



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE
LA SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS ASOCIADOS A LA
ENFERMEDAD RELACIONADA A IGG4

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
DR. EDUARDO MARTÍN NARES

TUTOR PRINCIPAL
DRA. GABRIELA HERNANDEZ MOLINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA.
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

DR. JOAQUÍN ZUÑIGA RAMOS.
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice.

Introducción	1
Planteamiento del problema	4
Justificación	4
Pregunta de Investigación	5
Hipótesis	5
Objetivos	5
Metodología	7
Diseño del estudio	7
Tamaño de la muestra	7
Población del estudio	7
Criterios de inclusión	8
Criterios de exclusión	8
Criterios de eliminación	8
Procedimientos	8
Cuestiones éticas	11
Análisis y métodos estadísticos	11
Resultados	11
Discusión	20
Referencias	31
Material suplementario	39

Caracterización de los mecanismos inmunológicos asociados a la Enfermedad Relacionada a IgG4.

1. Introducción.

La enfermedad relacionada a IgG4 (ER-IgG4) es una enfermedad inflamatoria multisistémica caracterizada por lesiones fibroesclerosantes formadoras de masas o pseudotumores, concentraciones elevadas de IgG4 sérica e infiltración tisular por células plasmáticas IgG4 positivas. Dicha enfermedad incluye múltiples condiciones que previamente eran consideradas idiopáticas y órgano-específicas como la pancreatitis autoinmune, el síndrome de Mikulicz o la tiroiditis de Reidel.¹ La asociación entre pancreatitis autoinmune y niveles elevados de IgG4 sérica fue descrita por primera vez por Hamano y colaboradores en 2001. Fue hasta el año 2003 cuando se reconoció la naturaleza sistémica de la pancreatitis autoinmune y en el año 2010 fue cuando a dicha entidad se le comenzó a llamar “enfermedad relacionada a IgG4”.²⁻⁵

El grupo etario más afectado son los hombres en la 6° década de la vida; la edad promedio al diagnóstico es de 67 años y la relación hombre/mujer es de 3:1.¹ Sin embargo, en población mexicana la enfermedad se presenta una década más temprano y la relación hombre/mujer es casi 1:1.⁶

La ER-IgG4 ha sido descrita en prácticamente cualquier órgano. La presentación de la ER-IgG4 es muy variable y depende de que órganos están afectados. La prevalencia de las manifestaciones en cada órgano varía de acuerdo a la población estudiada; en las series reportadas los órganos más comúnmente afectados son páncreas, glándulas salivales, glándulas lacrimales, ganglios linfáticos, retroperitoneo y riñones.⁶⁻⁸ Además, algunos pacientes refieren una historia de atopia previa al inicio y al diagnóstico de la ER-IgG4, que en las diversas series se reporta entre el 20-60%.¹ Debido a la gran heterogeneidad clínica de esta entidad, muy recientemente se han propuesto una clasificación en 4 fenotipos clínicos: pancreato-hepatobiliar, limitado a cabeza y cuello, Mikulicz con afección sistémica y retroperitoneal/aórtico. Cada subgrupo difiere de los demás con respecto a la edad

de presentación, sexo, raza, número de órganos afectados, concentraciones de IgG4 séricas y presencia de hipocomplementemia.⁹ Otra forma de clasificar a los pacientes es de acuerdo a fenotipo proliferativo y fibrótico; en el primero predominan manifestaciones propias de órganos glandulares y epiteliales como glándulas salivales, páncreas o pulmón, mientras que en el segundo la afección es de sitios anatómicos como el retroperitoneo o el mediastino. Estos subgrupos también difieren en características serológicas y respuesta a tratamiento.¹⁰

1.1. Patogénesis.

La patogénesis de la ER-IgG4 no está completamente definida. Inicialmente se pensó que los linfocitos B eran la subpoblación celular predominante en la enfermedad. No obstante, en los últimos años también se ha reconocido el papel del linfocito T, así como de otros elementos del sistema inmune en la fisiopatogenia de la ER-IgG4.

Para que las células plasmáticas produzcan IgG4 se requieren citocinas de la respuesta Th2 como son la IL-4 e IL-13 y la cooperación de la IL-10 producida por las células T. En 2007, Zen y cols. determinaron mediante PCR cuantitativa e hibridación *in situ* en tejidos de pacientes con ER-IgG4 y observaron que las citocinas de la respuesta Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), se encontraban aumentadas en comparación con diversos controles con otras enfermedades (e.g. Síndrome de Sjögren, colangitis esclerosante primaria, sialolitiasis); así mismo, encontraron una mayor expresión de citocinas reguladoras como IL-10 y TGF- β y del factor de transcripción FOXP3, implicando a las células Th2 y las células Tregs FOXP3+ en la patogénesis de la ER-IgG4.¹¹ Diversos estudios en otras poblaciones corroboraron estos hallazgos.¹²⁻¹⁴ Sin embargo, dichos estudios no analizaron si el hallazgo de un aumento en la respuesta Th2 se limitaba a los pacientes con ER-IgG4 que tenían antecedente de atopía. Posteriormente, Mattoo y cols. encontraron que solo los pacientes con ER-IgG4 con antecedente de atopía tenían mayor cantidad de células Th2 circulantes.¹⁵

La primera evidencia de la implicación de las células B en la ER-IgG4 se obtuvo a partir de los estudios preliminares del tratamiento con Rituximab, el cual inducía la

remisión de la enfermedad y la mejoría de la fibrosis tisular. Estudios subsecuentes realizados en pacientes con ER-IgG4 activa identificaron una población de plasmablastos oligoclonales circulantes CD19+CD20-CD27+CD38+ cuyo descenso en sangre periférica correlacionaba con la mejoría clínica de los pacientes. Estos plasmablastos, una vez en la circulación, se diferencian a células plasmáticas provocando el exceso en la producción de IgG4.¹⁶ Además, la célula B contribuye directamente a la fibrosis tisular en la ER-IgG4 mediante la activación de fibroblastos, la secreción de factores pro-fibróticos solubles, la secreción de señales quimiotácticas para subpoblaciones celulares pro-fibróticas, la producción de colágena y la organización de la matriz extracelular.¹⁷

En los últimos años una nueva subpoblación de células T CD4+ efectoras, de memoria, con función citotóxica que expresan la proteína de superficie SLAMF7 (CD319 o CRACC) y productoras de IL-1 β , TGF- β 1 e IFN- γ , han sido detectadas en los pacientes con ER-IgG4. La evidencia actual sugiere que esta población celular juega un papel importante en la inducción de la inflamación y la fibrosis en esta enfermedad. Estos linfocitos T CD4+ citotóxicos se encuentran incrementados tanto en sangre periférica como en los órganos afectados en pacientes con ER-IgG4. Además, el tratamiento con Rituximab provoca un descenso de dichos linfocitos, apoyando el concepto de que tanto células B como células T están involucradas en esta enfermedad.¹⁸⁻²⁰

Por otra parte, las células T cooperadoras foliculares (Tfh, por sus siglas en inglés) participan en la diferenciación de las células B durante su desarrollo y contribuyen al cambio de isotipo de las inmunoglobulinas. Un estudio demostró que, de entre las distintas subpoblaciones de células Tfh, las células Tfh2 inducían la diferenciación de células B vírgenes a plasmablastos con la subsecuente producción de IgG4 en pacientes con ER-IgG4 activa y sin tratamiento. Las células Tfh2 se encuentran incrementadas en pacientes con ER-IgG4 y su concentración se correlaciona con la actividad de la enfermedad, la concentración de plasmablastos y los niveles de IgG4 sérica.^{21,22}

Asimismo ellos macrófagos M2 y otras células del sistema inmune innato se han implicado también en la patogénesis de la ER-IgG4. Furukawa y cols. encontraron

que los pacientes con ER-IgG4 tenían mayor cantidad de células CD68+, CD163+, CD11c+ y CD123+ y mayor expresión de IL-33, su receptor ST2, IL-4 e IL-13 en biopsias de glándulas salivales en comparación con pacientes con síndrome de Sjögren y controles sanos, implicando a la IL-33 producida por los macrófagos M2 en la perpetuación de la respuesta Th2.²³ Un estudio reciente demostró que este proceso se debía a la estimulación del TLR7 en macrófagos M2 CD163+.²⁴

En resumen, dos respuestas inmunológicas paralelas están presentes en la ER-IgG4; por un lado, un proceso proinflamatorio caracterizado por expansión de un subtipo particular de linfocitos (e.j. células T CD4+ citotóxicas), y como consecuencia de esto, un proceso antiinflamatorio profibrótico caracterizado por subpoblaciones celulares productoras de citocinas profibróticas (e.j. macrófagos M2) y citocinas que permiten el cambio de subclase a IgG4 (e. j. células Th2, células Tfh).

2. Planteamiento del problema.

La visión actual de la fisiopatología de la ER-IgG4 es que la combinación de los mecanismos biológicos expuestos anteriormente provoca la fibrosis propia de la enfermedad, la formación de pseudotumores y los hallazgos clínicos observados. Específicamente, la evidencia actual apunta a que las subpoblaciones celulares más importantes en la patogénesis de la enfermedad son las células Th2, los plasmablastos, las células T foliculares y las células T CD4+ citotóxicas. Sin embargo, se desconoce aún en gran medida la participación de diversas poblaciones celulares como las células T y B reguladoras, los macrófagos y las células dendríticas.

