2-gamma-delta (Puig-Pey et al. Transplant Int 2010). Además, ninguna de estas pruebas ofrece la precisión que requiere una aplicación clínica a gran escala. Las técnicas de elaboración de perfil de expresión génica para identificar biomarcadores de tolerancia se han empleado tanto en trasplante de riñón como de hígado (S.Brouard et al. PNAS 2007; M. Martínez-Llordella et al. J Clin. Invest 2008; K.Newell et al. J Clin Invest 2010; P.Sagoo et al. , J Clin Invest 2010). Estas técnicas son más fáciles de normalizar que las pruebas antes descritas. Asimismo, los estudios a los que se ha hecho referencia han demostrado que el uso de los biomarcadores de transcripción identificados constituyen un medio enormemente preciso para diferenciar entre receptores tolerantes en los que se han retirado los fármacos inmunosupresores y los receptores no tolerantes que requieren el mantenimiento de inmunosupresión. La principal limitación de los estudios publicados en la bibliografía hasta el momento es que no han tratado de validar sus resultados prospectivamente. Es decir, no han sido capaces de demostrar si estos biomarcadores pueden identificar o no receptores tolerantes antes de interrumpir la inmunosupresión. No habiéndose demostrado, no es posible tener la certeza de que las diferencias observadas en la expresión génica no deriven en realidad del efecto de la inmunosupresión farmacológica en el grupo de receptores no tolerantes. Asimismo, ninguno de los estudios anteriores a los que se ha hecho referencia ha intentado investigar si existen también o no estas diferencias en la expresión génica al nivel del propio injerto. Se ha sometido a ensayo el cese completo de la terapia inmunosupresora (IS) en 104 receptores de trasplante de hígado, considerados tolerantes (TOL) y que presentan patrones de expresión génica de glóbulos específicos. El estudio de elaboración del perfil molecular del genoma completo llevado a cabo en tejido de aloinjerto recogido de receptores de trasplante humano tolerantes ha revelado un patrón de expresión génica de aloinjerto de hígado anteriormente desconocido que indica un papel de los genes relacionados con el metabolismo del hierro en la patogénesis de tolerancia operativa en trasplante de hígado clínico (F. Bohne et al. Transplantation 2010). Se ha divulgado un método de diagnóstico o pronóstico *in vitro* para la evaluación del estado tolerante de un paciente sometido a un trasplante de hígado. La elaboración del perfil de transcripción de sangre periférica se puede emplear para identificar receptores de trasplante de hígado que pueden interrumpir la terapia inmunosupresora y que las células inmunes innatas desempeñan probablemente un papel principal en el mantenimiento de la tolerancia operativa en trasplante de hígado (A. Sánchez-Fueyo WO2010/000320).

Aunque el uso crónico de fármacos inmunosupresores es hoy en día el único medio para asegurar la supervivencia a largo plazo de aloinjertos trasplantados, estos fármacos son caros y están asociados a graves efectos secundarios (nefrotoxicidad, desarrollo de tumor e infección, diabetes, complicaciones cardiovasculares, etc.) que conducen a una sustancial morbilidad y mortalidad. Por lo tanto, cualquier estrategia que sea capaz de reducir significativamente el uso de fármacos inmunosupresores en trasplante puede tener un gran impacto en la salud y la calidad de vida de los receptores de trasplante.

Como conclusión, el hecho de proporcionar un método validado capaz de predecir la tolerancia en pacientes de trasplante de hígado y, por tanto, capaz de indicar que se puede dispensar a dichos pacientes de la administración de fármacos inmunosupresores sigue siendo un reto.

Descripción de la invención

Por lo tanto, la presente invención tiene como objeto resolver los problemas mencionados proporcionando un método *in vitro* para identificar a los receptores de trasplante de hígado tolerantes evaluando el nivel de reservas de hierro sistémicas y/o intrahepáticas en una muestra biológica obtenida del paciente investigado y comparándolos con el nivel de reservas de hierro de una muestra de referencia o con un umbral determinado previamente. Esto se fundamenta en el hecho de que los niveles de reservas de hierro sistémicas y/o intrahepáticas (la cantidad total de hierro presente en el organismo, ya sea como hierro libre o unido a proteínas como transferrina o ferritina) son significativamente más altos en receptores de trasplante de hígado tolerantes que en los receptores de trasplante de hígado no tolerantes.

En una realización preferente de la invención, la evaluación del nivel de reservas de hierro sistémicas y/o intrahepáticas se lleva a cabo por medio de la evaluación, en la biopsia de hígado del paciente investigado, del perfil de expresión de un grupo de genes específico directamente relacionado con el metabolismo del hierro, que son biomarcadores fiables capaces de predecir la tolerancia en pacientes de trasplante de hígado. Por lo tanto, a fin de identificar los genes que presentan una diferencia estadísticamente significativa en los perfiles del nivel de expresión entre receptores de hígado que pueden interrumpir la terapia inmunosupresora (tolerantes) y los que deben mantener los fármacos inmunosupresores (no tolerantes), se recogieron muestras de tejido de hígado para biopsia de un grupo de receptores de trasplante de hígado estables, en los que se mantenía la terapia de inmunosupresión, que fueron reclutados en un ensayo clínico prospectivo de retirada de fármaco inmunosupresor.

El perfil de expresión se puede determinar a través de cualquier tecnología conocida entre las personas especializadas en la técnica. En particular, se puede medir cada nivel de expresión génica al nivel genómico y/o nucleico y/o proteínico. En una realización preferente, el perfil de expresión se determina midiendo la cantidad de

transcritos de ácido nucleico de cada gen. En otra realización, el perfil de expresión se determina midiendo la cantidad de proteína producida por cada uno de los genes.

La cantidad de transcritos de ácido nucleico se puede medir a través de cualquiera de las tecnologías conocidas entre las personas especializadas en la técnica. En particular, se puede llevar a cabo la medición directamente sobre una muestra extraída de ARN mensajero (ARNm) o en ADN complementario (ADNc) retrotranscrito preparado desde ARNm extraído a través de tecnologías muy conocidas en la técnica. A partir de la muestra de ARNm o ADNc, se puede medir la cantidad de transcritos de ácido nucleico utilizando cualquier tecnología conocida entre las personas especializadas en la técnica, incluyendo micromatrices de ácidos nucleicos, PCR cuantitativa e hibridación con una sonda etiquetada.

En una realización en particular, que no se ha de considerar como una realización que limite el ámbito de la invención, se llevó a cabo la determinación del perfil de expresión de estas biopsias utilizando micromatrices de expresión de genoma completo Beadchip de Illumina que identificaron genes con un valor $p < 0,01$ y una tasa de descubrimientos falsos (FDR) $< 25\%$ (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de genes expresados diferencialmente entre muestras de biopsias de hígado tolerantes y no tolerantes

	Gen	Referencia de secuencia (Ref. Sec.) NCBI	FDR	valor p
20	TFRC	No Anotación	0	1,19E-005
	LOC644037	XR_017337	0	2,13E-005
	LOC729266	XM_001721977	10,01418211	4,50E-006
	ST7OT1	NR_002330	10,01418211	9,12E-006
	MYO19	NM_001033580	10,01418211	1,16E-005
25	TP53I3	NM_004881	10,01418211	0,000143629
	HAMP	NM_021175	10,01418211	0,001152774
	MCOLN1	NM_020533	15,02127316	3,52E-005
	OTUD7A	NM_130901	15,02127316	4,21E-005
	EXT2	NM_000401	15,02127316	7,92E-005
30	KLHL28	NM_017658	15,02127316	0,000219206
	UHMK1	NM_175866	15,02127316	0,000252044
	FIGF	NM_004469	15,02127316	0,000482129
	SLC1A7	NM_006671	15,02127316	0,000917616
	ADORA3	NM_020683	15,02127316	0,001104349
35	SLC5A12	NM_178498	15,02127316	0,001594655
	TAF15	NM_139215	15,02127316	0,001995782
	TPPP3	NM_016140	16,89893231	2,00E-005
	TAGLN	NM_001001522	16,89893231	2,71E-005
	NFKBIL2	NM_013432	16,89893231	3,36E-005
40	OR2C3	NM_198074	16,89893231	0,000221256
	UNG	NM_080911	16,89893231	0,000297046
	GHSR	NM_004122	16,89893231	0,000320149
	KRTAP5-10	NM_001012710	16,89893231	0,000411491
	UNC13A	NM_001080421	16,89893231	0,000434094
45	G3BP1	NM_198395	23,05590765	0,000139785
	ANKRD5	NM_022096	23,05590765	0,000181261
	RBM23	NM_018107	23,05590765	0,000181688
	RAG2	NM_000536	23,05590765	0,000191286
	TUBA8	NM_018943	23,05590765	0,000201266
50	DGKK	NM_001013742	23,05590765	0,000210462
	C1orf61	NM_006365	23,05590765	0,000286859
	ADSSL1	NM_199165	23,05590765	0,0004024
	FBXL4	NM_012160	23,05590765	0,000406323
	VAC14	NM_018052	23,05590765	0,000426174
55	LOC643668	XR_039201	23,05590765	0,000427565
	RNASE13	NM_001012264	23,05590765	0,000451496
	SAGE1	NM_018666	23,05590765	0,000474797
	RTP2	NM_001004312	23,05590765	0,000516765
	SYNE2	NM_182910	23,05590765	0,00052836
60	TSPAN2	NM_005725	23,05590765	0,000583719
	SCRG1	NM_007281	23,05590765	0,000676665
	ACSL1	NM_001995	23,05590765	0,000734359
	STRN4	NM_013403	23,05590765	0,000767142
	TUBA4A	NM_006000	23,05590765	0,000924509
65	RIBC1	NM_144968	23,05590765	0,000965443

(continuación)

	Gen	Referencia de secuencia (Ref, Sec,) NCBI	FDR	valor p
	<i>MCHR1</i>	NM_005297	23,05590765	0,00099149
	<i>MUTED</i>	NM_201280	23,05590765	0,001028448
5	<i>TANK</i>	NM_004180	23,05590765	0,001031594
	<i>DPP4</i>	NM_001935	23,05590765	0,001174649
	<i>CHD3</i>	NM_001005271	23,05590765	0,00129579
	<i>KLK15</i>	NM_017509	23,05590765	0,00133
	<i>NFIX</i>	NM_002501	23,05590765	0,001358456
10	<i>FAM3B</i>	NM_206964	23,05590765	0,001386029
	<i>DOC2A</i>	NM_003586	23,05590765	0,001388434
	<i>NQO2</i>	NM_000904	23,05590765	0,001470921
	<i>KIAA1143</i>	NM_020696	23,05590765	0,001478818
	<i>PLCD3</i>	NM_133373	23,05590765	0,001551069
15	<i>PLXNA4</i>	NM_181775	23,05590765	0,001589304
	<i>ADAMTS3</i>	NM_014243	23,05590765	0,001589498
	<i>ABAT</i>	NM_001127448	23,05590765	0,001742645
	<i>POF1B</i>	NM_024921	23,05590765	0,001746171
	<i>CYP2W1</i>	NM_017781	23,05590765	0,001815383
20	<i>HSPA1A</i>	NM_005345	23,05590765	0,002150872
	<i>FAM162A</i>	NM_014367	23,05590765	0,002262613
	<i>KIAA1274</i>	NM_014431	23,05590765	0,002458413
	<i>CP</i>	NM_000096	23,05590765	0,002664451
	<i>OR5A2</i>	NM_001001954	23,05590765	0,002806537
25	<i>C9orf127</i>	NM_001042589	23,05590765	0,003069775
	<i>AMPD2</i>	NM_203404	23,05590765	0,004156098
	<i>KRT19</i>	NM_002276	23,05590765	0,006219448
	<i>ATP1B1</i>	NM_001677	23,05590765	0,006336133
	<i>C20orf71</i>	NM_178466	24,92892142	0,001022188
30	<i>LTBP4</i>	NM_001042544	24,92892142	0,00131758
	<i>CNTNAP1</i>	NM_003632	24,92892142	0,002377442
	<i>FNDC3A</i>	NM_014923	24,92892142	0,00241448
	<i>ZNF665</i>	NM_024733	24,92892142	0,00332211

35 Sobre la base de los resultados de la micromatriz y una serie de estudios llevados a cabo en modelos de animales experimentales de tolerancia inmunológica, se seleccionó un conjunto de 104 genes (enumerados en la **Tabla 2**) para validación empleando PCR en tiempo real cuantitativa.

Tabla 2. Lista de genes analizados por PCR en tiempo real

	Gen	ID Gen NCBI	Nombre	Criterios de selección
40	<i>18S</i>	100008588	ARNr 18S Eucariota	HK
	<i>TP53I3</i>	9540 t	proteína tumor p53 proteína inducible 3	M
	<i>HAMP</i>	57817	péptido antimicrobiano hepcidina	M
	<i>SAGE1</i>	55511	antígeno de sarcoma 1	M
45	<i>DPP4</i>	1803	dipeptidil-peptidasa 4	M
	<i>MYO19</i>	80179	miosina XIX	M
	<i>MCOLN1</i>	57192	mucopolipina 1	M
	<i>ACSL1</i>	2180	miembro 1 de la familia de cadena larga acil-CoA sintetasa	M
	<i>UNG</i>	7374	uracil-ADN glucosilasa	M
50	<i>TFRC</i>	7037	receptor de transferrina (p90, CD71)	M
	<i>TUBA4A</i>	7277	tubulina, alfa 4a	M
	<i>COG5</i>	10466	componente de complejo oligomérico golgi 5	M
	<i>FAM162A</i>	26355	familia con similitud de secuencia 162, miembro A	PK
	<i>FKBP1A</i>	2280	FK506 proteína de unión 1A, 12kDa	PK
55	<i>ABAT</i>	18	4-aminobutirato aminotransferasa	M
	<i>CP</i>	1356	ceruloplasmina (ferroxidasa)	PK
	<i>HLA-E</i>	3133	complejo de histocompatibilidad mayor, clase I, E	PK
	<i>CXCR7</i>	57007	receptor 7 de quimioquina (motivo C-X-C)	PK
	<i>SRGN</i>	5552	serglicina	PK
60	<i>PRF1</i>	5551	perforina 1 (proteína de formación de poro)	PK
	<i>TLR8</i>	51311	receptor tipo toll 8	PK
	<i>STAT1</i>	6772	trasductor de señal y activador de transcripción 1	PK
	<i>IL18BP</i>	10068	proteína de unión interleuquina 18	PK
	<i>PSMB9</i>	5698	proteasoma (prosome, macropaina) subunidad 9	PK
65	<i>HFE</i>	3077	hemocromatosis	PK
	<i>IRF1</i>	3659	factor 1 regulador de interferón	PK

(continuación)

	Gen	ID Gen NCBI	Nombre	Criterios de selección
	<i>CXCL9</i>	4283	ligando 9 de quimioquina (motivo C-X-C)	PK
	<i>UBD</i>	10537	ubiquitina D	PK
5	<i>CD8A</i>	925	molécula CD8a	PK
	<i>IL32</i>	9235	interleuquina 32	PK
	<i>CXCL10</i>	3627	ligando 10 de quimioquina (motivo C-X-C)	PK
	<i>CCL3</i>	6348	ligando 3 de quimioquina (C-C motivo)	PK
	<i>CD3D</i>	915	molécula CD3d, delta (complejo CD3-TCR)	PK
10	<i>IL6</i>	3569	interleuquina 6 (interferón, beta 2)	PK
	<i>IL1A</i>	3552	interleuquina 1, alfa	PK
	<i>IL1B</i>	3553	interleuquina 1, beta	PK
	<i>TFR2</i>	7036	receptor 2 de transferrina	PK
	<i>HFE2</i>	148738	hemocromatosis tipo 2 (juvenil)	PK
15	<i>BMP4</i>	652	proteína morfogenética ósea 4	PK
	<i>SMAD4</i>	4089	miembro de la familia SMAD 4	PK
	<i>FTH1</i>	2495	ferritina, polipéptido pesado 1	PK
	<i>PDCD1</i>	5133	muerte celular programada 1	PK
	<i>HLA-G</i>	3135	complejo histocompatibilidad mayor, clase I, G	PK
20	<i>FOXP3</i>	50943	factor de transcripción FoxP3	PK
	<i>IL10</i>	3586	interleuquina 10	PK
	<i>TGFB1</i>	7040	factor de crecimiento transformante, beta 1	PK
	<i>IL2RB</i>	3560	receptor de interleuquina 2, beta	PK
	<i>KLRF1</i>	51348	subfamilia F receptor tipo lecitina linfocito citotóxico 1	PK
25	<i>SLAMF7</i>	57823	miembro de la familia SLAM 7	PK
	<i>KLRD1</i>	3824	subfamilia D receptor tipo lecitina linfocito citotóxico 1	PK
	<i>CX3CR1</i>	1524	receptor de 1 quimioquina (motivo C-X3-C)	PK
	<i>LINGO2</i>	158038	repeticiones ricas en leucina y con dominio Ig 2	PK
	<i>BNC2</i>	54796	basonuclina 2	PK
30	<i>NCR1</i>	9437	receptor desencadenante citotoxicidad natural 1	PK
	<i>COL13A1</i>	1305	colágeno, tipo XIII, alfa 1	PK
	<i>IGFBP7</i>	3490	proteína de unión factor crecimiento tipo insulina 7	PK
	<i>SH2D1B</i>	117157	1B que contiene dominio SH2	PK
	<i>NCAM1</i>	4684	molécula adhesión célula neural 1	PK
35	<i>KLRK1</i>	22914	subfamilia K receptor de lectina tipo linfocito citotóxico, 1	PK
	<i>KLRK1</i>	3821	subfamilia C receptor de lectina tipo linfocito citotóxico, 1	PK
	<i>MICA</i>	4276	secuencia A relacionada con polipéptido MHC clase I	PK
	<i>MICB</i>	4277	secuencia B relacionada con polipéptido MHC clase I	PK
	<i>TLR4</i>	7099	receptor 4 tipo toll	PK
40	<i>GZMB</i>	3002	granzima B (granzima 2)	PK
	<i>AP1S2</i>	8905	complejo de proteína adaptadoras 1, sigma 2	PK
	<i>SMARCD3</i>	6604	relación SWI/SNF, asociada matriz	PK
	<i>CD37</i>	951	molécula CD37	PK
45	<i>FCER2</i>	2208	fragmento Fc de IgE, baja afinidad II, (CD23)	PK
	<i>MS4A1</i>	931	dominios 4 transmembrana	PK
	<i>CXCR3</i>	2833	receptor 3 de quimioquina (motivo C-X-C)	PK
	<i>CXCL11</i>	6373	ligando 11 de quimioquina (motivo C-X-C)	PK
	<i>IFNG</i>	3458	interferón, gamma	PK
	<i>CD274</i>	29126	molécula CD274	PK
50	<i>PDCD1LG2</i>	80380	ligando 2 muerte celular programada 1	PK
	<i>C3</i>	718	componente 3 del complemento	PK
	<i>TBX21</i>	30009	T-box 21	PK
	<i>GATA3</i>	2625	proteína 3 unión GATA	PK
	<i>FAS</i>	355	Fas (miembro 6 superfamilia receptor TNF,)	PK
55	<i>FASLG</i>	356	ligando Fas (miembro 6 superfamilia TNF)	PK
	<i>RORC</i>	6097	receptor huérfano relacionado con RAR- C	PK
	<i>HMOX1</i>	3162	hemo oxigenasa (deiclación) 1	PK
	<i>TNFAIP3</i>	7128	factor de necrosis de tumor, proteína 3 alfa-inducida	PK
	<i>BCL2</i>	596	CLL linfocito B/linfoma 2	PK
60	<i>SOCS1</i>	8651	supresor de señalización citoquina 1	PK
	<i>TNF</i>	7124	factor necrosis tumor (superfamilia TNF, 2)	PK
	<i>NOS2</i>	4843	óxido nítrico sintasa 2, inducible	PK
	<i>IL12B</i>	3593	interleuquina 12B (estimulador natural linfocito citotóxico 2)	PK
	<i>IL18</i>	3606	interleuquina 18 (factor que induce interferón-gamma)	PK
65	<i>IRF3</i>	3661	factor 3 regulador interferón	PK
	<i>CCL21</i>	6366	ligando 21 quimioquina (motivo C-C)	PK

(continuación)

Gen	ID Gen NCBI	Nombre	Criterios de selección
<i>HPRT1</i>	3251	hipoxantina fosforibosiltransferasa 1	HK
<i>GAPDH</i>	2597	gliceraldehído-3 -fosfato dehidrogenasa	HK
5 <i>DTWD2</i>	285605	dominio DTW contenido 2	M
<i>POF1B</i>	79983	insuficiencia ovárica prematura, 1B	M
<i>MYD88</i>	4615	gen respuesta primaria diferenciación mielóide (88)	PK
<i>DAB2</i>	1601	homólogo incapacitado 2	M
<i>TIPARP</i>	25976	poli(ADP-ribosa) polimerasa inducible con TCDD	M
10 <i>RBM23</i>	55147	proteína 23 motivo unión ARN	M
<i>TTC3</i>	7267	dominio de repetición de tetratricopéptido 3	M
<i>MIF</i>	4282	factor inhibidor migración macrófago	M
<i>PEBP1</i>	5037	proteína 1 de unión a fosfatidiletanolamina	M
<i>SLC5A12</i>	159963	miembro 5 de la familia de transportadores de soluto 12	M
15 <i>FABP4</i>	2167	proteína 4 unión a ácido graso	M
<i>PCDH24</i>	54825	protocadherina 24	M
<i>VNN3</i>	55350	vanina 3	M
<i>ADORA3</i>	140	receptor adenosina A3	M
<i>TAF15</i>	8148	factor asociado a proteína unión a caja TATA (TBP)	M
20	(M = significativo en la micromatriz, PK = conocimiento previo, HK = control doméstico) fecha de acceso al NCBI, julio 2010		

Los resultados de los experimentos llevados a cabo por PCR en tiempo real revelaron que los genes enumerados en la **Tabla 3** presentan una diferencia estadísticamente significativa en la expresión entre biopsias tomadas de pacientes de trasplante de hígado que pueden abandonar con garantías los fármacos inmunosupresores (tolerantes) y los pacientes que experimentan rechazo cuando se interrumpen los fármacos inmunosupresores (no tolerantes). Tal como se muestra en la **Tabla 3**, los genes *TFRC* y *MIF* se regulan a la baja, y los genes *CDHR2*, *HMOX1*, *HAMP*, *IFNG*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *ADORA3* y *DAB2* se regulan al alza, en los receptores de trasplante de hígado tolerantes en comparación con receptores de trasplante de hígado no tolerantes. Se pueden obtener resultados idénticos si se comparan biopsias tomadas de pacientes de trasplante de hígado con la muestra de ARN de referencia (que puede consistir en una agrupación de ARN obtenidos de tejido de hígado no trasplantado sano, un ARN de referencia como el Human Liver Total RNA de Ambion disponible en el mercado, o una referencia absoluta que consiste en una muestra que contiene un número cuantificado previamente de moléculas de ARN).

Tabla 3

Gen	valor p		cambio en veces
	Student t	Wilcox	
TFRC	0,000035	0,000026	-2,505329
CDHR2	0,006059	0,004665	1,747146
HMOX1	0,007195	0,005044	1,399586
MIF	0,008793	0,003526	-1,547565
HAMP	0,012583	0,077430	2,173470
IFNG	0,013215	0,020816	1,319508
PEP1	0,023371	0,011855	1,132884
SLC5A12	0,032834	0,022216	2,345670
ADORA3	0,039721	0,041890	1,464086
DAB2	0,046314	0,049169	1,193336

Conviene advertir que los genes comprendidos en la **Tabla 3** comparten una ruta funcional ya que participan en la regulación del metabolismo del hierro. De hecho, las biopsias de pacientes tolerantes que pueden interrumpir con éxito la medicación inmunosupresora presentaron una mayor acumulación de hierro, tal como se muestra en la **Figura 1A**. Además, estas diferencias en el contenido de hierro intrahepático fueron independientes de cualquier parámetro clínico como el tiempo transcurrido desde la realización del trasplante o el tipo de terapia inmunosupresora empleada en el momento basal (**Figura 1B**). Se sabe que los genes *TFRC*, *HAMP*, *IFNG* y *HMOX1* están directamente relacionados con el control del metabolismo del hierro celular. En particular, en una situación de deficiencia de hierro sistémica, la expresión de *TFRC* normalmente aumenta, mientras que la expresión de *HAMP* disminuye. En los experimentos de los autores de la invención, la participación de los genes que según lo observado se expresaba de forma diferente entre los pacientes tolerantes y los no tolerantes en la regulación del metabolismo del hierro quedó ilustrada además al observar que *TFRC*, *HAMP*, *CDHR2*, *MIF*, *SLC5A12*, *ADORA3*, *HMOX1*, *IFNG* y *DAB2* se correlacionaban significativamente con el depósito de hierro intrahepático (medido según el método modificado de Scheuer o el método de *recuento del total de hierro*; véase **Figura 2**). Por lo tanto, es posible afirmar que el perfil de expresión de los genes comprendidos en la **Tabla 3** es una clara indicación de la presencia de niveles significativamente más altos de reservas de hierro sistémicas y/o intrahepáticas en pacientes tolerantes que en pacientes no tolerantes (**Figura 2**) y, en consecuencia, un biomarcador fiable para la identificación de receptores de trasplante de hígado tolerantes.

Más específicamente, estos resultados indican que el nivel de expresión de los genes que participan en dicha regulación del metabolismo del hierro deberían ser particularmente pertinentes para diseñar un método de acuerdo con la presente invención. Así pues, cualquier perfil de expresión de genes que pertenecen a la regulación del metabolismo del hierro a un nivel intrahepático debería considerarse como un perfil de expresión equivalente, o patrón, en la invención que se describe y reivindica. Por consiguiente, la expresión de cualquier gen que pertenece a dicha regulación del metabolismo del hierro en el hígado deberá considerarse como un equivalente funcional de los genes descritos en la presente invención.