3. Justificación.

Replicar los estudios realizados con otras poblaciones (principalmente asiáticos y caucásicos), en pacientes hispanos con ER-IgG4, incluyendo la identificación de subpoblaciones celulares, contribuirá a darle mayor peso a la evidencia ya descrita. Asimismo, la identificación del papel de otras subpoblaciones celulares permitirá dilucidar los mecanismos inmunológicos que ocasionan la ER-IgG4. Finalmente, en

los estudios mencionados se incluyeron pacientes con solo un fenotipo clínico o manifestación de la enfermedad (e.j. síndrome de Mikulicz o pancreatitis autoinmune), o pacientes de todos los fenotipos pero sin analizar las diferencias en las subpoblaciones celulares entre los distintos fenotipos, lo cual realizaremos con el presente estudio, basados en la premisa de que diferentes inmunofenotipos podrían explicar la variabilidad de la presentación clínica y los diferentes fenotipos clínicos de la ER-IgG4.

4. Pregunta de investigación.

¿Las subpoblaciones de células productoras de citocinas proinflamatorias, profibróticas y facilitadoras del cambio de isotipo a IgG4 se encuentran aumentadas en pacientes hispanos con ER-IgG4 en comparación con controles sanos y son distintas entre fenotipos clínicos?

5. Hipótesis.

H₀: Las subpoblaciones de células productoras de citocinas proinflamatorias, profibróticas y facilitadoras del cambio de isotipo a IgG4 no se encuentran aumentadas en pacientes con ER-IgG4 en comparación con controles sanos y no son distintas entre fenotipos clínicos.

H_A: Las subpoblaciones de células productoras de citocinas proinflamatorias, profibróticas y facilitadoras del cambio de isotipo a IgG4 se encuentran aumentadas en pacientes con ER-IgG4 en comparación con controles sanos y son distintas entre fenotipos clínicos.

6. Objetivos.

6.1. Objetivo General.

Cuantificar las subpoblaciones celulares que pudieran estar involucradas en la fisiopatogenia de la ER-IgG4 y sus diferencias de acuerdo al fenotipo clínico.

6.2. Objetivos particulares.

1. Cuantificar el porcentaje relativo de la subpoblación de células Th2 circulantes en pacientes con ER-IgG4 y en controles sanos por citometría de flujo.
2. Cuantificar el porcentaje relativo de células Th9 circulantes en los pacientes y en controles sanos por citometría de flujo.
3. Cuantificar el porcentaje relativo de la subpoblación de células T CD4+ citotóxicas circulantes en pacientes con ER-IgG4 y en controles sanos por citometría de flujo.
4. Evaluar células Tfh circulantes (Tfh17, Tfh2, Tfh1, Tfr) en pacientes y controles por citometría de flujo.
5. Evaluar la presencia de células T reguladoras (Tregs) Foxp3⁺ en sangre periférica de los pacientes y controles por citometría de flujo.
6. Evaluar la presencia de células T reguladoras 1 (Tr1) productoras de IL-10 en sangre periférica de los pacientes y controles por citometría de flujo.
7. Evaluar la presencia de células T reguladoras 3 (Th3) productoras de TGF- β 1 en sangre periférica de los pacientes y controles por citometría de flujo.
8. Evaluar la presencia de células Bregs productoras de IL-10 en sangre periférica de los pacientes y controles por citometría de flujo.
9. Evaluar la presencia de células dendríticas productoras de IL-10 en sangre periférica de los pacientes y controles por citometría de flujo.
10. Determinar la proporción de macrófagos M1 productores de TNF- α y M2 productores de IL-33 circulantes por citometría de flujo.
11. Comparar las poblaciones celulares mencionadas previamente entre paciente con ER-IgG4 y controles sanos.
12. Comparar las poblaciones celulares de acuerdo al fenotipo clínico de ER-IgG4.
13. Comparar las poblaciones celulares de acuerdo al estado de actividad.

7. Metodología.

7.1. Diseño del estudio.

Estudio transversal, observacional, comparativo. Los pacientes provienen de la cohorte de ER-IgG4 del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

7.2. Tamaño de la muestra.

Al no existir estudios previos para todas de las subpoblaciones celulares estudiadas, nos basamos para el cálculo del tamaño de la muestra en dos estudios previos en donde se evaluaron dos de las subpoblaciones de interés.

Para el cálculo de las células Treg FOXP3+¹³, se empleó la fórmula de comparación de promedios entre pacientes con ER-IgG4 y controles sanos.

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

Donde Z_{α} fue de 1.96 y Z_{β} de 0.84. Con lo anterior, el tamaño de muestra fue de 25 pacientes con ER-IgG4 y 25 controles.

Por otra parte, para el cálculo del tamaño de la muestra de células Tfh²¹, se empleó la fórmula de comparación de proporciones, entre pacientes con ER-IgG4 y controles sanos.

$$n = \frac{[Z_{\alpha} * \sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta} * \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}]^2}{(p_1 - p_2)}$$

Con la cual se obtuvo un tamaño de muestra de 29 pacientes con ER-IgG4 y 29 controles.

7.3. Población del estudio.

Los pacientes provienen de la cohorte de ER-IgG4 del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se les invitó a participar ya sea por medio de una llamada telefónica o cuando acudían a alguna de sus citas médicas ya programadas. En caso de que el paciente estuviera hospitalizado se le instó a

participar en ese momento. Los pacientes que fueron diagnosticados con ER-IgG4 durante el periodo de inclusión, también fueron invitados a participar. Se incluyeron sujetos sanos reclutados del Banco de Sangre (*buffy coats*) como controles.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con diagnóstico de ER-IgG4 de acuerdo al *Comprehensive Diagnostic Criteria for IgG4-related disease*²⁵ independientemente del estado de actividad de la enfermedad.
2. Controles sanos pareados por género y edad.
3. Pacientes y controles que cuenten con consentimiento informado por escrito.

Criterios de exclusión:

1. Diagnóstico concomitante de otra enfermedad autoinmune sistémica.
2. Pacientes con infección activa.
3. Pacientes con diagnóstico de neoplasia.

Criterios de eliminación:

1. Ninguno.

7.4. Procedimientos.

Se realizó una revisión estandarizada del expediente clínico para obtener los datos demográficos (edad, sexo) y clínicos como tiempo de evolución, número de órganos afectados, comorbilidades, tratamiento, actividad al momento de ser incluido y daño de la enfermedad. Los pacientes fueron clasificados en los siguientes fenotipos descritos por Wallace y cols: (1) pancreato-hepatobiliar, (2) retroperitoneal/aórtico (3) limitado a cabeza y cuello, y (4) Mikulicz con afección sistémica; y de acuerdo a los fenotipos descritos por Zhang y cols: (1) proliferativo y (2) fibrótico.^{9,10} Se determinó el Índice de Respuesta IgG4-RD (IR-ER-IgG4), instrumento validado para la evaluación de actividad de la enfermedad, al momento del reclutamiento.²⁶ Se definió como enfermedad activa a la presencia de síntomas y signos clínicos y hallazgos imagenológicos inequívocos de afección por ER-IgG4. Se definió como enfermedad inactiva a la ausencia de síntomas y signos clínicos y hallazgos imagenológicos de afección por ER-IgG4. Se definió como enfermedad activa de

novo a la presencia de síntomas y signos clínicos y hallazgos imagenológicos inequívocos de afección por ER-IgG4 durante el primer episodio de la enfermedad. Se definió como recaída a la reaparición de síntomas y signos clínicos y hallazgos imagenológicos inequívocos de afección por ER-IgG4 en aquellos pacientes que ya habían tenido un estado de enfermedad inactiva. Se definió como enfermedad activa persistente a la presencia de síntomas y signos clínicos y hallazgos imagenológicos inequívocos de afección por ER-IgG4 a pesar de tratamiento inmunosupresor.

Se clasificó a los pacientes en atópicos o no atópicos de acuerdo a las definiciones de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica.²⁷

Se determinó en sangre periférica la concentración de IgG1 e IgG4 sérica total (The BindingSite) al momento de la inclusión mediante turbidimetría (Spa Plus) en los pacientes con ER-IgG4 y se expresó en mg/dl. Se consideró alta IgG1 > 928 mg/dl e IgG4 > 86 mg/dl, de acuerdo a valores de referencia del proveedor.

Además, se registró el uso de glucocorticoides e inmunosupresores al momento del reclutamiento.

7.5. Inmunofenotipificación mediante citometría de flujo.

Se obtuvo sangre periférica y se aislaron las células mononucleares mediante gradiente de densidad con Lymphoprep. Se purificaron las células T CD4+ de memoria mediante selección negativa utilizando un cóctel de anticuerpos biotinados contra CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD45RA, CD56, CD123, TCR γ/δ y glicoporina A y perlas con anticuerpos anti-biotina. Se realizó bloqueo de receptores Fc utilizando Human trueStain FcXTM. Los siguientes anticuerpos monoclonales se utilizaron: anti-CD4-PerCyP, anti-CD14-APC, anti-SLAMF7-APC, anti-ICOS-ALEXA488, anti CXCR5-APC, anti-CD163-PerCyP, anti CD86-FITC, anti-CD25-APC, anti-CD127-PE, anti-CD24-FITC, anti-CD38-PerCyP o anti-CD19-APC (BD Biosciences, San Jose, CA; TONBO). La tinción intracelular se lleva a cabo mediante la incubación con 5 μ L de los siguientes anticuerpos: anti-IL-13-FITC, anti IL-4-PE, anti-IL-17A-PE, anti-IFN- γ -PE, anti-Foxp3-PE, anti-IL-10-PE, anti-IL-5-PE,

anti-IL-9-PE, anti-IL-21-PE, anti-IL-1 β -PE, anti-TGF- β 1-ALEXA488, anti-IL33-PE, anti-IL-10-PE, anti-FoxP3-ALEXA488 o anti-TNF- α -FITC-PE (BD Biosciences).