Por lo tanto, una realización preferente de la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* del estado tolerante de un paciente sometido a trasplante de hígado que comprende:

- a. Evaluación del nivel de reservas de hierro sistémicas y/o intrahepáticas en una muestra biológica obtenida de dicho paciente y
- b. Evaluación de la tolerancia o no tolerancia del paciente de trasplante de hígado investigado comparando el nivel de reservas de hierro sistémicas y/o intrahepáticas de la etapa a, o bien con el nivel de los reservas de hierro sistémicas o intrahepáticas tomados de una muestra de referencia, o bien con un umbral determinado, en la que la evaluación del estado de tolerancia o no tolerancia se lleva a cabo midiendo en una muestra biológica obtenida del aloinjerto de hígado del paciente investigado, el nivel de expresión de al menos uno de los siguientes genes o combinación de los mismos TFRC, CDHR2, HMOX1, MIF, HAMP, IFNG, PEBP1, SLC5A12, ADORA3 y DAB2 y evaluando la tolerancia o no tolerancia del paciente investigado al trasplante de hígado comparando el nivel de expresión de al menos uno de los genes o combinaciones de los mismos con el nivel de expresión de los mismos genes o combinaciones de los mismos tomados de una muestra de referencia. La muestra de referencia es un perfil de expresión predeterminado obtenido de una muestra biológica del tejido hepático de un sujeto no trasplantado sano. Puede ser una agrupación de ARN, un ARN de referencia como por ejemplo un Human Liver Total RNA de Ambion disponible en el mercado, o una referencia absoluta que consiste en una muestra que contiene un número previamente cuantificado de moléculas de ARN).

Tal como se muestra en la **Tabla 4** a continuación, la medición del nivel de expresión de cada uno de los genes comprendidos en la **Tabla 3** es útil para la identificación de pacientes que pueden interrumpir de forma segura toda la medicación inmunosupresora sin sufrir rechazo (tolerancia). Por lo tanto, esta **Tabla 4** presenta la capacidad de los genes individuales enumerados en ella de diferenciar estadísticamente a los pacientes que tolerarán el hígado trasplantado en ausencia de terapia inmunosupresora de los pacientes que lo rechazarán cuando se interrumpan las medicaciones inmunosupresoras.

Tabla 4

GENES	AUC	SN	SP	ER	PPV	NPV
TFRC	0,76	51,72	90,48	25,35	78,95	73,08
CDHR2	0,70	58,62	83,33	26,76	70,83	74,47
HMOX1	0,70	55,17	83,33	28,17	69,57	72,92
PEBP1	0,68	44,83	90,48	28,17	76,47	70,37
MIF	0,68	93,1	52,38	30,99	57,45	91,67
SLC5A 12	0,66	44,83	85,71	30,99	68,42	69,23
DAB2	0,65	58,62	73,81	32,39	60,71	72,09
IFNG	0,64	31,03	90,48	33,8	69,23	65,52
HAMP	0,63	86,21	52,38	33,8	55,56	84,62
ADORA3	0,65	20,69	95,24	35,21	75	63,49

AUC: área bajo la curva

SN: sensibilidad

SP: especificidad

ER: tasa de error

PPV: valor predictivo positivo

NPV: valor predictivo negativo

Sin embargo, aunque los genes citados en las **Tablas 3 o 4** tienen una capacidad predictiva individual, se obtuvieron diferentes grupos a partir de algunas combinaciones de dichos genes para identificar un método predictivo lo más preciso posible. Por otra parte, también se agruparon los genes enumerados en las **Tablas 3 o 4** con otros genes que no presentaron un valor predictivo de por sí (cuando se tomaron independientemente), por ejemplo: LC5A12, VNN3, SOCS1, TTC3, RBM23, SH2D1B, NCR1, TFRC, TUBA4A, TAF15, TIPARP, MOX1, MCOLN1, EBP1, DHR2, y AB2. Por lo tanto, en una realización preferente, la presente invención comprende además la medición de los niveles de expresión de al menos uno de los siguientes genes: LC5A12, VNN3, SOCS1, TTC3, RBM23, SH2D1B, NCR1, TFRC, TUBA4A, TAF15, TIPARP, MOX1, MCOLN1, EBP1, DHR2, y AB2 en combinación con al menos uno de los genes enumerados en la **Tabla 3 o 4**.

Para identificar la(s) combinación(es) de los biomarcadores de expresión génica con el mejor rendimiento para el diagnóstico del resultado de la retirada del fármaco de inmunosupresión en trasplante de hígado, se realizó una

búsqueda exhaustiva de modelos predictivos empleando el análisis discriminante lineal y los algoritmos de regresión logística aplicados en el software *missclassification penalized posterior* (*clasificación errónea penalizada posterior*) (MiPP). En primer lugar, se llevó a cabo una etapa de validación cruzada 10 veces en un grupo de muestras de hígado (18 tolerantes y 31 no tolerantes) recogidas de pacientes reclutados en el Hospital Clínico de Barcelona. A continuación, se llevó a cabo la validación cruzada de división aleatoria de los modelos de diagnóstico sobre el conjunto de datos completo (que incluyó las 56 muestras de Barcelona y 21 muestras adicionales de Roma y Lovaina) repartiéndolos repetidamente en conjunto de entrenamiento (2/3) y conjunto de prueba independiente (1/3) para validación del modelo externo. Por otra parte, para cada uno de los modelos identificados en el conjunto de entrenamiento, se computó el límite de probabilidad óptimo de tolerancia empleando análisis de curvas ROC (características operativas del receptor). Para demostrar que el comportamiento de los modelos no era una variable que dependía del centro, se computaron SN, SP, NPV, PPV y las tasas de error globales para las muestras recogidas de Barcelona y las obtenidas de Roma y Lovaina. Cabe destacar que todas las mediciones de la expresión génica se llevaron a cabo sobre muestras obtenidas antes de interrumpir las medicaciones de inmunosupresión. Los resultados obtenidos indican por tanto que los marcadores genéticos identificados son capaces de predecir el éxito de la retirada de un fármaco de inmunosupresión.

Tal como se ha mencionado anteriormente, este tipo de análisis tiene en cuenta no solamente los genes que según las observaciones se expresan de forma diferenciada (**Tabla 3**), sino también los genes que, si bien no se expresan estadísticamente diferenciados tomados de forma independiente, sí que contribuyen a optimizar el diagnóstico en combinación con los genes de la **Tabla 3**. En la **Tabla 5** se muestran los grupos de muestras empleadas para el diseño y evaluación de modelos predictivos basados en la expresión en biopsia de hígado de los genes medidos por PCR en tiempo real. Conviene mencionar que mientras que se emplearon las muestras recogidas de receptores de Barcelona tanto para experimentos de micromatriz como de PCR cuantitativa, no se empleó ninguna de las muestras obtenidas de Roma y Lovaina en los experimentos de micromatriz.

Tabla 5

	TOL (n)	No-TOL(n)	origen
Conjunto de entrenamiento	18	31	Barcelona
Conjunto de prueba	10	11	Roma/Lovaina

Por lo tanto, en la **Tabla 6**, se muestran las combinaciones de genes cuya expresión es la que mejor clasifica a los pacientes en las categorías no tolerante o tolerante de acuerdo con los resultados de las mediciones de expresión por PCR cuantitativa. Se seleccionó arbitrariamente un error de clasificación de menos de 15 % en el grupo de aprendizaje y menos de un 15 % en el grupo de validación para seleccionar los modelos más precisos y clínicamente útiles.

Tabla 6

Genes	n	Barcelona			Roma + Lovaina		
		SN	SP	ER	S	SP	ER
SLC5A12+VNN3+TFRC+SOC1+MIF+TTC3+RB M23+PEBP1+SH2D1B+NCRI+DAB2+ADORA3	12	100	90,32	6,12	90	90,91	9,52
TFRC+PEBP1+MIF+CDHR2+HAMP+TUBA4A+TTC3+HMOX1+VNN3+NCRI+ADORA3+TAF15+IFN	15	94,44	93,55	6,12	80	100	9,52
G+SOC1+TIPARP							
HMOX1+CDHR2+MIF+PEBP1+TFRC+SLCSA12+SOC1+HAMP+VNN3+IFNG	10	94,44	90,32	8,16	80	100	9,52
TFRC+PEBP1+MIF+CDHR2+SLC5A12+HAMP+SOC1+IFNG+HMOX1	9	94,44	90,32	8,16	80	100	9,52
TFRC+IFNG+CDHR2+ADORA3+HAMP+MIF+PEBP1+VNN3+SOC1+HMOX1+DAB2	11	88,89	90,32	10,2	80	100	9,52
TFRC+DA82+MIF+PEBP1+IFNG+HAMP+SLC5A12+SOC1+VNN3+ADORA3+CDHR2+MCOLN1+HMOX1	13	77,78	96,77	10,2	80	100	9,52
TFRC+IFNG+HMOX1+MCOLN1+MIF+HAMP+ADORA3+CDHR2+PEBP1+SOC1	10	88,89	90,32	10,2	80	100	9,52
PEBP1+TFRC+HMOX1+IFNG+MCOLN1+SOC1+MIF+CDHR2+HAMP+ADORA3	10	88,89	90,32	10,2	80	100	9,52
TFRC+PEBP1+IFNG+CDHR2+ADORA3+VNN3+HMOX1+DA82+SOC1+MIF+HAMP	11	88,89	90,32	10,2	80	100	9,52
CDHR2+ADORA3+IFNG+TFRC+VNN3+HMOX1+PEBP1+MIF+SLCSA12+HAMP+SOC1+MCOLN1	12	77,78	96,77	10,2	80	100	9,52
SLCSA12+TFRC+IFNG+MIF+DA82+HMOX1+CDHR2+SOC1+HAMP+PEBP1+VNN3+ADORA3+MCOLN1	13	77,78	96,77	10,2	80	100	9,52
TFRC+SOC1+HMOX1+PEBP1+VNN3+CDHR2+HAMP+IFNG+DAB2+MCOLN1+ADORA3+MIF	12	83,33	93,55	10,2	80	100	9,52
TFRC+PEBP1+VNN3+SOC1+MIF+HMOX1+DAB2+HAMP+IFNG+CDHR2+ADORA3+MCOLN1	12	83,33	93,55	10,2	80	100	9,52
SLCSA12+MIF+CDHR2+TFRC+IFNG+ADORA3+HAMP+VNN3+SOC1+MCOLN1+PEBP1+HMOX1	12	77,78	96,77	10,2	80	100	9,52
TFRC+IFNG+CDHR2+ADORA3+PEBP1+VNN3+MIF+HMOX1+MCOLN1+SOC1+SLCSA12+DAB2+HAMP	13	77,78	96,77	10,2	80	100	9,52
TFRC+VNN3+HAMP+COHR2+SLC5A12+HMOX1+SOC1+PEBP1+MIF	9	94,44	83,87	12,2	80	100	9,52
DAB2+TFRC+MIF+CDHR2+PEBP1+VNN3+TTC3+HMOX1+SOC1	9	83,33	90,32	12,24	80	100	9,52
TFRC+PEBP1+MIF+CDHR2+VNN3+IFNG+MCOLN1+SOC1	8	88,89	83,87	14,29	80	100	9,52
TFRC+PEBP1+MIF+SOC1+CDHR2	5	94,44	80,65	14,29	80	100	9,52
ADORA3+CDHR2+MIF+PEBP1+TAF15+TFRC	6	94,44	82,14	11,94	80	100	13,04
CDHR2+MIF+PEBP1+SLC5A12+SOC1+TAF15+TFRC	7	83,33	92,85	11,94	70	100	10,87
ADORA3+CDHR2+HAMP+MIF+PEBP1+SOC1+TAF15+TFRC	8	94,44	82,14	11,94	80	100	13,04
CDHR2+HAMP+IFNG+MCOLN1+MIF+PEBP1+SOC1+TFRC+VNN3	9	88,88	89,28	10,44	80	100	10,87
SN: sensibilidad							
SP: especificidad							
ER: tasa de error							
PPV: valor predictivo positivo							
NPV: valor predictivo negativo							

En una realización preferente, el método divulgado en el presente documento se lleva a cabo utilizando una combinación de al menos uno de los genes citados con al menos uno de los siguientes genes: *LC5A12*, *VNN3*, *SOCS1*, *TTC3*, *RBM23*, *SH2D1B*, *PCR1*, *TFRC*, *TUBA4A*, *TAF15*, *TIPARP*, *MOX1*, *MCOLN1*, *EBP1*, *DHR2*, y *AB2*. En una realización particularmente preferente, el método de la presente invención se lleva a cabo utilizando una de las siguientes combinaciones de genes: *LCSA12*, *VNN3*, *TFRC*, *SOCS1*, *MIF*, *TTC3*, *RBM23*, *PEBP1*, *SH2D1B*, *PCR1*, *DAB2* y *ADORA3*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *HAMP*, *TUBA4A*, *TTC3*, *HMOX1*, *VNN3*, *NCR1*, *ADORA3*, *TAF15*, *IFNG*, *SOCS1* y *TIPARP*; *MOX1*, *CDHR2*, *MIF*, *PEBP1*, *TFRC*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *HAMP*, *VNN3* y *IFNG*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *SLC5A12*, *HAMP*, *SOCS1*, *IFNG* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *HAMP*, *MIF*, *PEBP1*, *VNN3*, *SOCS1*, *HMOX1* y *DAB2*; *TFRC*, *DAB2*, *MIF*, *PEBP1*, *IFNG*, *HAMP*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *VNN3*, *ADORA3*, *CDHR2*, *MCOLN1* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *HMOX1*, *MCOLN1*, *MIF*, *HAMP*, *ADORA3*, *CDHR2*, *PEBP1* y *SOCS1*; *EBP1*, *TFRC*, *HMOX1*, *IFNG*, *MCOLN1*, *SOCS1*, *MIF*, *CDHR2*, *HAMP* y *ADORA3*; *TFRC*, *PEBP1*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *VNN3*, *HMOX1*, *DAB2*, *SOCS1*, *MIF* y *HAMP*; *DHR2*, *ADORA3*, *IFNG*, *TFRC*, *VNN3*, *HMOX1*, *PEBP1*, *MIF*, *SLC5A12*, *HAMP*, *SOCS1* y *MCOLN1*; *LCSA12*, *TFRC*, *IFNG*, *MIF*, *DAB2*, *HMOX1*, *CDHR2*, *SOCS1*, *HAMP*, *PEBP1*, *VNN3*, *ADORA3* y *MCOLN1*; *TFRC*, *SOCS1*, *HMOX1*, *PEBP1* y *VNN3*; *CDHR2*, *HAMP*, *IFNG*, *DAB2*, *MCOLN1*, *ADORA3* y *MIF*; *TFRC*, *PEBP1*, *VNN3*, *SOCS1*, *MIF*, *HMOX1*, *DAB2*, *HAMP*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3* y *MCOLN1*; *LCSA12*, *MIF*, *CDHR2*, *TFRC*, *IFNG*, *ADORA3*, *HAMP*, *VNN3*, *SOCS1*, *MCOLN1*, *PEBP1* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *PEBP1*, *VNN3*, *MIF*, *HMOX1*, *MCOLN1*, *SOCS1*, *SLC5A12*, *DAB2* y *HAMP*; *TFRC*, *VNN3*, *HAMP*, *CDHR2*, *SLC5A12*, *HMOX1*, *SOCS1*, *PEBP1* y *MIF*; *AB2*, *TFRC*, *MIF*, *CDHR2*, *PEBP1*, *VNN3*, *TTC3*, *HMOX1* y *SOCS1*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *VNN3*, *IFNG*, *MCOLN1* y *SOC S1*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *SOCS1* y *CDHR2*; *ADORA3*, *CDHR2*, *MIF*, *PEBP1*, *TAF15* y *TFRC*; *CDHR2*, *MIF*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *TAF15* y *TFRC*; *ADORA3*, *CDHR2*, *HAMP*, *MIF*, *PEBP1*, *SOCS1*, *TAF15* y *TFRC*; *CDHR2*, *HAMP*, *IFNG*, *MCOLN1*, *MIF*, *PEBP1*, *SOCS1*, *TFRC* y *VNN3*.

Algunas variables clínicas pueden influir en el desarrollo de tolerancia operativa tras el trasplante de hígado en seres humanos. En particular, es bastante más probable que puedan interrumpir con éxito las medicaciones inmunosupresoras los receptores que llevan trasplantados un largo período de tiempo o que son de edad avanzada. Los autores de la invención llevaron a cabo otros análisis de regresión logística para excluir el efecto potencialmente desorientador de estas 2 variables clínicas sobre las mediciones de expresión de gen. Entre los genes representados en las **Tablas 3** o **4**, se observó que los genes que se mencionan a continuación eran estadísticamente significativos tras excluir el efecto de la edad del receptor y el tiempo transcurrido desde que se realizó el trasplante (**Tabla 7**).

Tabla 7

Genes	valor p
<i>TFRC</i>	0,0033
<i>PEBP1</i>	0,0125
<i>HMOX1</i>	0,0177
<i>IFNG</i>	0,0198
<i>CDHR2</i>	0,0234
<i>DAB2</i>	0,0572

Para desarrollar un predictor genético independiente de las variables clínicas, se empleó regresión logística y el software MiPP en los genes que se muestran en la **Tabla 7**. Se concluyó que el modelo que se muestra a continuación era el mejor predictor tanto en los grupos de aprendizaje como en los grupos de validación de los pacientes (**Tabla 8**).

Tabla 8

Genes	n	Barcelona			Roma + Lovaina		
		SN	SP	ER	SN	SP	ER
<i>TFRC</i> + <i>IFNG</i> + <i>CDHR2</i>	3	83,3	83,9	16,3	60	100	19

Por lo tanto, otra realización más de la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* del estado tolerante de un paciente sometido a trasplante de hígado midiendo la expresión génica de la siguiente combinación de genes: *TFRC*, *IFNG* y *CDHR2*.

En una realización en particular del método de acuerdo con la invención, dicho método puede comprender además determinar al menos un parámetro adicional útil para el diagnóstico y/o pronóstico. Dichos "parámetros útiles para el diagnóstico" son parámetros que no se pueden utilizar en solitario para el diagnóstico pero que según se ha descrito presentan un valor diferencial significativo entre los sujetos tolerantes y los sujetos que claramente necesitan un tratamiento inmunosupresor y, por lo tanto, se pueden utilizar también para afinar y/o confirmar el diagnóstico de acuerdo con el método descrito según la invención. Por lo tanto, otra realización más de la invención es un método tal como se ha descrito que comprende además la determinación de la edad del paciente y/o el tiempo que ha transcurrido desde la realización del trasplante.

Otra realización de la presente divulgación se refiere a un kit para poner en práctica el método de la invención para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* del estado tolerante de un paciente sometido a trasplante de hígado, que comprende (i) medios para medir la expresión de los niveles de expresión génica de los correspondientes genes, e (ii) instrucciones para correlacionar dichos niveles de expresión génica por encima o por debajo del nivel de expresión de los mismos genes tomados de una muestra de ARN de referencia. Dichas muestras de referencia pueden ser una agrupación de ARN obtenidos de un tejido de hígado sin trasplantar sano, un ARN de referencia como por ejemplo Human Liver Total RNA de Ambion disponible en el mercado, o una referencia absoluta que consiste en una muestra que contiene un número de moléculas de ARN cuantificado previamente). En una realización preferente, el medio comprende una micromatriz de un chip génico que comprende sondas de ácido nucleico, comprendiendo dichas sondas de ácido nucleico secuencias que se hibridan específicamente con los transcritos del conjunto de genes correspondiente, junto con los reactivos para realizar los análisis de micromatriz. En otra realización preferente de la divulgación, el kit comprende cebadores de oligonucleótido (es decir *HS02559818s1* para el gen *TFRC* o *Hs01125168m1* para el gen *VNN3*), para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa, comprendiendo dichos cebadores secuencias que se hibridan específicamente con el ADN complementario derivado de los transcritos del conjunto de genes correspondiente. Por otra parte, el kit puede comprender un soporte sólido en el que se despliegan las sondas de ácido nucleico que comprenden secuencias que se hibridan específicamente con los transcritos del conjunto de genes correspondiente. En otra realización, el medio comprende una micromatriz o un chip de proteína que comprende fracciones de unión específicas como anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos.

En una realización, el kit mide la expresión de al menos uno de los siguientes genes o combinaciones de los mismos: *TFRC*, *CDHR2*, *HMOX1*, *MIF*, *HAMP*, *IFNG*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *ADORA3* y *DAB2*, para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* del estado tolerante de un paciente sometido a trasplante de hígado. En una realización preferente, el kit mide la expresión génica de una combinación de al menos uno de los genes antes mencionados con al menos uno de los siguientes genes: *LC5A12*, *VNN3*, *SOCS1*, *TTC3*, *RBM23*, *SH2D1B*, *NCR1*, *TFRC*, *TUBA4A*, *TAF15*, *TIPARP*, *MOX1*, *MCOLN1*, *EBP1*, *DHR2*, y *AB2*. En una realización particularmente preferente, el kit mide la expresión génica de las siguientes combinaciones de genes: *LC5A12*, *VNN3*, *TFRC*, *SOCS1*, *MIF*, *TTC3*, *RBM23*, *PEBP1*, *SH2D1B*, *NCR1*, *DAB2* y *ADORA3*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *HAMP*, *TUBA4A*, *TTC3*, *HMOX1*, *VNN3*, *NCR1*, *ADORA3*, *TAF15*, *IFNG*, *SOCS1* y *TIPARP*; *MOX1*, *CDHR2*, *MIF*, *PEBP1*, *TFRC*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *HAMP*, *VNN3* y *IFNG*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *SLC5A12*, *HAMP*, *SOCS1*, *IFNG* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *HAMP*, *MIF*, *PEBP1*, *VNN3*, *SOCS1*, *HMOX1* y *DAB2*; *TFRC*, *DAB2*, *MIF*, *PEBP1*, *IFNG*, *HAMP*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *VNN3*, *ADORA3*, *CDHR2*, *MCOLN1* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *HMOX1*, *MCOLN1*, *MIF*, *HAMP*, *ADORA3*, *CDHR2*, *PEBP1* y *SOCS1*; *EBP1*, *TFRC*, *HMOX1*, *IFNG*, *MCOLN1*, *SOCS1*, *MIF*, *CDHR2*, *HAMP* y *ADORA3*; *TFRC*, *PEBP1*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *VNN3*, *HMOX1*, *DAB2*, *SOCS1*, *MIF* y *HAMP*; *DHR2*, *ADORA3*, *IFNG*, *TFRC*, *VNN3*, *HMOX1*, *PEBP1*, *MIF*, *SLC5A12*, *HAMP*, *SOCS1* y *MCOLN1*; *LC5A12*, *TFRC*, *IFNG*, *MIF*, *DAB2*, *HMOX1*, *CDHR2*, *SOCS1*, *HAMP*, *PEBP1*, *VNN3*, *ADORA3* y *MCOLN1*; *TFRC*, *SOCS1*, *HMOX1*, *PEBP1*, *VNN3*, *CDHR2*, *HAMP*, *IFNG*, *DAB2*, *MCOLN1*, *ADORA3* y *MIF*; *TFRC*, *PEBP1*, *VNN3*, *SOCS1*, *MIF*, *HMOX1*, *DAB2*, *HAMP*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3* y *MCOLN1*; *LC5A12*, *MIF*, *CDHR2*, *TFRC*, *IFNG*, *ADORA3*, *HAMP*, *VNN3*, *SOCS1*, *MCOLN1*, *PEBP1* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *PEBP1*, *VNN3*, *MIF*, *HMOX1*, *MCOLN1*, *SOCS1*, *SLC5A12*, *DAB2* y *HAMP*; *TFRC*, *VNN3*, *HAMP*, *CDHR2*, *SLC5A12*, *HMOX1*, *SOCS1*, *PEBP1* y *MIF*; *AB2*, *TFRC*, *MIF*, *CDHR2*, *PEBP1*, *VNN3*, *TTC3*, *HMOX1* y *SOCS1*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *VNN3*, *IFNG*, *MCOLN1* y *SOCS1*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *SOCS1* y *CDHR2*; *ADORA3*, *CDHR2*, *MIF*, *PEBP1*, *TAF15* y *TFRC*; *CDHR2*, *MIF*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *TAF15* y *TFRC*; *ADORA3*, *CDHR2*, *HAMP*, *MIF*, *PEBP1*, *SOCS1*, *TAF15* y *TFRC*; *CDHR2*, *HAMP*, *IFNG*, *MCOLN1*, *MIF*, *PEBP1*, *SOCS1*, *TFRC* y *VNN3*.

Una de las realizaciones preferentes de la presente divulgación se refiere a un kit para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* del estado tolerante de un paciente sometido a trasplante de hígado que mide la expresión génica de la siguiente combinación de genes: *TFRC*, *IFNG* y *CDHR2*.

Los kit pueden comprender además reactivos para realizar un análisis de micromatriz y/o soportes sólidos en los que se despliegan sondas de ácido nucleico que comprenden secuencias que se hibridan específicamente con los transcritos del conjunto de genes correspondiente. Otra realización de la presente divulgación se refiere a un kit para seleccionar o modificar un protocolo de tratamiento de inmunoterapia evaluando el estado tolerante del receptor del hígado utilizando el método o el kit divulgados.