Finalmente, un total de 500,000–1,000,000 de eventos se adquirieron de cada muestra en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences) y se analizaron con el programa FlowJo X software (Tree Star, Inc.). Las subpoblaciones celulares se definieron de la siguiente manera:

- **Th2** (CD4+/CD45RO+/CD14-/IL-4+; CD4+/CD45RO+/CD14-/IL-13+, CD4+/CD45RO+/CD14-/IL-5+);
- **Linfocitos T CD4 productores de IL-21 (TCD4+IL-21)** (CD4+/CD45RO+/CD14-/IL-21+);
- **Linfocitos T CD4 citotóxicos (TCD4+ citotóxicos)** (CD4+/CD45RO+/SLAMF7+/IL-1 β +/TGF- β 1+);
- **Th9** (CD3+/CD4+/ CD45RO+/IL-9);
- **Células Tfh circulantes** (CD4+/CD45RO+/CCR7-/ICOS+/CXCR5+/Bcl6+):
 - **Tfh1** (CD4+/CD45RO+/CCR7-/ICOS+/CXCR5+/Bcl6+/IFN- γ +);
 - **Tfh2** (CD4+/CD45RO+/CCR7-/ICOS+/CXCR5+/Bcl6+/IL-4+);
 - **Tfh17** (CD4+/CD45RO+/CCR7-/ICOS+/CXCR5+/Bcl6+/IL-17+);
 - **Tfr** (CD4+/CD45RO+/CCR7-/ICOS+/CXCR5+/Bcl6+/Foxp3+);
- **Células T CD4 reguladoras:**
 - **Tregs** (CD4+/CD25hi/CD127-/Foxp3+);
 - **Tr1** (CD4+/CD25low/Foxp3-/IL-10+);
 - **Th3** (CD4+/CD25-/Foxp3-/TGF- β 1+);
- **Células B reguladoras productoras de IL-10 (Bregs)** (CD19+/CD24hi/CD38hi/IL-10+);
- **Dendríticas plasmacitoides productoras de IL-10 (pDC IL-10)** (CD86+/CD163hi/IL-10+);
- **Macrófagos M1** (CD86+/CD127+/TNF- α +);
- **Macrófagos M2** (CD163+/CD14+/TGF- β 1+/IL-33+).

Como control de isotipo se emplea una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón de tipo IgG1, k-FITC/IgG1-PE/CD45-PeCy5 (BD TritestTM, BD Biosciences).

Además se realizó un control de autofluorescencia y los respectivos controles FMO (fluorescence minus one).

7.6. Cuestiones éticas.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética (IRE-2549-18-20-1) y se realizó de acuerdo a la Declaración de Helsinki.

7.7. Análisis y métodos estadísticos.

Se utilizó estadística descriptiva. Las variables dicotómicas se expresaron mediante frecuencias absolutas y las variables continuas como medias y desviación estándar (DE) o medianas e intervalos mínimo-máximo. La comparación entre medias se realizó mediante prueba T de Student y entre medianas con la prueba de U de Mann-Whitney. La comparación de grupos múltiples se realizó mediante prueba de Kruskal-Wallis con ajuste post-hoc con prueba de Dunn. Se analizaron correlaciones mediante coeficiente de correlación de Spearman. Se realizó análisis de regresión logística reportando IC 95%. Se consideró significativa una $p \leq 0.05$ a dos colas. Se utilizó programa SPSS versión 20.0 para Windows y GraphPad Prism 8.3.0 para Windows.

8. Resultados.

8.1. Características de los sujetos.

Se reclutaron 43 pacientes con ER-IgG4 durante el periodo de estudio. Veintiuno (48.8%) eran hombres con edad media de 52.3 ± 16.4 años. Dado a que en un análisis preliminar del estudio se observaron diferencias evidentes entre controles y pacientes se incluyeron solamente 12 sujetos sanos como controles. De los controles, 5 (41.7%) eran hombres ($p=0.66$) con una edad media menor en comparación a los pacientes con ER-IgG4 (40.6 ± 12.1 años, $p=0.03$). La edad media al diagnóstico de la ER-IgG4 fue de 49.9 ± 16.5 años. Treinta y un (72.1%) pacientes habían presentado afección de ≥ 3 o más órganos al momento del reclutamiento, 8 (18.6%) a dos órganos y 4 (9.3%) a un órgano. Los órganos y/o sitios anatómicos más comúnmente afectados fueron: glándulas submandibulares

en 23 (53.5%), glándulas lagrimales en 18 (41.9%), ganglios linfáticos en 18 (41.9%), páncreas en 15 (34.9%), parótidas en 14 (32.6%), senos paranasales en 14 (32.6%), órbita en 13 (30.2%), vía biliar en 12 (27.9%), pulmón en 11 (25.6%), riñón en 10 (23.3%) y retroperitoneo en 5 (11.6%). Al reclutamiento la mediana de órganos afectados fue de 1 (0-10) con una mediana del IR ER-IgG4 de 4 (0-24). Ocho (18.6%) pacientes pertenecían al fenotipo pancreato-hepatobiliar, 7 (16.3%) al fenotipo retroperitoneal/aórtico, 16 (37.2%) al fenotipo limitado a cabeza y cuello y 12 (27.9%) al fenotipo Mikulicz/sistémico. Asimismo, 33 (76.7%) pacientes se clasificaron en el fenotipo proliferativo y 10 (23.3%) en el fenotipo fibrótico. Veintidós (51.2%) pacientes tenían actividad de la enfermedad al momento del reclutamiento, de los cuales en 11 (50%) era actividad *de novo*, en 8 (36.3%) era recaída y en 3 (13.6%) actividad persistente de la enfermedad. Once (25.6%) pacientes tenían antecedente de atopia.

La mediana de IgG1 al reclutamiento fue de 809.12 mg/dl (199-2662); 11 (25.6%) presentaban niveles de IgG1 altos. La mediana de IgG4 fue de 66 mg/dl (7-1088); 15 (34.9%) presentaban niveles de IgG4 altos. En 35 (81.4%) pacientes se contaba con biopsia y confirmación histológica.

Al reclutamiento, 27 (62.8%) pacientes se encontraban tomando tratamiento; de éstos, 17 (39.5%) prednisona y 19 (44.2%) algún inmunosupresor, siendo el más común la azatioprina en 16 (37.2%) seguido del micofenolato de mofetilo en 3 (7%).

8.2. Subpoblaciones celulares en pacientes con ER-IgG4.

Los pacientes con ER-IgG4 presentaron porcentajes significativamente mayores de las siguientes subpoblaciones celulares en comparación con controles sanos (Tabla 1): Th2 productores de IL-4, IL-13, e IL-5, T CD4+/IL-21+, Th9, T CD4+ citotóxicos (SLAMF7+/IL-1 β +/TGF- β 1+), Tfh totales (CXCR5+ ICOS+Bcl6+), Tfh1, Tfh2, Tfh17, Tfr, Tregs FOXP3+, Th3, Bregs, pDC IL-10 y macrófagos M1 y M2. No hubo diferencias significativas en los porcentajes de células Tr1 entre pacientes con ER-IgG4 y sujetos sanos.

Tabla 1. Subpoblaciones celulares en pacientes con ER-IgG4 en comparación con sujetos sanos.			
	ER-IgG4 (N=43)	Controles (N=12)	P
Th2 (IL-4; %)	4.70 (1.04-19.40)	1.38 (0.31-2.61)	<0.001
Th2 (IL-13; %)	6.45 (1.10-23.60)	1.53 (0.35-5.24)	<0.001
Th2 (IL-5; %)	4.78 (1.20-23)	1.38 (0.44-2.33)	<0.001
TCD4+ (IL-21; %)	6.36 (1.46-22.90)	1.81 (1.25-2.99)	<0.001
Th9 (%)	6 (1.44-26.80)	1.45 (0.60-4.01)	<0.001
TCD4+ citotóxicos (%)	26.10 (9.82-53.10)	7.82 (5.57-10.30)	<0.001
Tfh (CXCR5+ ICOS+Bcl6+) (%)	6.19 (2.1-18.30)	3.78 (3.16-6.70)	<0.001
Tfh1 (%)	10.30 (4.14-20.40)	5.61 (3.07-8.57)	<0.001
Tfh2 (%)	10.70 (5.27-23.40)	4.88 (3.02-5.78)	<0.001
Tfh17 (%)	9.20 (4.42-18.20)	4.58 (3.44-7.52)	<0.001
Tfr (%)	10.70 (7.27-19.90)	5.55 (3.91-7.58)	<0.001
Tregs (FOXP3 +; %)	11.30 (7.06-15.40)	7.49 (4.22-9)	<0.001
Tr1 (%)	8.97 (3.43-23)	7.49 (4.22-9)	0.089
Th3 (%)	12.50 (3.65-25.50)	4.21 (2.61-7.06)	<0.001
Bregs (%)	13.80 (5.22-20.50)	9.18 (5.41-11)	<0.001
pDC IL-10 (%)	12.60 (2.99-29.20)	9.13 (6.04-12.60)	0.013
Macrófagos M2 (%)	10.60 (5.29-17.60)	5.86 (2.68-7.42)	<0.001
Macrófagos M1 (%)	14.40 (4.53-26.80)	6.72 (6.13-7.47)	<0.001

Todos los resultados se presentan en medianas del porcentaje de células (intervalo min-max). La comparación entre ambos grupos se realizó mediante prueba de U de Mann-Whitney.

8.3. Las subpoblaciones celulares en pacientes con ER-IgG4 difieren de acuerdo al fenotipo clínico.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de Th2 (CD4+/IL-4+; $p=0.029$), Th2 (CD4+/IL-5+; $p=0.047$), TCD4+ citotóxicos (SLAMF7+/IL-1 β +/TGF- β 1+; $p<0.001$), Tfh17 ($p=0.005$), Tregs FOXP3+ ($p=0.008$), Th3 ($p=0.02$), Bregs ($p=0.005$) y pDC IL-10 ($p=0.016$) de acuerdo a los fenotipos clínicos propuestos por Wallace y cols (Tabla 2).