La última realización de la presente divulgación se refiere a un método para adaptar el tratamiento inmunosupresor de un paciente con injerto de hígado, comprendiendo dicho método el uso del método y los kit que se han divulgado. El estado de la técnica comprende (Benítez C et al., Abstract #517, American Transplant Congress, San Diego, CA, 3 de mayo- 5 de mayo, 2010) la medición en muestras de sangre periférica de la expresión de un grupo de genes (*KLRF1*, *PTGDR*, *NCALD*, *CD160*, *IL2RB*, *PTCH1*, *ERBB2*, *KLRB1*, *NKG7*, *KLRD1*, *FEZ1*, *GNPTAB*, *SLAMF7*, *CLIC3*, *CX3CR1*, *WDR67*, *MAN1A1*, *CD9*, *FLJ14213*, *FEM1C*, *CD244*, *PSMD14*, *CTBP2*, *ZNF295*, *ZNF267*, *RGS3*, *PDE4B*, *ALG8*, *GEMIN7*) a diferencia del que propone la presente invención, como método para identificar receptores de hígado tolerantes. Se llevó a cabo un ensayo comparativo (véase **Ejemplo 9**) para determinar si los genes que forman parte de la presente invención tenían o no un poder discriminatorio más alto que los genes en la sangre periférica divulgados anteriormente. Se llegó a la conclusión de que la medición de la expresión de los genes de la presente invención en muestras de tejido de hígado resulta ser al menos igual de precisa que la medición de

los genes en sangre periférica del estado de la técnica para identificar los receptores de hígado que pueden abandonar con éxito la medicación inmunosupresora por ser tolerantes al trasplante.

Por otra parte, la presente divulgación ofrece otras pruebas más que corroboran el papel del metabolismo del hierro en la adquisición de tolerancia operativa a los aloinjertos de hígado:

- El contenido en hierro del hígado (reservas de hierro intrahepáticas) medido de manera semi-cuantitativa tras la tinción de Perl empleando o bien el método modificado de Scheuer o bien el método de recuento del total de hierro, es significativamente más alto en los receptores de hígado tolerantes que en los no tolerantes (véase **Figura 1**).
- Los niveles serológicos de ferritina, uno de los marcadores más precisos de las reservas totales de hierro en el organismo, son significativamente más altos en los receptores de hígado tolerantes que en los no tolerantes (véase **Figura 3A y B** y el **Ejemplo 10**).
- Los niveles de proteína fosfo-Stat3 de tejido hepático son significativamente más altos en los receptores tolerantes que en los no tolerantes (véase **Figura 4 y Ejemplo 11**). Esto concuerda con la observación de que la hepcidina fosforila Stat3 y, por tanto, que la ausencia de hepcidina (por ejemplo, como consecuencia de una deficiencia en hierro), disminuyen los niveles de fosfo-Stat3

En conjunto, estos resultados indican que la regulación del metabolismo del hierro a nivel sistémico e intrahepático desempeña un papel en el control de las respuestas alo-inmunes en el trasplante de hígado mediante la regulación intrajerto de la activación del factor de transcripción Stat3. De manera similar, la cuantificación de los niveles de hierro intrahepáticos y la ferritina en suero se deberían considerar también como equivalentes funcionales de los genes descritos en la presente invención.

Por lo tanto, otra realización de la presente divulgación se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* del estado tolerante de un paciente sometido a trasplante de hígado que comprende: la obtención de una muestra biológica del aloinjerto de hígado del paciente investigado, la medición en dicha muestra del nivel de reservas de hierro intrahepáticas y la evaluación de la tolerancia o no tolerancia del paciente investigado al trasplante de hígado comparando el nivel de sus reservas de hierro intrahepáticas con el nivel de reservas de hierro intrahepáticas de una muestra de referencia, sabiendo que, tal como se ha mencionado, el nivel de reservas de hierro intrahepáticos es significativamente más alto en receptores de trasplante de hígado tolerantes que en receptores de trasplante de hígado no tolerantes. La evaluación del nivel de reservas de hierro intrahepáticas se puede llevar a cabo a través de medios conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo (sin ser una lista exhaustiva); por tinción directa de portaobjetos para biopsia de hígado con tintes específicos para el hierro (p.ej., azul Prusia de Perl), por cuantificación del hierro de las biopsias del tejido hepático empleando espectrofotometría de absorción atómica, o por formación de imágenes de resonancia magnética de todo el hígado. En este caso, el valor de referencia es un umbral definido previamente sobre la base de las diferencias observadas entre los pacientes con trasplante de hígado tolerantes y no tolerantes, tal como se muestra en la **Figura 1**.

Otra realización de la presente divulgación se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* del estado tolerante de un paciente sometido a trasplante de hígado que comprende: la obtención de una muestra biológica del suero del paciente investigado, la medición en dicha muestra del nivel de proteína ferritina y la evaluación de la tolerancia o no tolerancia del paciente investigado a un trasplante de hígado comparando su nivel de ferritina con el nivel de la misma proteína de una muestra de referencia, sabiendo que, tal como se ha mencionado, el nivel serológico de ferritina es significativamente más alto en receptores de hígado tolerantes que en receptores de hígado no tolerantes. Esta evaluación del nivel de proteína ferritina se puede llevar a cabo a través de cualquiera de los medios conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo (sin ser una lista exhaustiva): ELISA y radioinmunoensayo. En este caso, el valor de referencia es un umbral definido previamente sobre la base de las diferencias observadas entre los pacientes con trasplante de hígado tolerantes y no tolerantes, tal como se muestra en la **Figura 3**.

Otra realización de la presente divulgación se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* del estado tolerante de un paciente sometido a trasplante de hígado que comprende: la obtención de una muestra de tejido biológico del aloinjerto de hígado del paciente investigado, la medición en dicha muestra del nivel de proteína de fosfo-Stat3 y la evaluación de la tolerancia o no tolerancia del paciente investigado al trasplante de hígado comparando su nivel de proteína de fosfo-Stat3 con el nivel de proteína de la misma proteína de una muestra de referencia, sabiendo que, tal como se ha mencionado antes, el nivel de fosfo-Stat3 en el tejido del hígado es significativamente más alto en receptores de hígado tolerantes que en receptores de hígado no tolerantes. Esta evaluación del nivel de fosfo-Stat3 en el tejido hepático se puede llevar a cabo a través de cualquiera de los medios conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo (sin ser una lista exhaustiva): inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y transferencia de Western. En este caso, el valor de referencia es un umbral definido previamente de la muestra de referencia, sabiendo que, tal como se ha mencionado antes, el nivel de fosfo-Stat3 intrahepático es significativamente más alto en receptores de trasplante de hígado tolerantes que en receptores de trasplante de hígado no tolerantes, tal como se muestra en la **Figura 4**.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. (A) El contenido de hierro en el hígado (medido de manera semi-cuantitativa después de la tinción de Perl aplicando o bien el método modificado de Scheuer o bien el método de recuento del total del hierro) es significativamente más alto en los hígados de pacientes tolerantes que pueden abandonar con éxito la terapia inmunosupresora (TOL) que los pacientes no tolerantes en los que no es posible (no-TOL)

(B) La presencia o ausencia de tinción del hierro intrahepático, según se evalúa según el método de Scheuer es independiente del tiempo transcurrido desde el trasplante (panel de la izquierda) y del tipo de fármacos inmunosupresores empleados en el momento basal (panel de la derecha) y se puede emplear para discriminar entre los pacientes tolerantes (barras oscuras) y los pacientes no tolerantes (barras blancas).

Figura 2. Esta figura muestra la influencia de las mediciones de la expresión de un gen individual en los niveles de hierro intrahepático (medido según el método modificado de Scheuer). Las barras más altas corresponden a los genes más influyentes (*HAMP*, *TFRC*, *CDHR2*). La línea de referencia es el umbral de importancia estadística según se determina según Globaltest de Goeman.

Figura 3. (A) Esta figura muestra que los niveles serológicos de ferritina (un marcador de las reservas de hierro sistémicas) son significativamente más altos en receptores de hígado tolerantes que en los no tolerantes.

(B) Esta figura muestra la distribución de los niveles serológicos de ferritina entre receptores tolerantes (TOL) y no tolerantes (no-TOL): ferritina <12 ng/ml (empobrecimiento reservas de hierro), ferritina 12-30 ng/ml (reservas de hierro reducidas), ferritina >30 ng/ml (reservas de hierro repletas). Tal como se muestra, ninguno de los pacientes tolerantes presentó un empobrecimiento de los depósitos de hierro y solamente una minoría presentó reservas de hierro reducidos. En contraposición, aproximadamente un 30 % de los pacientes no tolerantes presentó reservas de hierro sistémicas anormalmente bajas.

Figura 4. Esta figura muestra que el área de las secciones de tejido de hígado que tiñe positivo para STAT3 fosforilado es significativamente mayor en los receptores de hígado tolerantes (TOL) que en los no tolerantes (no-TOL).

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Población de pacientes y diseño del estudio

Se recogieron muestras de sangre y de biopsia de hígado de un grupo de receptores de trasplante de hígado reclutados en una prueba clínica multicéntrica prospectiva apoyada por la Comisión Europea (Título: *Investigación de la firma inmunológica de tolerancia operativa en trasplante de hígado*; ensayos clínicos. Identificación oficial NCT00647283). Los criterios de inclusión fueron los siguientes: 1) > de tres años transcurridos desde el trasplante; 2) función del hígado estable sin episodios de rechazo durante los últimos 12 meses previos a la inclusión; 3) ninguna historia de enfermedad hepática autoinmune; 4) biopsia de hígado previa a la inclusión sin anomalías significativas (sin señales de rechazo agudo o crónico de acuerdo con los criterios de Banff; ausencia de inflamación portal en >50 % de tractos portales; ausencia de perivenulitis central en >50% de las venas centrales; ausencia de fibrosis en puentes o cirrosis). Se fueron retirando los fármacos inmunosupresores en los receptores reclutados de forma gradual hasta llegar a una interrupción completa al cabo de un período de 6-9 meses y, después, se continuó un período de seguimiento durante 12 meses más. Se consideró que los pacientes eran tolerantes si no se produjeron episodios de rechazo durante todo el período de duración del estudio ni se advirtió ningún cambio histológico significativo en la biopsia del hígado obtenida transcurrido el período de seguimiento de 12 meses. Los pacientes que sufrieron un rechazo agudo durante el estudio fueron considerados no tolerantes. De los 102 receptores reclutados en la prueba, se incluyeron 79 (33 tolerantes y 46 no tolerantes) en el estudio actual. Se obtuvieron muestras de sangre y de biopsia de hígado disponibles para el estudio antes de interrumpir los fármacos inmunosupresores tanto de los receptores tolerantes (**TOL**, n = 33) como de los no tolerantes (**no TOL**, n = 46), en el momento del rechazo de receptores no tolerantes (n = 14) y al final del estudio en receptores tolerantes (n = 4). Por otra parte, también se obtuvieron muestras de tejido de los siguientes grupos de pacientes: a) receptores de trasplante de hígado con hepatitis crónica como consecuencia de infección de virus de la hepatitis C recurrente (**HEPC**, n=12); b) receptores de trasplante de hígado con rechazo celular agudo típico que tiene lugar durante el período inmediatamente posterior al trasplante (**REJ**, n=9); c) receptores de trasplante de hígado con mantenimiento de inmunosupresión con la función hepática normal e histología de hígado normal 1 año después del trasplante (**CONT-Tx**, n=8); y d) pacientes no trasplantados que han sido sometidos a cirugía por metástasis colorrectal al hígado (**CONT**, n=10). Los receptores que participaron fueron reclutados del Hospital Clínico de Barcelona (España), la Universidad Tor Vergata Roma (Italia) y la Universidad Hospital de Lovaina (Bélgica). El estudio fue aprobado por el Consejo de Revisión Institucional de las tres instituciones participantes y se obtuvo de todos los pacientes del estudio el consentimiento informado por escrito. Las características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en el estudio se resumen en la **Tabla 1** y en la **Figura 1** se representa una visión general del diseño del estudio. Una descripción detallada de la población de pacientes y los resultados clínicos de la prueba clínica de retirada de inmunosupresión se registrará en otro lugar.

Ejemplo 2. Muestras de biopsia de hígado y evaluación histológica

Se realizaron las biopsias del hígado percutáneamente con anestesia local. Se conservó inmediatamente una porción de 2-3 mm del cilindro de hígado de la biopsia con aguja en un reactivo RNAlater (Ambion, Austin, EE.UU.), se mantuvo a 4 °C durante 24 h y a continuación se crioconservó en nitrógeno líquido después de separar el reactivo RNAlater. Se fijó con formalina el resto del cilindro y se embebió en parafina. En pacientes CONT, se obtuvieron biopsias de hígado quirúrgicas de hígados no tumorales y se trataron tal como se ha descrito. Para la evaluación histológica, se tiñeron portaobjetos de 3 µm de grosor utilizando hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson para el análisis de tejido conectivo. El mismo patólogo al que se le ocultaron todos los datos clínicos y biológicos realizó los exámenes histológicos. Se evaluaron los siguientes artículos histopatológicos y se puntuaron semicuantitativamente: 1) número de tractos portales completos; 2) número de venas centrales; 3) arquitectura parenquimal general; 4) inflamación lobular; 5) perivenulitis de vena central; 6) inflamación de tacto portal; 7) lesiones del conducto biliar; 8) pérdida del conducto biliar; 9) presencia de ramificaciones de la vena portal; 9) fibrosis portal; 10) fibrosis perisinusoidal.