Tabla 2. Subpoblaciones celulares en pacientes con ER-IgG4 de acuerdo al fenotipo clínico.					
	Pancreato-hepatobiliar (N=8)	Retroperitoneal/aorta (N=7)	Cabeza y cuello (N=16)	Mikulicz/Sistémico (N=12)	p
Th2 (IL-4; %)	2.54 (1.09-5.37)	5.77 (1.04-19.40)	3.83 (1.10-18.50)	5.41 (2.66-14.30)	0.029¥
Th2 (IL-13; %)	4.50 (1.30-6.65)	9.08 (1.10-23.60)	6.51 (1.10-18.40)	6.41 (1.40-12.90)	0.201
Th2 (IL-5; %)	2.92 (1.46-7.84)	6.49 (1.20-9.96)	4.60 (2.03-9.07)	6.68 (2.63-23)	0.047
TCD4+ (IL-21; %)	4.34 (2.74-14)	6.62 (3.45-16.80)	7.77 (3.10-22.90)	4.08 (1.46-14.10)	0.14
Th9 (%)	7.78 (2.69-14.20)	7.20 (2.34-11.80)	5.82 (1.44-18.50)	4.52 (1.67-26.80)	0.17
TCD4+ citotóxicos (%)	32.05 (19.30-37.40)	23.80 (9.82-53.10)	30.40 (21.10-51.40)	21.30 (13-25)	<0.001¥§
Tfh (CXCR5+ ICOS+Bcl6+) (%)	6.70 (4.04-15.10)	7.36 (4.20-12.70)	5.67 (2.67-18.30)	7.22 (2.61-16.80)	0.452
Tfh1 (%)	9.55 (4.14-13)	9.25 (8.44-10.40)	10.85 (4.71-20.20)	14.85 (5.81-20.40)	0.31
Tfh2 (%)	10.45 (5.27-15)	7.27 (5.93-13.40)	11.85 (5.69-18.90)	12.65 (6.06-23.40)	0.16
Tfh17 (%)	10.55 (5.44-18)	9.58 (8.42-13.90)	9.37 (4.72-18.20)	5.45 (4.42-11.70)	0.005¥§£
Tfrs (%)	10.70 (9-15.90)	9 (7.32-13.50)	11.15 (7.58-14.80)	12 (7.27-19.90)	0.23
Tregs (FOXP3 +; %)	11.55 (9.1-15.40)	12.20 (8.97-13.30)	11.55 (8.06-13.70)	8.43 (7.06-12.90)	0.008¥§
Tr1 (%)	6.43 (3.44-16.10)	11.50 (6.68-23)	9.29 (4.22-14.80)	7.34 (4.51-12.60)	0.13
Th3 (%)	11.70 (8.09-17.90)	12.50 (7.16-14)	16.50 (6.32-25.50)	10.85 (3.65-18.60)	0.02§
Bregs (%)	13.70 (8.70-20.50)	13.10 (7.54-18)	15.80 (10.46-19.80)	11.34 (5.22-16.80)	0.005§
pDC IL-10 (%)	12.11 (7.03-21.20)	12.11 (8.25-16)	14.40 (7.98-29.20)	8.95 (2.99-16.70)	0.016§
Macrófagos M2 (%)	11.36 (7.43-13.50)	11.80 (8.03-13.40)	10.70 (8.54-12.80)	9.81 (5.29-17.60)	0.54
Macrófagos M1 (%)	13.73 (5.86-26.30)	17.60 (4.95-24)	14.60 (7.79-26.80)	14.40 (4.53-18.80)	0.81

Todos los resultados se presentan en medianas del porcentaje de células (intervalo min-max).
La comparación entre los distintos fenotipos se realizó con prueba de Kruskal-Wallis y ajuste post-hoc con prueba de Dunn.
¥ p<0.05 para la comparación entre fenotipo pancreato-hepatobiliar y fenotipo Mikulicz/sistémico.
§ p<0.05 para la comparación entre fenotipo cabeza y cuello y fenotipo Mikulicz/sistémico.
£ p<0.05 para la comparación entre fenotipo retroperitoneal-aórtico y fenotipo Mikulicz/sistémico.

Cuando se compararon solamente los 22 pacientes con enfermedad activa (Tabla 3), las diferencias en los porcentajes de las Th2 (CD4+/IL-4+; p=0.02), Th2 (CD4+/IL-5+; p=0.008), TCD4+ citotóxicos (SLAMF7+/IL-1β+/TGF-β1+; p=0.03), Tfh17 (p=0.02), Th3 (p=0.02) Bregs (p=0.049) y pDC IL-10 (p=0.02) permanecieron estadísticamente significativas. Además se observaron diferencias significativas en los porcentajes de Tfh1 (p=0.03), Tfh2 (p=0.009), Tr1 (p=0.034) y macrófagos M1 (p=0.03) y una tendencia para TCD4+ IL-21 (p=0.055).

El fenotipo pancreato-hepatobiliar se caracterizó por mayores porcentajes de Tfh17, TCD4+ citotóxicos (SLAMF7+/IL-1 β +/TGF- β 1+) y macrófagos M2 y menores de Th2 (CD4+/IL-4+), Th2 (CD4+/IL-5+), TCD4+ IL-21 y macrófagos M1. El fenotipo retroperitoneal-aórtico se caracterizó por mayores porcentajes de Tfh17, Tr1 y macrófagos M1. El fenotipo cabeza y cuello presentó mayores porcentajes de TCD4+ citotóxicos (SLAMF7+/IL-1 β +/TGF- β 1+), Th3, Bregs, pDC IL-10 y menores de Th2 (CD4+/IL-4+) y Th2 (CD4+/IL-5+). Finalmente, el fenotipo Mikulicz/sistémico mostró mayores porcentajes de Th2 (CD4+/IL-4+), Th2 (CD4+/IL-5+) y TCD4+ IL-21, Tfh (CXCR5+), Tfh1 y Tfh2 y menores de TCD4+ citotóxicos (SLAMF7+/IL-1 β +/TGF- β 1+), Tfh17, Tr1, Th3, Bregs, pDC IL-10 y macrófagos M2.

Tabla 3. Subpoblaciones celulares en pacientes con ER-IgG4 activa de acuerdo a fenotipo clínico.

	Pancreato-hepatobiliar (N=3)	Retroperitoneal/aorta (N=4)	Cabeza y cuello (N=9)	Mikulicz/Sistémico (N=6)	p
Th2 (IL-4; %)	2.36 (1.67-2.73)	4.18 (1.04-19.40)	1.84 (1.10-5.76)	8.35 (4.70-14.30)	0.023§
Th2 (IL-13; %)	4.80 (4.34-6.65)	8.52 (1.10-23.60)	4.54 (1.10-8.58)	10.70 (4.12-12.90)	0.116
Th2 (IL-5; %)	1.67 (1.46-3.56)	5.70 (1.20-6.50)	3.45 (2.03-9.07)	8.91 (6.26-23)	0.008¥§
TCD4+ (IL-21; %)	3 (2.74-3.53)	6.59 (6.41-16.80)	5.68 (3.10-8.70)	6.11 (3.66-14.10)	0.055
Th9 (%)	7.38 (2.69-8.19)	6.69 (5.08-11.80)	4.96 (1.44-9.84)	6 (4.68-26.80)	0.30
TCD4+ citotóxicos (%)	32.30 (31.80-37.20)	23.50 (17.90-53.10)	31.40 (24.10-51.40)	21.30 (18.30-24.40)	0.016¥§
Tfh (CXCR5+ ICOS+Bcl6+; %)	8.20 (8.19-15.10)	9.52 (7.36-12.70)	6.30 (2.67-18.30)	8.49 (7.17-16.80)	0.222
Tfh1 (%)	12.30 (10.54-13)	9.14 (8.44-10.40)	8.91 (4.71-11.30)	15.85 (8.42-19.50)	0.025§
Tfh2 (%)	13 (12.44-15)	10.45 (7.27-13.40)	10.10 (5.69-14.50)	17.96 (10.70-23.40)	0.008§
Tfh17 (%)	13.10 (12.40-18)	12.95 (9.58-13.90)	10.20 (6.97-18.20)	6.49 (5.21-11.70)	0.023¥
Tfrs (%)	11.80 (11.40-15.90)	9.51 (9-13.50)	8.91 (7.58-13.90)	13.50 (7.41-19.90)	0.119
Tregs (FOXP3+; %)	10.30 (9.09-14.30)	12.35 (8.97-13.50)	11.30 (8.06-13.20)	8.51 (7.06-12.90)	0.453
Tr1 (%)	12.50 (11.80-16.10)	14.70 (11.50-23)	10.60 (7.04-14.80)	7.36 (5.21-12.60)	0.034£
Th3 (%)	9.61 (8.09-12.90)	12.65 (10.50-14)	18.29 (10.70-25.50)	13.30 (9.26-18.60)	0.013*
Bregs (%)	11 (8.70-16.70)	12.15 (7.54-13.80)	15.60 (13.31-19.80)	13 (7.52-16.80)	0.049
pDC IL-10 (%)	12.20 (12.03-13.60)	11.75 (10.40-16)	16.49 (13.30-29.20)	11.63 (8.60-16.70)	0.026§
Macrófagos M2 (%)	12.90 (12.02-13.50)	11.65 (9.57-13.40)	11 (8.54-12.80)	10.10 (6.99-12.50)	0.108
Macrófagos M1 (%)	7.31 (5.86-10.30)	23.50 (17.60-24)	16.60 (12.30-26.80)	16.25 (9.98-18.80)	0.017#

Todos los resultados se presentan en medianas del porcentaje de células (intervalo min-max).
La comparación entre los distintos fenotipos se realizó con prueba de Kruskal-Wallis y ajuste post-hoc con prueba de Dunn.
p<0.05 para la comparación entre fenotipo pancreato-hepatobiliar y retroperitoneal-aórtico.
* p<0.05 para la comparación entre fenotipo pancreato-hepatobiliar y fenotipo cabeza y cuello.