Ejemplo 3. Extracción de ARN y tratamiento

Para extracción de ARN total se homogenizaron muestras de tejido hepático crioconservado en reactivo TRIzol (Invitrogen, San Diego, CA, Estados Unidos) utilizando una maza de mortero y tubos de reacción de 1,5 ml desprovistos de nucleasa (Ambion). A continuación, se extrajo el ARN total siguiendo la guía de los fabricantes y se evaluó la calidad con el bioanalizador 2100 Bioanalyzer de Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos).

Ejemplo 4. Experimentos de micromatriz de Illumina

Se trataron 105 muestras de ARN de hígado (20 TOL, 32 No-TOL, 14 No-TOL-Rej, 12 HEPC, 9 REJ, 8 CONTTx y 10 CONT; todas ellas del Hospital de Barcelona) en ARNc y se hibridaron en micromatrices HumanHT-12 Expression BeadChips de Illumina que contenían 48.771 sondas correspondientes a 25.000 genes anotados (Illumina, Inc. San Diego, CA, Estados Unidos). Se conmutaron los datos de expresión utilizando el software de análisis de datos BeadStudio (Illumina, Inc.) y después se trataron aplicando normalización por cuantiles utilizando el paquete lumi de bioconductor [6]. A continuación, se llevó a cabo una etapa de filtración con sonda conservadora excluyendo las sondas con un coeficiente de variación de 5 % que tuvo como resultado la selección de un total de 33.062 sondas del conjunto original de 48.771.

Ejemplo 5. Experimentos de micromatriz Affymetrix

En un grupo seleccionado de 10 receptores TOL y 10 No-TOL se replicaron los experimentos de micromatriz en Genoma Humano de matrices Affymetrix U133 Plus 2.0 que cubre 47.000 genes anotados por 54.675 sondas (Affymetrix, Inc, Santa Clara, CA, Estados Unidos) y que comprende sondas de ácido nucleico disponibles en el mercado. Se llevaron a cabo otros experimentos Affymetrix adicionales empleando ARN extraído de 4 muestras de hígado TOL – Post (4 de los 10 receptores TOL de los que se obtuvo el tejido de la biopsia de hígado 12 meses después de haber retirado completamente el fármaco también estuvieron disponibles). Se normalizaron los datos de expresión génica utilizando el algoritmo de multimatriz robusto ajustado al contenido de guanidina-citosina, que computa los valores de expresión de intensidades de sonda que incorpora información de secuencia de sonda. A continuación, se empleó una etapa de filtración de sonda conservadora excluyendo las sondas que no alcanzaron un valor de expresión $\log_2$ de 5 en al menos una muestra, con el resultado de la selección de un total de 18.768 muestras del conjunto original de 54.675.

Ejemplo 6. Análisis de los datos de expresión génica de micromatriz

Para identificar los genes que se expresaron de forma diferenciada entre los diferentes grupos de estudio de micromatriz, se empleó un *Análisis de micromatrices significativo* (SAM por sus siglas en inglés). SAM se vale de la estadística de la prueba t modificada para cada gen de un conjunto de datos y un factor compensatorio para computar el valor t, controlando así las desviaciones típicas irrealmente bajas para cada gen. Asimismo, SAM permite el control de la tasa de descubrimientos falsos (FDR) seleccionando un umbral para la diferencia entre el resultado de la prueba real y el resultado obtenido de la repetición de permutaciones de los grupos sometidos a ensayo. Para el estudio actual, los autores de la invención emplearon selección SAM aplicando una FDR <10 % y 1000 permutaciones. Para representar gráficamente las diferencias de expresión génica entre los diferentes grupos de estudio, se utilizó la lista de sondas filtradas completa para realizar un análisis de correspondencia incluido en la función *between group analysis* (análisis entre grupos) (BGA) implementado en el paquete *made4* (Culhane AC, et al. Bioinformatics 2005). Este método es capaz de visualizar datos de altas dimensiones como por ejemplo múltiples mediciones de expresión génica en un gráfico 2D en el que las áreas delimitadas por las elipses representan el 95 % de distribución binormal estimada de las puntuaciones de la muestra en los ejes primero y segundo. Para determinar si el grupo de genes de interés estaba significativamente asociado con el resultado clínico (tolerancia frente a rechazo), las variables clínicas (edad y género del donador y el receptor, tipo de terapia inmunosupresora, tiempo transcurrido desde el trasplante) y las características histológicas (contenido en hierro), los autores de la invención

emplearon el software Globaltest (Goeman, et al. Bioinformatics 2004). Se utilizó syntax dentro de este software para corregir la asociación encontrada entre la expresión génica y el resultado clínico por el posible efecto desorientador de las covariables clínicas con ruido encontradas estadísticamente diferentes entre receptores tolerantes y no tolerantes.

Ejemplo 7. Experimentos de PCR en tiempo real cuantitativa (PCRC)

Para validar los resultados de expresión de micromatriz, se midieron los patrones de expresión de un grupo de 104 genes diana y 3 genes constitutivos (**Tabla 1** suplementaria) empleando el sistema de detección de secuencia ABI 7900 y placas microfluídicas TaqMan LDA (Applied Biosystems, Carlsbad, Estados Unidos), que comprenden cebadores de oligonucleótido disponibles en el mercado, sobre un subgrupo de 48 receptores (18 TOL y 31 No-TOL; todos ellos del Hospital Clínico de Barcelona). Por otra parte, se realizaron los experimentos de PCRC en un grupo independiente de 10 receptores TOL y 11 No-TOL proporcionados por la Universidad Tor Vergata de Roma y la Universidad Hospitals de Lovaina y de los que no se disponía de los datos de micromatriz. Se seleccionaron genes diana sobre la base de: 1) los resultados de los experimentos de micromatriz Illumina y Affymetrix; 2) biomarcadores de transcripción de sangre descritos anteriormente por el grupo de los autores de la invención como asociados con tolerancia operativa de hígado (M. Martínez-Llordella et al. J Clin Invest 2008); y 3) genes inmunorreguladores prominentes descritos en la bibliografía. Se separó el ADN de preparados de total de ARN aplicando tratamiento con Turbo DNA-free DNase (Ambion) y, a continuación, se realizó la transcripción inversa en ADNc utilizando el Kit HighCapacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cuantificar los niveles de transcrito se normalizaron los valores Ct del gen diana a los genes constitutivos para generar valores ΔCt . A continuación, se computaron los resultados como expresión relativa entre ADNc de las muestras diana y una muestra calibrada de acuerdo con el método $\Delta\Delta Ct$. Se emplearon las tres muestras que se indican a continuación como calibradores: 1) ARN agrupado de 8 muestras CONT-Tx; 2) ARN agrupado de 10 muestras CONT; y 3) ARN de hígado disponible en el mercado (Human Liver Total RNA, Ambion).

Ejemplo 8. Identificación y validación de clasificadores de genes

Para desarrollar clasificadores de la expresión génica de PCRC basada en la biopsia para predecir el éxito de la retirada de la inmunosupresión, los autores de la invención llevaron a cabo una exhaustiva investigación para modelos predictivos empleando el análisis discriminante lineal y algoritmos de regresión logística incluidos en el software *missclassification penalized posterior* (MiPP). MiPP se basa en la modelización de clasificación incremental gradual de los modelos de diagnóstico más cuidadosos y emplea una estrategia de validación cruzada doble. En primer lugar, para obtener los modelos óptimos al mismo tiempo que se evitan los obstáculos de una gran búsqueda de rastreo, los autores de la invención realizaron una etapa de validación cruzada 10 veces sobre el conjunto de entrenamiento de 18 receptores de hígado TOL y 31 No-TOL del Hospital Clínico de Barcelona. A continuación, se llevó a cabo la validación cruzada de división aleatoria de los modelos de diagnóstico sobre todo el conjunto de datos (que incluyó las 56 muestras de Barcelona y las 21 muestras de Roma y Lovaina) repartiendo de forma repetida en conjunto de entrenamiento (2/3) y conjunto de prueba independiente (1/3) para validación del modelo externo. Para cada uno de los modelos identificados en el conjunto de entrenamiento, se computó el límite de probabilidad óptimo de tolerancia por análisis ROC. El uso de un gran número de divisiones aleatorias de los grupos de prueba y de entrenamiento permitió obtener vínculos de fiabilidad en la precisión del diagnóstico. Sobre la base de estos vínculos de fiabilidad, se obtuvieron, para cada uno de los clasificadores candidatos, el rendimiento de diagnóstico y las tasas de error de clasificación errónea media. Para demostrar que el rendimiento de los modelos no dependía del centro, se computó SN, SP, NPV, PPV y las tasas de error globales para las muestras recogidas de Barcelona y las obtenidas de Roma y Lovaina.

Ejemplo 9. Ensayo comparativo entre el método de diagnóstico de tolerancia de trasplante del estado de la técnica y el método de la invención

El método del estado de la técnica comprende la medición en muestras de sangre periférica de la expresión de grupos de genes (*KLRF1*, *PTGDR*, *NCALD*, *CD160*, *IL2RB*, *PTCH1*, *ERBB2*, *KLRB1*, *NKG7*, *KLRD1*, *FEZ1*, *GNPTAB*, *SLAMF7*, *CLIC3*, *CX3CR1*, *WDR67*, *MAN1A1*, *CD9*, *FLJ14213*, *FEM1C*, *CD244*, *PSMD14*, *CTBP2*, *ZNF295*, *ZNF267*, *RGS3*, *PDE4B*, *ALG8*, *GEMIN7*) a diferencia de lo que propone la presente invención. Por otra parte, este ejemplo demuestra que el método de la invención tiene un poder discriminativo superior.

El método del estado de la técnica da lugar a los siguientes resultados:

A) Combinación de *FEM1C* e *ILB*:

SN = 63 %; SP = 80,77 %; ER = 7,08 %; PPV = 77,68 %; NPV = 72,41 %

B) Combinación de *KLRF1* y *SLAMF7*

SN = 27,7 %, SP 92,31 %, ER = 37,5 %, PPV = 73,68 %, NPV = 72,41 %

C) Combinación de *KLRF1* e *IL2RB*

SN = 50 %, SP = 84,62 %, ER = 31,25 %, PPV = 73,33 %, NPV = 66,67 %

SN: sensibilidad

SP: especificidad

ER: tasa de error

PPV: valor predictivo positivo

NPV: valor predictivo negativo

Sin embargo, el método de la presente invención basado en la medición de los genes comprendidos en las **Tablas 3, 4 y 6** en tejido de hígado de los mismos 48 pacientes (se seleccionaron para este ensayo comparativo los tres modelos de mejor rendimiento) llevó a los siguientes resultados:

A) Combinación de *TFRC*, *CDHR2*, *HMOX1*, *MIF*, *HAMP*, *IFNG*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *ADORA3*:

SN = 77,27 %, SP = 96,15 %, ER = 12,5 %, PPV = 94,44 %, NPV = 83,33 %

B) Combinación de *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *ADORA3*

SN = 90,91 %, SP = 84,62 %, ER = 12,5 %, PPV = 83,33 %, NPV = 91,67 %

C) Combinación de *TFRC*, *IFNG*, *HAMP*, *CDHR2*

SN = 77,27 %, SP = 88,46 %, ER = 16,67 %, PPV = 85 %, NPV = 82,14 %

SN: sensibilidad

SP: especificidad

ER: tasa de error

PPV: valor predictivo positivo

NPV: valor predictivo negativo

Por lo tanto, se concluyó que la medición de la expresión de los genes comprendidos en la presente invención en muestras de tejido de hígado parece tener al menos la misma precisión que la medición de los genes comprendidos en el estado de la técnica en sangre periférica, para identificar los receptores de hígado que pueden abandonar con éxito la medicación inmunosupresora ya que son tolerantes al trasplante.

Ejemplo 10. Mediciones de ferritina en suero

Se obtuvieron muestras de suero de 64 receptores de hígado reclutados en el momento basal utilizando un vacutainer BD SST II (BD Bioscience, Franklin Lakes, Estados Unidos) y se almacenaron a -80 °C. Se llevaron a cabo las mediciones de ferritina en suero con un método ELISA automático. Los niveles serológicos de ferritina fueron significativamente más altos en los receptores tolerantes (TOL) que en los no tolerantes (no TOL) (**Figura 3A**). Se observó la ausencia de reservas de hierro (ferritina serológica <12 ng/ml, n indicador muy específico de deficiencia en hierro) exclusivamente entre los receptores no TOL (**Figura 3B**). La asociación entre hepcidina o ferritina y la tolerancia no se confundió con la edad del receptor, el tiempo transcurrido desde el trasplante o la terapia inmunosupresora en el momento basal, tal como lo demuestra el valor predictivo independiente en el análisis multivariable de regresión logística.

Dado que, tal como se muestra en la **Figura 3**, los niveles de ferritina en suero aumentan significativamente en los receptores tolerantes en comparación con los receptores de hierro no tolerantes, el nivel de ferritina es un marcador valioso para el diagnóstico y/o pronóstico del estado tolerante de un paciente que se va a someter a trasplante de hígado.

Ejemplo 11. Inmunotinción con fosfo-Stat3

Dada la capacidad de hepcidina, a través de la fosforilación de Janus quinasa (Jak2) para activar el transductor de señal del factor de transcripción y activador de transcripción 3 (Stat3) (De Domenico et al. J Clin Invest 2010), se llevó a cabo la cuantificación de Stat3 fosforilado en un subconjunto de biopsias de hígado de 12 pacientes tolerantes (TOL) y 13 no-tolerantes (No-TOL). Se desparafinizaron secciones de biopsia de hígado embebidas en parafina y se realizó la recuperación del antígeno por ebullición durante 15 min en EDTA 1 mM (pH 8,0). Posteriormente, se trataron las secciones con reactivos para reducir la contaminación de fondo (DAKO, Glostrup, Dinamarca) y se tiñeron con anticuerpo monoclonal de conejo fosfo-Stat3 (Tyr 705) (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones de los proveedores. Se desarrollaron inmunotinciones empleando sustrato DAB (DAKO) y utilizando contrateñido con hematoxilina. Se valoraron las imágenes utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600 y el software analysIS y se analizaron utilizando el Software Image J (NIH, Bethesda, Estados Unidos) según la reducción controlada umbral del canal azul, seguido de binarización y la medición de los píxel teñidos residuales. La fuerte tinción de fosfo-Stat3 se advirtió casi exclusivamente en núcleos de hepatocitos que se agruparon en foci distribuidos aleatoriamente a lo largo de las secciones de la biopsia. En

contraposición, la tinción fue débil y mucho menos frecuente en los núcleos de leucocitos mononucleares infiltrantes, macrófagos y células endoteliales.

En comparación con las muestras de los pacientes no tolerantes (no TOL), las biopsias de riñón de los pacientes tolerantes (TOL) presentaron un significativo aumento de la tinción fosfo-Stat3 de hepatocitos (**Figura 4**). Por lo tanto, el nivel de fosfo-Stat3 es un marcador valioso para el diagnóstico y/o pronóstico del estado tolerante de un paciente que se va a someter a trasplante.

Ejemplo 12. Evaluación del contenido en hierro del hígado

Para estimar la magnitud de las reservas de hierro intrahepáticas se tiñeron portaobjetos de muestras de hígado de 3 µm de grosor. Se evaluó semicuantitativamente el contenido en hierro empleando tanto el sistema modificado de Scheuer como el de recuento del total de hierro (TIS) según se ha descrito. (Deugnier et al. Hepatology 1993; Scheuer et al. J Pathol Bacteriol 1962). Por otra parte, se hizo el recuento de los hepatocitos y el mesenquimal con teñido de hierro (endotelio y célula de Kupffer). Se detectaron los depósitos de hierro de hepatocitos peri-portales moderados en la mayoría de las muestras de hierro recogidas de pacientes tolerantes (TOL). En contraposición, no se observó hierro teñible en las biopsias de hígado de receptores no tolerantes (no TOL) (**Figura 1A**). Estas diferencias se debieron exclusivamente a los hepatocitos, más que a la acumulación de hierro mesenquimal. Las diferencias en las reservas de hierro entre TOL y no TOL podrían utilizarse para discriminar entre dos grupos de pacientes independientemente del tiempo transcurrido desde el trasplante o el tipo de fármacos inmunosupresores administrado (**Figura 1B**).

Dado que, tal como se muestra en la **Figura 1**, el contenido en hierro del hígado es significativamente más alto en los hígados de pacientes tolerantes que pueden abandonar con éxito la terapia inmunosupresora (TOL) que en los pacientes no tolerantes en los que no es posible (no TOL), el nivel de hierro se puede utilizar como un valioso marcador para el diagnóstico y/o pronóstico del estado tolerante de un paciente sometido a trasplante de hígado.

REFERENCIAS

1. Lerut, J., and Sanchez-Fueyo, A. 2006. An appraisal of tolerance in liver transplantation. Am J Transplant 6:1774-1780.
2. N. Najafian et al., "How can we measure immunologic tolerance in humans?" J. Am. Soc. Nephrol. 2006, vol. 17, pp. 2652-63.
3. Newell et al., "Tolerant assays: measuring the unknown", Transplantation 2006, vol. 81, pp. 1503-9.
4. J. Cai et al., "Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance", J. Exp. Med. 2004, vol. 199, pp. 1017-23.
5. E. Jankowska-Gan E et al., "Human liver allograft acceptance and the "tolerance assay", Hum. Immunol. 2002, vol. 63, pp. 862-70.
6. P. Sagoo et al., "Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans", J.Clin. Invest. 2010, vol. 120, pp. 1848-61.
7. S. Brouard et al., "Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation", Am. J. Transplant. 2005, vol. 5, pp. 330-40.
8. G.V. Mazariegos et al., "Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients", Am. J. Transplant. 2003, vol. 3, pp. 689-96.
9. Y. Li et al., "Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation", Am. J. Transplant. 2004, vol. 4, pp. 2118-25.
10. M. Martínez-Llordella et al. Multiparameter of immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. Am. J. Transplant. 2007, vol. 7, pp.309-19.
11. I.Puig-Pey et al. Characterization of gammadelta T cell subsets in organ transplantation. Transplant. Int. 2010. Epub.
12. S. Brouard et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2007, vol. 104, pp. 15448-53.
13. K.A. Newell et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. J. Clin. Invest. 2010, vol. 120, pp. 1836-47.
14. Y.M. Deugnier et al. Differentiation between heterozygotes and homozygotes in genetic hemochromatosis by means of a histological hepatic iron index: a study of 192 cases. Hepatology 1993, vol. 17, pp. 30-4.
15. P.J. Scheuer et al. Hepatic pathology in relatives of patients with haemochromatosis. J. Pathol. Bacteriol. 1962, vol. 84, pp. 53-64.
16. A.C. Culhane et al. MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. Bioinformatics. 2005, vol. 21, pp. 2789-90.
17. J.J.Goeman et al. A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. Bioinformatics. 2004, vol. 20, pp. 93-9.
18. De Domenico, I., et al. Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. The Journal of clinical investigation 120, 2395-2405 (2010).
19. Bohne F. et al. Transcriptional profiling of liver grafts in spontaneous operational tolerance. Transplantation 2010, 90, 1559, página 13.

20. Sanchez-Fueyo A., et al. In vitro diagnosis/prognosis method and kit for assessment of tolerance liver transplantation. WO2010/000320.

REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* del estado tolerante de un paciente sometido a trasplante de hígado que comprende:

- a. Evaluar el nivel de reservas de hierro sistémicas y/o intrahepáticas en una muestra biológica obtenida de dicho paciente y
- b. Evaluar el estado de tolerancia o no tolerancia del paciente de trasplante de hígado investigado comparando el nivel de reservas de hierro sistémicas y/o intrahepáticas de la etapa a, ya sea con el nivel de reservas de hierro sistémicas o intrahepáticas tomado de una muestra de referencia o con un umbral determinado previamente, en la que la evaluación del estado de tolerancia o no tolerancia se lleva a cabo midiendo en una muestra biológica obtenida del aloinjerto de hígado del paciente investigado el nivel de expresión de al menos uno de los siguientes genes o combinación de los mismos: *TFRC*, *CDHR2*, *HMOX1*, *MIF*, *HAMP*, *IFNG*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *ADORA3* y *DAB2* y evaluando la tolerancia o no tolerancia del paciente investigado a un trasplante de hígado comparando el nivel de expresión de al menos uno de los genes o combinaciones de los mismos con el nivel de expresión de los mismos genes o combinaciones de los mismos tomados de una muestra de referencia.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra utilizada para medir la expresión génica es una muestra de ARN seleccionada de: una agrupación de ARNs obtenidos de tejido de hígado no trasplantado sano; un ARN de referencia disponible en el mercado; o un ARN de referencia absoluto que consiste en una muestra que contiene un número de moléculas de ARN cuantificado previamente.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** los genes *TFRC* y *MIF* se regulan a la baja y los genes *CDHR2*, *HMOX1*, *HAMP*, *IFNG*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *ADORA3* y *DAB2* se regulan al alza en receptores de trasplante de hígado tolerante en comparación con el nivel de expresión de los mismos genes tomados de una muestra de ARN de referencia.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por** comprender las mediciones de los niveles de expresión de al menos una de las siguientes combinaciones de genes: *LC5A12*, *VNN3*, *TFRC*, *SOCS1*, *MIF*, *TTC3*, *RBM23*, *PEBP1*, *SH2D1B*, *NCR1*, *DAB2* y *ADORA3*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *HAMP*, *TUBA4A*, *TTC3*, *HMOX1*, *VNN3*, *NCR1*, *ADORA3*, *TAF15*, *IFNG*, *SOCS1* y *TIPARP*; *MOX1*, *CDHR2*, *MIF*, *PEBP1*, *TFRC*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *HAMP*, *VNN3* y *IFNG*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *SLC5A12*, *HAMP*, *SOCS1*, *IFNG* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *HAMP*, *MIF*, *PEBP1*, *VNN3*, *SOCS1*, *HMOX1* y *DAB2*; *TFRC*, *DAB2*, *MIF*, *PEBP1*, *IFNG*, *HAMP*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *VNN3*, *ADORA3*, *CDHR2*, *MCOLN1* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *HMOX1*, *MCOLN1*, *MIF*, *HAMP*, *ADORA3*, *CDHR2*, *PEBP1* y *SOCS1*; *EBP1*, *TFRC*, *HMOX1*, *IFNG*, *MCOLN1*, *SOCS1*, *MIF*, *CDHR2*, *HAMP* y *ADORA3*; *TFRC*, *PEBP1*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *VNN3*, *HMOX1*, *DAB2*, *SOCS1*, *MIF* y *HAMP*; *DHR2*, *ADORA3*, *IFNG*, *TFRC*, *VNN3*, *HMOX1*, *PEBP1*, *MIF*, *SLC5A12*, *HAMP*, *SOCS1* y *MCOLN1*; *LC5A12*, *TFRC*, *IFNG*, *MIF*, *DAB2*, *HMOX1*, *CDHR2*, *SOCS1*, *HAMP*, *PEBP1*, *VNN3*, *ADORA3* y *MCOLN1*; *TFRC*, *SOCS1*, *HMOX1*, *PEBP1*, *VNN3*, *CDHR2*, *HAMP*, *IFNG*, *DAB2*, *MCOLN1*, *ADORA3* y *MIF*; *TFRC*, *PEBP1*, *VNN3*, *SOCS1*, *MIF*, *HMOX1*, *DAB2*, *HAMP*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3* y *MCOLN1*; *LC5A12*, *MIF*, *CDHR2*, *TFRC*, *IFNG*, *ADORA3*, *HAMP*, *VNN3*, *SOCS1*, *MCOLN1*, *PEBP1* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *PEBP1*, *VNN3*, *MIF*, *HMOX1*, *MCOLN1*, *SOCS1*, *SLC5A12*, *DAB2* y *HAMP*; *TFRC*, *VNN3*, *HAMP*, *CDHR2*, *SLC5A12*, *HMOX1*, *SOCS1*, *PEBP1* y *MIF*; *AB2*, *TFRC*, *MIF*, *CDHR2*, *PEBP1*, *VNN3*, *TTC3*, *HMOX1* y *SOCS1*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *VNN3*, *IFNG*, *MCOLN1* y *SOCS1*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *SOCS1* y *CDHR2*; *ADORA3*, *CDHR2*, *MIF*, *PEBP1*, *TAF15* y *TFRC*; *CDHR2*, *MIF*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *TAF15* y *TFRC*; *ADORA3*, *CDHR2*, *HAMP*, *MIF*, *PEBP1*, *SOCS1*, *TAF15* y *TFRC*; *CDHR2*, *HAMP*, *IFNG*, *MCOLN1*, *MIF*, *PEBP1*, *SOCS1*, *TFRC* y *VNN3*.

5. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se mide el nivel de expresión de la combinación de genes que consiste en *TFRC*, *IFNG* y *CDHR2*.

6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende además la determinación de al menos un parámetro adicional útil para el diagnóstico y/o pronóstico del estado tolerante de un paciente sometido a trasplante de hígado, seleccionado entre la edad y/o el período de tiempo transcurrido desde el trasplante y/o el nivel de proteína ferritina en una muestra de suero obtenida de dicho paciente.

7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el nivel de ferritina en suero <12 ng/ml indica que el estado del paciente es un estado no tolerante.