¥ p<0.05 para la comparación entre fenotipo pancreato-hepatobiliar y fenotipo Mikulicz/sistémico.

§ p<0.05 para la comparación entre fenotipo cabeza y cuello y fenotipo Mikulicz/sistémico.

£ p<0.05 para la comparación entre fenotipo retroperitoneal-aórtico y fenotipo Mikulicz/sistémico.

Los pacientes con fenotipo proliferativo tuvieron menores porcentajes de Tfh17 (7.42% [4.42-18] vs 12.95% [8.42-18.20]; p=0.002) y Tr1 (7.47% [3.43-16.10] vs 11.05% [6.68-23]; p=0.01) y mayores de Tfr (11.30% [7.27-19.90] vs 9.09% [7.32-13.50]; p=0.041) y una tendencia a mayores porcentajes de Tfh2 (12.20% [5.27-23.40] vs 9.15% [5.95-13.40]; p=0.055) y menores de macrófagos M1 (14.10% [4.53-26.30] vs 18.20% [4.95-26.80]; p=0.059) en comparación con los pacientes con fenotipo fibrótico (Tabla suplementaria 1) (Figura 1). No hubo diferencias en los porcentajes del resto de las subpoblaciones celulares. En el análisis de regresión logística las subpoblaciones que permanecieron asociadas fueron las Tfh17 (OR 0.60, IC 95% 0.41-0.88, p=0.01) y las Tfh2 (OR 1.57, IC 95% 1.01-2.45, p=0.046).

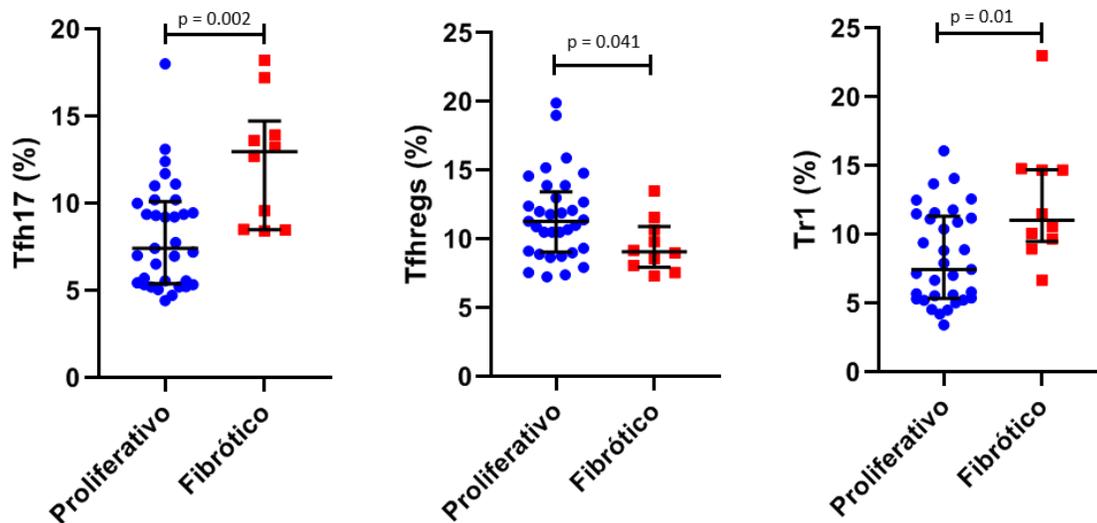


Figura 1. Diferencias de porcentajes en subpoblaciones celulares entre fenotipos proliferativo vs fibrótico.

8.4. Las subpoblaciones celulares en pacientes con ER-IgG4 difieren de acuerdo al estado de actividad.

Los pacientes con ER-IgG4 activa presentaron porcentajes mayores de células Tfh (CXCR5+ICOS+Bcl6+) ($p < 0.001$), Tfh17 ($p < 0.001$), Tr1 ($p = 0.001$), Th3 ($p = 0.01$), pDC IL-10 ($p = 0.005$) y macrófagos M1 ($p = 0.017$) en comparación con pacientes con enfermedad inactiva (Tabla suplementaria 2) (Figura 2). No hubo diferencias en los porcentajes del resto de las subpoblaciones celulares. En el análisis de regresión logística las subpoblaciones que permanecieron asociadas fueron las Tfh17 (OR 1.46, IC 95% 1.05-2.04, $p = 0.025$) y las Tr1 (OR 1.33, IC 95% 1.01-1.74, $p = 0.043$).

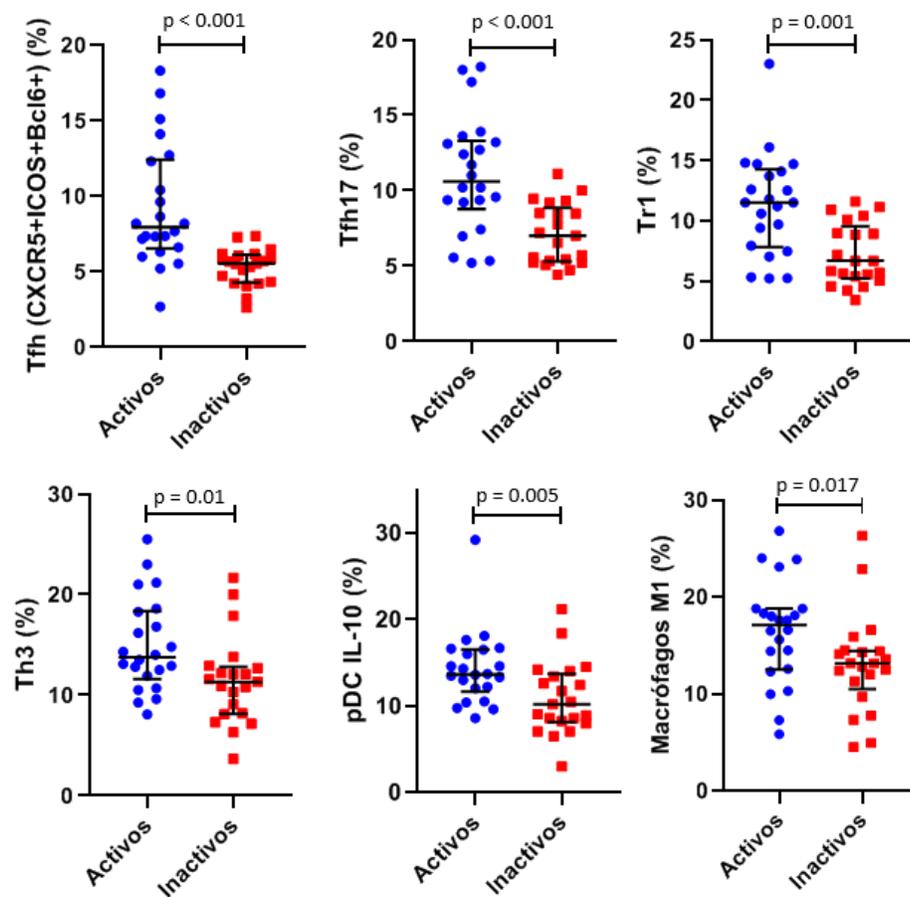


Figura 2. Diferencias de porcentajes de subpoblaciones celulares entre pacientes con enfermedad activa vs pacientes con enfermedad inactiva.

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de subpoblaciones celulares entre pacientes con ER-IgG4 *de novo*, pacientes con recaídas o pacientes con actividad persistente.

8.5. Las subpoblaciones celulares en pacientes con ER-IgG4 no difieren de acuerdo a la presencia de atopia.

Al comparar a los 11 pacientes con atopia contra los 32 pacientes sin atopia no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de las subpoblaciones celulares analizadas.

8.6. Las subpoblaciones celulares en pacientes con ER-IgG4 no difieren en pacientes sin tratamiento inmunosupresor en comparación con pacientes con tratamiento inmunosupresor.

Al comparar a los 27 pacientes con ER-IgG4 que al momento del reclutamiento estaban bajo tratamiento con algún inmunosupresor contra los 16 pacientes sin tratamiento, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de ninguna de las subpoblaciones celulares.

Al comparar a los 16 pacientes sin tratamiento inmunosupresor al momento del reclutamiento contra los sujetos sanos se encontraron hallazgos similares que al incluir a la cohorte completa, porcentajes significativamente mayores de: Th2 productores de IL-4, IL-13, e IL-5, T CD4+/IL-21+, Th9, T CD4+ citotóxicos (SLAMF7+/IL-1 β +/TGF- β 1+), Tfh (CXCR5+ ICOS+Bcl6+), Tfh1, Tfh2, Tfh17, Tfr, Tregs FOXP3+, Th3, Bregs, pDC IL-10, macrófagos M1 y macrófagos M2, mientras que no hubo diferencias significativas en los porcentajes de células Tr1.

8.7. Correlaciones entre subpoblaciones celulares y variables clínicas y serológicas.

Se determinaron las correlaciones entre las diferentes subpoblaciones celulares las cuales se muestran en el mapa de calor (Figura 3).