Figura 1

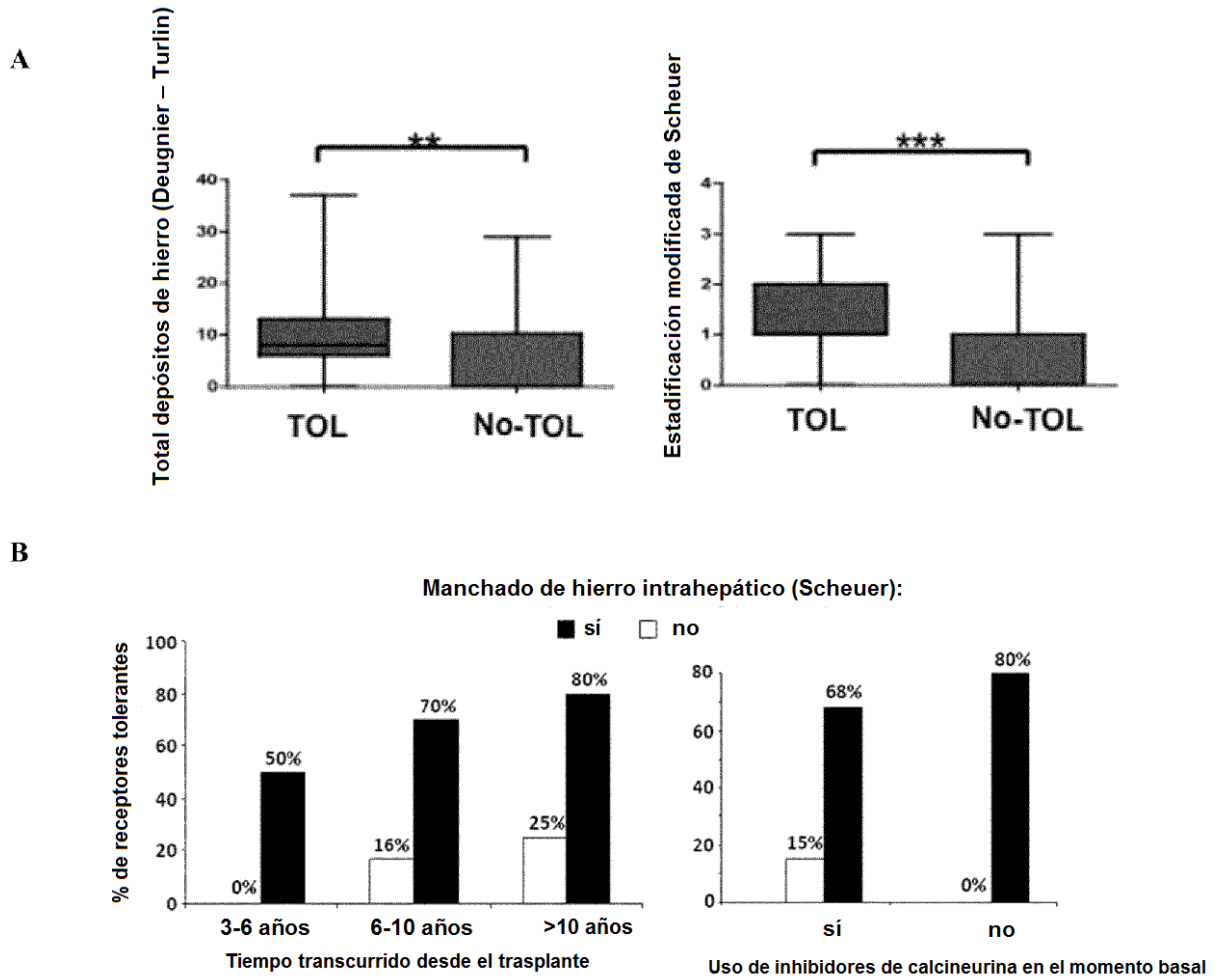


Figura 2

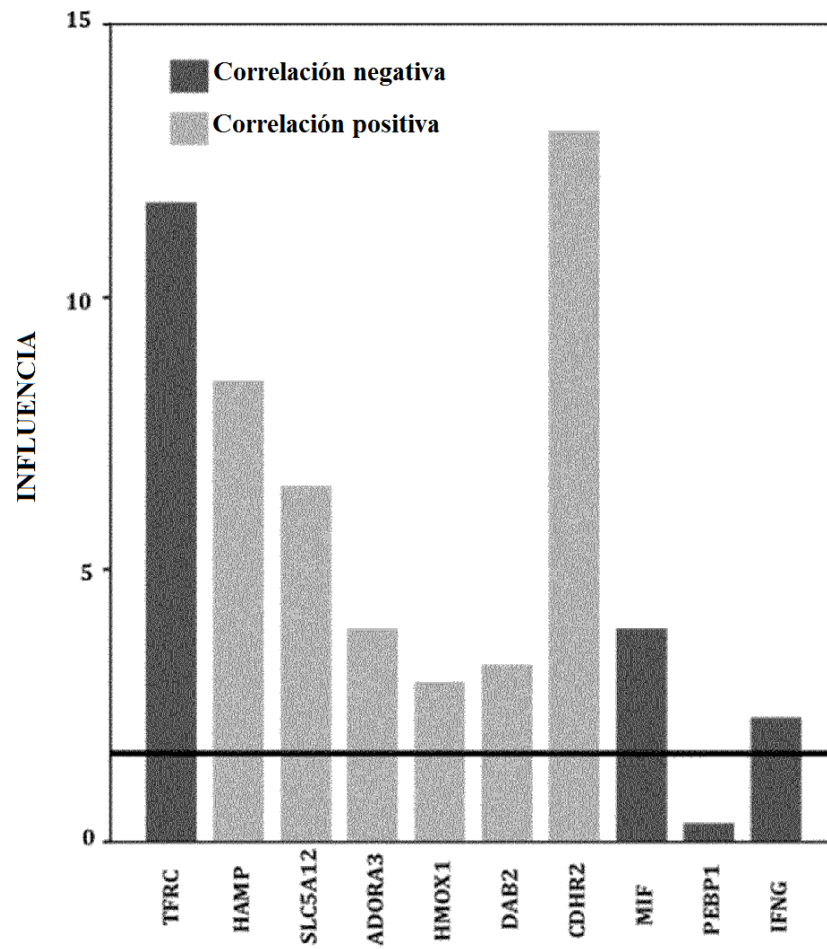
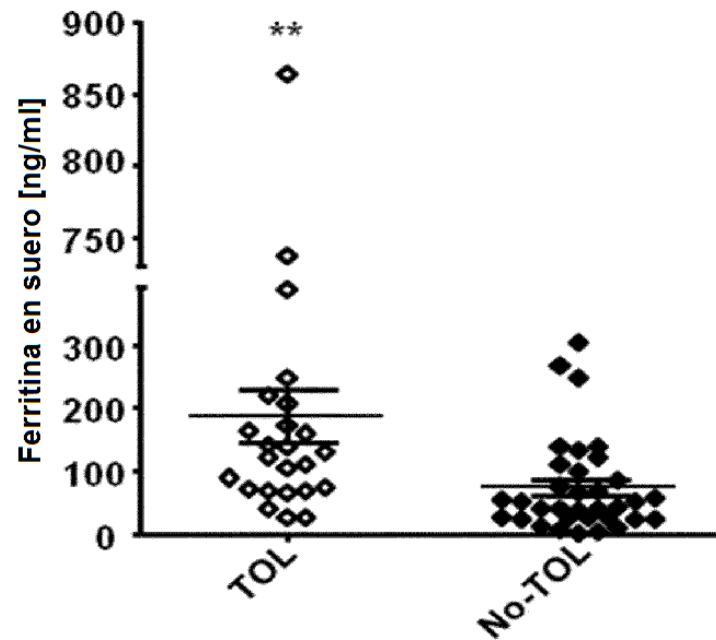


Figura 3

A



B

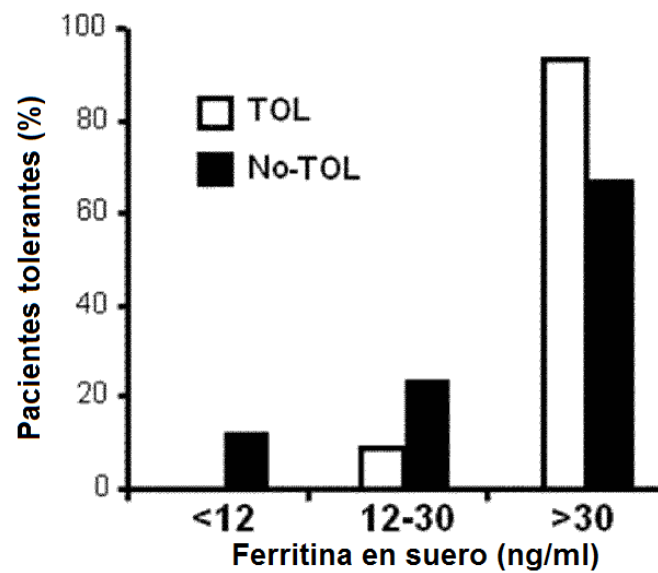
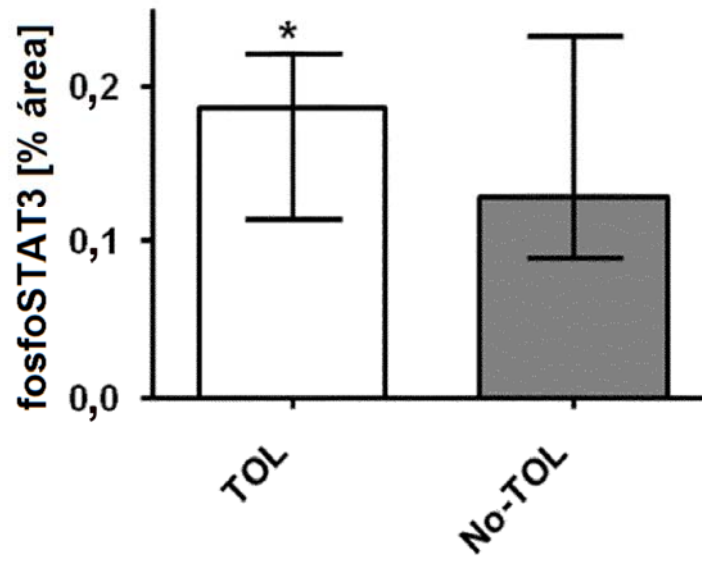


Figura 4



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2010000320 A, A. Sánchez-Fueyo [0004]
[0056]

Literatura no patente citada en la descripción

- S.BROUARD et al. *PNAS*, 2007 [0004]
- M. MARTINEZ-LLORDELLA et al. *J Clin Invest*, 2008 [0004]
- K.NEWELL et al. *J Clin Invest*, 2010 [0004]
- P.SAGOO et al. *J Clin Invest*, 2010 [0004]
- F. BOHNE et al. *Transplantation*, 2010 [0004]
- CULHANE AC et al. *Bioinformatics*, 2005 [0043]
- GOEMAN et al. *Bioinformatics*, 2004 [0043]
- M.MARTINEZ-LLORDELLA et al. *J Clin Invest*, 2008 [0044]
- DE DOMENICO et al. *J Clin Invest*, 2010 [0052]
- DEUGNIER et al. *Hepatology*, 1993 [0054]
- SCHEUER et al. *J Pathol Bacteriol*, 1962 [0054]
- LERUT, J. ; SANCHEZ-FUEYO, A. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant*, 2006, vol. 6, 1774-1780 [0056]
- N. NAJAFIAN et al. How can we measure immunologic tolerance in humans?. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2006, vol. 17, 2652-63 [0056]
- NEWELL et al. Tolerant assays: measuring the unknown. *Transplantation*, 2006, vol. 81, 1503-9 [0056]
- J. CAI et al. Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. *J. Exp. Med.*, 2004, vol. 199, 1017-23 [0056]
- E. JANKOWSKA-GANE et al. Human liver allograft acceptance and the "tolerance assay. *Hum. Immunol.*, 2002, vol. 63, 862-70 [0056]
- P. SAGOO et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J.Clin. Invest.*, 2010, vol. 120, 1848-61 [0056]
- S. BROUARD et al. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am. J. Transplant.*, 2005, vol. 5, 330-40 [0056]
- G.V. MAZARIEGOS et al. Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients. *Am. J. Transplant.*, 2003, vol. 3, 689-96 [0056]
- Y. LI et al. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am. J. Transplant.*, 2004, vol. 4, 2118-25 [0056]
- M. MARTINEZ-LLORDELLA et al. Multiparameter of immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am. J. Transplant.*, 2007, vol. 7, 309-19 [0056]
- I.PUIG-PEY et al. Characterization of gammadelta T cell subsets in organ transplantation. *Transplant. Int.*, 2010 [0056]
- S. BROUARD et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2007, vol. 104, 15448-53 [0056]
- K.A. NEWELL et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.*, 2010, vol. 120, 1836-47 [0056]
- Y.M. DEUGNIER et al. Differentiation between heterozygotes and homozygotes in genetic hemochromatosis by means of a histological hepatic iron index: a study of 192 cases. *Hepatology*, 1993, vol. 17, 30-4 [0056]
- P.J. SCHEUER et al. Hepatic pathology in relatives of patients with haemochromatosis. *J. Pathol. Bacteriol.*, 1962, vol. 84, 53-64 [0056]
- A.C. CULHANE et al. MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. *Bioinformatics*, 2005, vol. 21, 2789-90 [0056]
- J.J.GOEMAN et al. A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics*, 2004, vol. 20, 93-9 [0056]
- DE DOMENICO, I. et al. Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *The Journal of clinical investigation*, 2010, vol. 120, 2395-2405 [0056]
- BOHNE F. et al. Transcriptional profiling of liver grafts in spontaneous operational tolerance. *Transplantation*, 2010, vol. 90 (1559), 13 [0056]