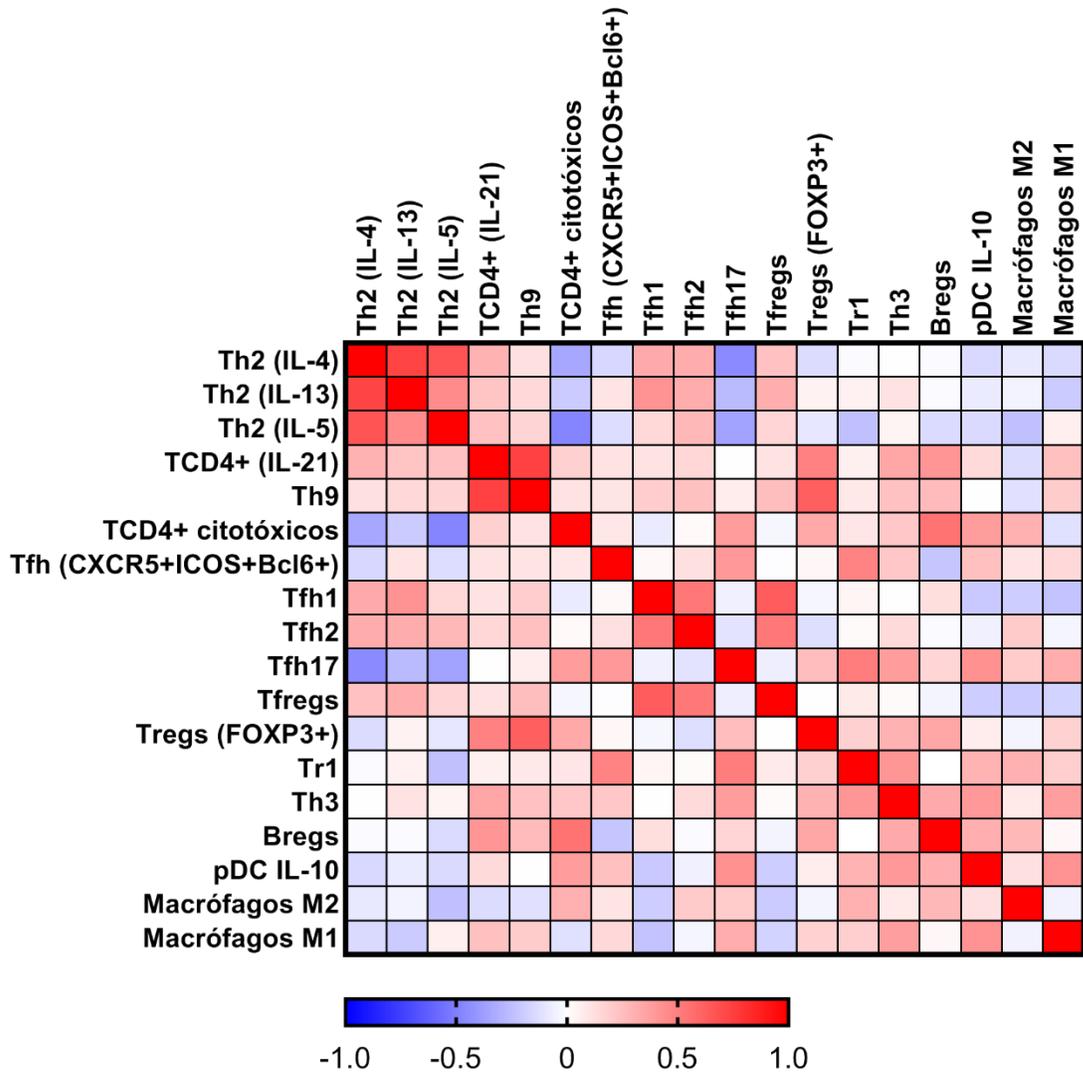


Figura 3. Mapa de calor que muestra las correlaciones entre las distintas subpoblaciones celulares.

Las subpoblaciones celulares con mayor número de correlaciones estadísticamente significativas fueron los TCD4+ citotóxicos (SLAMF7+/IL-1β+/TGF-β1+) que correlacionaron con Th2 (CD4+/IL-4+; $\rho=-0.35$, $p=0.02$), Th2 (CD4+/IL-5+; $\rho=-0.48$, $p=0.001$), Tregs (FOXP3+; $\rho=0.34$, $p=0.03$), Tfh17 ($\rho=0.34$, $p=0.01$), Bregs ($\rho=0.56$, $p<0.001$), pDC IL-10 ($\rho=0.38$, $p=0.01$) y macrófagos M2 ($\rho=0.31$, $p=0.04$); y las Tfh17 que correlacionaron con Th2 (CD4+/IL-4+; $\rho=-0.46$, $p=0.002$), Th2 (CD4+/IL-13+; $\rho=0.31$, $p=0.040$), Th2 (CD4+/IL-5+; $\rho=-0.37$, $p=0.02$), TCD4+ citotóxicos (SLAMF7+/IL-1β+/TGF-β1+; $\rho=0.39$, $p=0.01$), Tfh (CXCR5+ICOS+Bcl6+; $\rho=0.40$,

$p=0.009$), Tr1 ($p=0.51$, $p=0.001$), pDC IL-10 ($p=0.41$, $p=0.004$) y macrófagos M1 ($p=0.32$, $p=0.04$). Además, las células Th2 (CD4+/IL-4+), Th2 (CD4+/IL-13+) y Th2 (CD4+/IL-5+) correlacionaron entre ellas, al igual que las Tfh1, Tfh2 y Tfr y las células reguladoras Th3, Bregs y pDC IL-10.

Se encontró correlación entre los niveles de IgG4 séricas y las células Tfh (CXCR5+ICOS+Bcl6+; $p=0.32$, $p=0.04$) y Tregs (FOXP3+; $p=-0.35$, $p=0.02$). También se encontró una correlación positiva entre el número de órganos afectados y Tfh17 ($p=0.45$, $p=0.002$), Tr1 ($p=0.34$, $p=0.03$), pDC IL-10 ($p=0.40$, $p=0.008$) y macrófagos M1 ($p=0.36$, $p=0.02$) y entre el IR ER-IgG4 y las Tfh2 ($p=0.34$, $p=0.03$) y Tfh17 ($p=0.33$, $p=0.03$).

8.8. Correlación entre el tiempo de evolución de la enfermedad y el porcentaje de subpoblaciones celulares.

Al analizar a los 11 pacientes con ER-IgG4 activa *de novo* se observó una correlación entre el tiempo en meses entre el inicio del primer síntoma atribuible a la enfermedad y el diagnóstico/reclutamiento y las siguientes subpoblaciones celulares: Th2 (CD4+/IL-4+; $p=-0.77$, $p=0.008$), Th2 (CD4+/IL-13+; $p=-0.65$, $p=0.03$), Th2 (CD4+/IL-5+; $p=-0.73$, $p=0.01$), T CD4+ citotóxicos (SLAMF7+/IL-1 β +/TGF- β 1+; $p=0.67$, $p=0.03$) y Tfr ($p=-0.76$, $p=0.007$).

9. Discusión.

En el presente estudio analizamos distintas subpoblaciones celulares en pacientes con ER-IgG4 en comparación con sujetos sanos y las diferencias de estas subpoblaciones entre fenotipos clínicos. Encontramos que los pacientes con ER-IgG4 presentan porcentajes mayores de Th2 productoras de IL-4, IL-13, e IL-5, T CD4+/IL-21+, Th9, T CD4+ citotóxicos, células Tfh totales circulantes, Tfh1, Tfh2, Tfh17, Tfr, Tregs FOXP3+, Th3, Bregs, pDC IL-10, macrófagos M1 y macrófagos M2 comparados con los individuos sanos. Además, encontramos diferencias evidentes en el inmunofenotipo de células circulantes entre los distintos fenotipos clínicos de la ER-IgG4 y de acuerdo al estado de actividad de la enfermedad.

Los fenotipos pancreato-hepatobiliar y el retroperitoneal-aórtico fueron los que tuvieron los mayores porcentajes de células Tfh17, además, el primero presentó el mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ citotóxicos y una menor respuesta Th2; mientras que el segundo, presentó la mayor cantidad de células Tr1 productoras de IL-10. Los pacientes con fenotipo limitado a cabeza y cuello se caracterizaron por tener menor respuesta Th2 y porcentajes de linfocitos T CD4+ citotóxicos aumentados y fue el fenotipo donde las subpoblaciones reguladoras productoras de IL-10 y TGF- β 1 se encontraban más elevadas. Por lo contrario, los pacientes con fenotipo Mikulicz/sistémico se caracterizaron por tener una importante respuesta Th2, Tfh1 y Tfh2 y menores cantidades de subpoblaciones de células reguladoras productoras de IL-10 y TGF- β 1, además de ser el fenotipo con la menor cantidad de linfocitos TCD4+ citotóxicos. Estos diferentes inmunofenotipos de células circulantes podrían explicar las presentaciones clínicas de los distintos fenotipos y su serología, además de las diferencias en la respuesta al tratamiento.

Para que las células plasmáticas produzcan IgG4 se requieren citocinas de la respuesta Th2 como son IL-4, IL-5 e IL-13.²⁸ Debido a que la ER-IgG4 se caracteriza por elevación de IgG4 en sangre y tejidos y a que los pacientes con ER-IgG4 comúnmente presentan historia de atopia, elevación de eosinófilos e IgE sérica, los linfocitos Th2 fueron las primeras subpoblaciones celulares estudiadas. En 2007 Zen y cols. analizaron mediante PCR cuantitativo e hibridación *in situ* en tejidos de pacientes con ER-IgG4, predominantemente del fenotipo pancreato-hepatobiliar, que las citocinas de la respuesta Th2, IL-4, IL-5 e IL-13, se encontraban aumentadas en comparación con diversos controles con otras enfermedades (e.g. Síndrome de Sjögren, colangitis esclerosante primaria, sialolitiasis).¹¹ Tanaka y cols. también encontraron una expresión incrementada de células Th2 en glándulas salivales de pacientes con síndrome de Mikulicz en comparación con pacientes con síndrome de Sjögren.¹² Posteriormente, la participación de la polarización de células T vírgenes a Th2 en la ER-IgG4 fue evidente en diversos estudios en pacientes con enfermedad oftálmica relacionada a IgG4,^{29,30} colangitis esclerosante relacionada a IgG4,³¹ y ER-IgG4 en general.^{13,14} Nuestro estudio corrobora dichos hallazgos al encontrar que los pacientes hispanos con ER-IgG4 tienen mayores porcentajes de

células Th2 en comparación con sanos. Además, es importante notar que no hubo diferencias en los porcentajes de células Th2 entre pacientes con o sin atopia, lo que indica que la respuesta Th2 en pacientes con ER-IgG4 no depende de la presencia de atopia como ha sido sugerido por Mattoo y cols.¹⁵ Encontramos que el fenotipo Mikulicz/sistémico es en el que predomina la polarización Th2; estos hallazgos podrían explicar el por qué el fenotipo Mikulicz/sistémico es el que tiene mayores cantidad de IgG4 séricas.¹⁵

La IL-21 juega un papel importante en la formación de centros germinales y el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y es producida principalmente por células Th2 y Tfh. Maehara y cols demostraron que en pacientes con ER-IgG4 la IL-21 contribuye a la producción de IgG4 y su expresión en glándulas salivales correlaciona con el número de centros germinales.³² En nuestro estudio demostramos que los pacientes con ER-IgG4 presentan mayor cantidad de linfocitos TCD4+ productores de IL-21, siendo el fenotipo pancreato-hepatobiliar el que exhibía menores porcentajes.

Recientemente, una subpoblación de células T helper productoras de IL-9 se identificó, denominándose células Th9 que se consideran parte de la respuesta Th2.^{33,34} La IL-9 es una citocina con funciones pleiotrópicas en el sistema inmunológico, por ejemplo, promueve el crecimiento de mastocitos y su acumulación en tejidos inflamados y provoca el cambio de isotipo a IgE. El papel de esta subpoblación se ha descrito en algunas enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades atópicas y las vasculitis de grandes vasos.³⁴ Este estudio es el primer en describir que las células Th9 se encuentran aumentadas en pacientes con ER-IgG4 lo cual podría contribuir en la producción de IgE y las manifestaciones alérgicas que acompañan la enfermedad.

De acuerdo a lo reportado por Mattoo y cols, encontramos que los linfocitos T CD4+ citotóxicos se encuentran significativamente elevados en pacientes con ER-IgG4 en comparación con sujetos sanos.¹⁸ Sin embargo, no observamos correlación entre el porcentaje de esta subpoblación, con niveles de IgG4, ni el número de órganos

afectados como se reportó previamente.¹⁹ También determinamos que los fenotipos pancreato-hepatobiliar y limitado a cabeza y cuello son los que presentan mayores concentraciones de linfocitos T CD4+ citotóxicos. Así mismo, la correlación positiva entre el tiempo de evolución de la enfermedad con el porcentaje de linfocitos T CD4+ citotóxicos sugiere que su concentración es tiempo-dependiente.

Las células Tfh son un fenotipo único de células T cooperadoras que participan en la diferenciación de las células B durante su desarrollo y contribuyen al cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, la hipermutación somática y la formación de centros germinales. En los últimos 5 años, ha surgido un importante interés en discernir el papel de esta subpoblación celular en la ER-IgG4. Akiyama y cols demostraron que de entre las distintas subpoblaciones de células Tfh (Tfh1, Tfh2, Tfh17), las células Tfh2 se encontraban aumentadas en comparación con controles con síndrome de Sjögren, rinitis alérgica y sujetos sanos y que su concentración correlacionaba con la actividad de la enfermedad, los niveles de IgG4, IL-4 y plasmablastos en pacientes con ER-IgG4 activa.²¹ Posteriormente, los mismos investigadores demostraron en estudios mecanísticos que las células Tfh2 inducían la diferenciación de células B vírgenes a plasmablastos y la subsecuente producción de IgG4 más eficientemente que las células Tfh1 y Tfh17.²² Dichos hallazgos se han replicado en diversas cohortes de pacientes con ER-IgG4, los cuales han encontrado de manera consistente que las células Tfh y en particular, la subpoblación Tfh2, se encuentran elevadas en pacientes con ER-IgG4 tanto en sangre periférica^{13,35-39} como en los tejidos afectados^{36-38,40} y los órganos linfoides secundarios y terciarios,⁴⁰ correlacionando con los niveles de IgG4 sérica^{36,37} y con la afección multiorgánica.³⁵⁻³⁷ Por otro lado, también se ha demostrado que las células Tfh2, inhiben la apoptosis de células B.³⁷ En contraste, solo algunos estudios han determinado un aumento de las células Tfh1 y Tfh17 en pacientes con ER-IgG4.^{13,22} En nuestro estudio encontramos que tanto las células Tfh, como sus 3 subpoblaciones Tfh1, Tfh2 y Tfh17 están aumentadas en pacientes con ER-IgG4 en comparación con sujetos sanos y su relación con la producción de IgG4 y actividad de la enfermedad es evidente ya que las células Tfh correlacionaron con los niveles

de IgG4 y sus concentraciones fueron mayores en pacientes con ER-IgG4 activa. Además, aunque no se trate de un estudio mecanístico, nuestros hallazgos sugieren que las células Tfh17 podrían jugar un papel igualmente importante que las Tfh2 en la fisiopatogenia de la enfermedad, ya que los porcentajes de células Tfh17 también se encontraron más aumentados en pacientes con ER-IgG4 activa y dichos porcentajes correlacionaron con el número de órganos afectados y el IR ER-IgG4, en contraste con las Tfh2 que solamente correlacionaron con el IR ER-IgG4. Además, los porcentajes de las 3 subpoblaciones de Tfh fueron distintos entre los fenotipos clínicos, mientras que las Tfh17 predominaron en los fenotipos pancreato-hepatobiliar y retroperitoneal-aórtico, las Tfh1 y Tfh2 predominaron en el fenotipo Mikulicz/sistémico.

Las células Tfr participan en el control de la formación del centro germinal y el cambio de isotipo al regular la actividad de las células Tfh mediante la producción de citocinas como la IL-10 y el TGF- β .⁴¹ De acuerdo al estudio de Ito y cols encontramos que los pacientes con ER-IgG4 presentan mayores concentraciones de Tfr que sujetos sanos,³⁹ y aunque no encontramos correlación con los niveles de IgG4 o el número de órganos afectados, encontramos que la única subpoblación celular presente en mayor porcentaje en pacientes con fenotipo proliferativo fueron las células Tfrs.

La presencia de linfocitos reguladores fue descrita en los trabajos seminales sobre la fisiopatogenia de la ER-IgG4. Zen y cols encontraron que existían mayores cantidades de células Tregs FOXP3+ en tejidos de pancreatitis autoinmune y otros sitios extrapancreáticos afectados en comparación con diversos controles con otras enfermedades.¹¹ Otros estudios han replicado dichos hallazgos en distintos fenotipos de la ER-IgG4.^{12-14,35,42,43} Así mismo, Sumimoto y cols demostraron por primera vez que los linfocitos Bregs CD19+CD24hiCD38hi estaban incrementados en pacientes con pancreatitis autoinmune tipo 1 en comparación con controles con pancreatitis crónica, cáncer pancreático y sujetos sanos.⁴⁴ En contraste con dichos hallazgos, Lin y cols reportaron menores concentraciones de linfocitos Bregs CD19+CD24hiCD38hi en pacientes con ER-IgG4 en comparación con controles.⁴⁵

Otras subpoblaciones de linfocitos reguladores como las células Tr1 y Th3 no se habían estudiado previamente en pacientes con ER-IgG4. En este trabajo encontramos que las 4 subpoblaciones reguladoras (Tregs FOXP3+, Bregs, Tr1 y Th3) se encuentran aumentadas en pacientes con ER-IgG4 en comparación con sujetos sanos, existiendo diferencias entre los distintos fenotipos clínicos en las Bregs, Tr1 y Th3.

Los macrófagos y otras células del sistema inmune innato se han implicado también en la patogénesis de la ER-IgG4. En especial, se ha descrito que los macrófagos M2 contribuyen a perpetuar la respuesta Th2, el infiltrado por células plasmáticas y la fibrosis en pacientes con ER-IgG4 mediante la producción de APRIL, IL-10, CCL18 e IL-33.^{23,46,47} También se han observado incrementadas las células dendríticas mieloides y plasmocitoides.^{35,46} Estudios mecanísticos realizados en Japón demostraron que en pacientes con pancreatitis autoinmune relacionada a IgG4 la activación de las células pDC esta implicada en el desarrollo de inflamación y fibrosis mediante la producción de IFN- α e IL-33.^{48,49} Sin embargo, las células dendríticas pueden desempeñar también un papel tolerogénico aumentando la diferenciación de células T en células T reguladoras y células Tr1, esto mediante la producción de IL-10, para suprimir la respuesta Th2.⁵⁰ En el presente estudio encontramos mayor porcentaje de macrófagos M1, macrófagos M2 y pDC productoras de IL-10 en pacientes con ER-IgG4 en comparación con controles, siendo diferente entre los distintos fenotipos clínicos. Es importante notar que no se había reportado aumento de macrófagos M1 en pacientes con ER-IgG4 previamente. Los macrófagos M1 se consideran proinflamatorios ya que secretan citocinas tales como: TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IL-23 y producen daño tisular a través de la generación de especies reactivas de oxígeno;⁵¹ estas citocinas son proinflamatorias, sin embargo, existe evidencia de que el TNF- α podría participar en el proceso de fibrosis. Por ejemplo, se ha demostrado que el TNF- α esta involucrado en el desarrollo de fibrosis renal y pulmonar en modelos murinos,^{52,53} mientras que en la ER-IgG4 la evidencia es limitada; recientemente, Hong y cols demostraron que el TNF- α producía daño tisular en sialadenitis relacionada a IgG4 por medio de autofagia.⁵⁴ En conclusión, los macrófagos M1 podrían estar involucrados en la

fiopatogenia de la ER-IgG4 induciendo fibrosis directamente por $TNF-\alpha$, o indirectamente debido a daño tisular y la consiguiente activación de los mecanismos reparadores tisulares; no obstante, se requiere de estudios mecanísticos para poder discernir esta cuestión.

Recientemente Wallace y cols definieron 4 fenotipos en la ER-IgG4 que difieren en la distribución de los órganos afectados, edad, tiempo al diagnóstico, sexo y concentraciones de IgG4.⁹ Por otra parte, también se ha reconocido un fenotipo proliferativo y un fibrótico.¹⁰ Se cree que esta variabilidad fenotípica podría deberse a diferentes factores de riesgo genéticos y ambientales, los cuales no se han dilucidado. Nuestro estudio demuestra que cada fenotipo cuenta con un inmunofenotipo de células circulantes distintivo (Figura 4), el cual podría explicar la predilección por afectar un determinado grupo de órganos, las concentraciones de IgG4 séricas y el grado de inflamación y/o fibrosis en los órganos afectados.

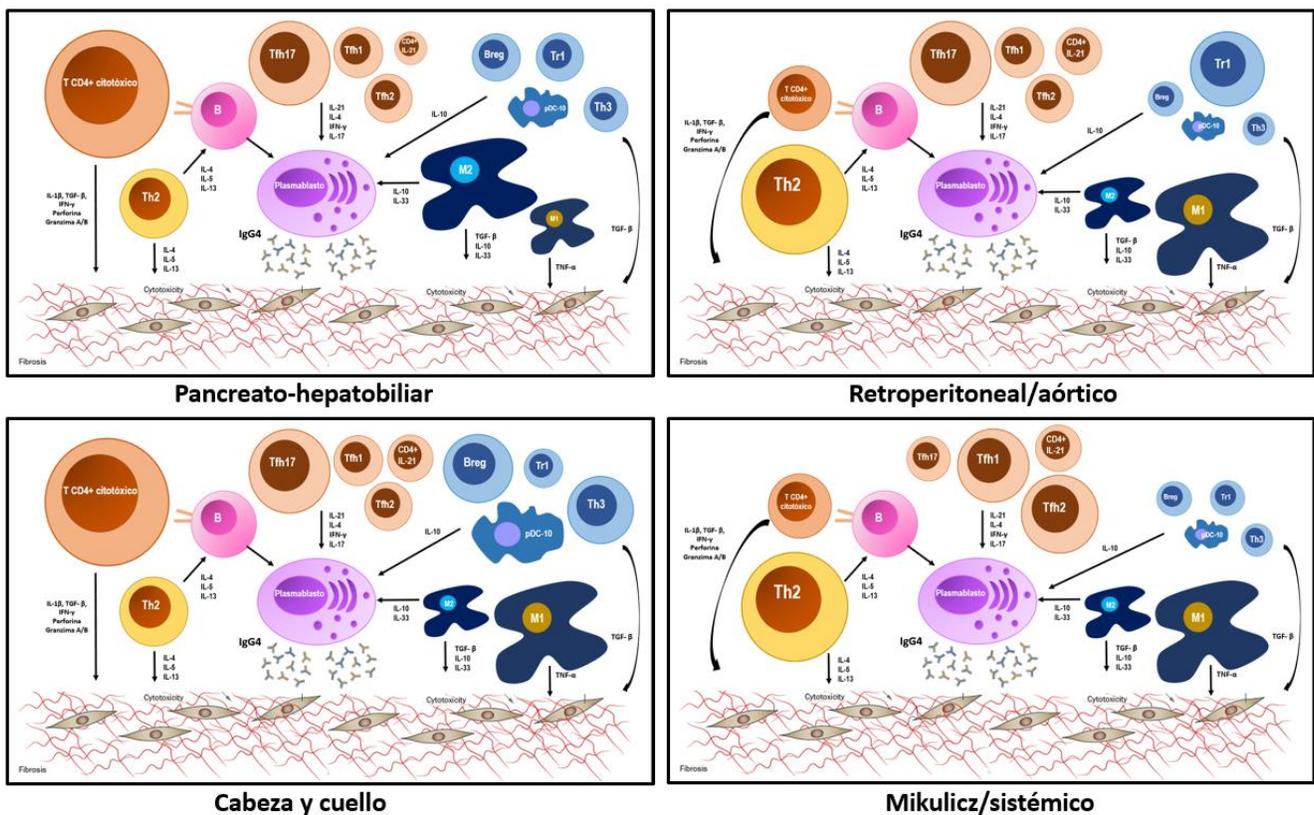


Figura 4. Diferentes inmunofenotipos caracterizan los distintos fenotipos clínicos en ER-IgG4.

La fibrosis se define como el depósito excesivo de componentes de tejido conjuntivo en un órgano, en respuesta a un desencadenante que conlleva a una disrupción de la arquitectura fisiológica de dichos órganos y a su disfunción. En las enfermedades fibróticas, de las cuales la ER-IgG4 es un nuevo prototipo, los desencadenantes específicos para cada enfermedad (aún desconocido en ER-IgG4) inician un daño dirigido a un sitio u órgano, lo cual activa distintas subpoblaciones celulares profibróticas. La respuesta inflamatoria en las enfermedades fibróticas varía, pero comparte la polarización hacia una respuesta combinada Th2/macrófago M2, la subsecuente sobreexpresión de mediadores profibróticos (e.j. TGF- β) y la activación y acumulación de miofibroblastos. Sin embargo, en cada enfermedad fibrótica, existen mecanismos distintivos de fibrosis como son la composición del infiltrado (además de la respuesta Th2/macrófago M2), vías de señalización distintas y la fuente de la que provengan los miofibroblastos.⁵⁵

Recientemente, Pillai sugirió que en la ER-IgG4 existen dos procesos o tipos de fibrosis.⁵⁶ La primera, denominada “fibrosis alérgica”, es orquestada por las células Th2 y sus citocinas; de hecho, el modelo murino de ER-IgG4 LatY136F *knock-in* que se caracteriza por una respuesta Th2 exuberante, puede reproducir la fibrosis estoriforme característica de la enfermedad.^{57,58} En la segunda, denominada “fibrosis citolítica”, el evento desencadenante parece ser la eliminación de células apoptóticas (por parte de los linfocitos T CD4+ citotóxicos) seguido de la activación por parte de células T y B del proceso reparativo por macrófagos, fibroblastos y miofibroblastos.^{56,59} En nuestro estudio encontramos que pacientes de los 4 fenotipos tenían concentraciones elevadas de las subpoblaciones celulares involucradas en los distintos tipos de fibrosis (e.j. células Th2, macrófagos M2, linfocitos T CD4+ citotóxicos), en comparación con sujetos sanos. Sin embargo, las diferencias distintivas entre cada fenotipo indican una predominancia de alguno de estos mecanismos. Además, encontramos una correlación negativa entre el porcentaje de células Th2 productoras de IL-4 e IL-5 con los linfocitos T CD4+ citotóxicos, lo cual apoya el concepto del predominio de una mecanismo fibrótico sobre el otro.

En el fenotipo pancreato-hepatobiliar se demostró una predominancia de linfocitos T CD4+ citotóxicos en comparación con las células Th2, por lo que en este fenotipo una “fibrosis citolítica” estaría principalmente involucrada. Además, es el único fenotipo en donde predominaron los macrófagos M2, pero no los M1 y también presentó predominancia de Tfh17 en lugar de Tfh1 y Tfh2. Las citocinas que estas subpoblaciones celulares secretan incluyen a la IL-1 β +, TGF- β 1, IL-33 e IL-17. Es importante señalar que la IL-17 tiene también un papel profibrótico, tal y como se ha demostrado en la fibrosis pulmonar idiopática y esclerodermia.⁶⁰

En el fenotipo retroperitoneal-aórtico predominó la respuesta Th2, por lo que es de presumirse que, en este fenotipo esta mayormente implicada la fibrosis por inmunidad Th2 o “fibrosis alérgica”. Además, se caracterizó por aumento de TCD4+ IL-21, Tfh7, Tr1 y macrófagos M1. La IL-21 puede ser profibrótica ya que acentúa los efectos de la IL-4 e IL-13 en macrófagos y se ha implicado en la inducción de fibrosis cutánea y pulmonar en modelos murinos de fibrosis inducida por bleomicina.^{61,62} Las células Tr1 se consideran inmunorreguladoras al suprimir a células T efectoras y por su papel en la regulación de la tolerancia periférica debido a que secretan IL-10;⁶³ de hecho, se ha demostrado que las células Tr1 disminuyen la inflamación colónica en un modelo murino de enfermedad inflamatoria intestinal.⁶⁴ La presencia de células Tr1 productoras de IL-10 en pacientes con este fenotipo, en pacientes con ER-IgG4 fibrótico, y en pacientes con ER-IgG4 activa como se observó en este estudio, podría ser la consecuencia y no causa del proceso fibroinflamatorio propio de la enfermedad, y estar elevadas como un mecanismo compensatorio anti-inflamatorio. Sin embargo, evidencia reciente en modelos murinos de fibrosis pulmonar sugiere que la IL-10 pudiera ser profibrótica al exacerbar la respuesta Th2, la producción de IL-4 e IL-13, el reclutamiento de fibrocitos y la activación de los macrófagos M2 mediante la vía CCL2/CCR2,^{65,66} por lo que, en ER-IgG4 la IL-10 podría ser profibrótica secundario a alguno de estos mecanismos. De hecho, un estudio reportó que los pacientes con ER-IgG4 tienen niveles elevados de CCL2 en comparación con sujetos sanos.⁶⁷ Se requieren estudios mecanísticos para determinar el papel de la IL-10 en ER-IgG4. Por otro lado, la fibrosis retroperitoneal, también llamada periaortitis, se origina de la

adventicia de la aorta y se extiende hacia el espacio peri-adventicial.⁶⁸ De igual forma, otras manifestaciones de la ER-IgG4 que pueden acompañar a la fibrosis retroperitoneal y que son consideradas dentro del fenotipo fibrótico, se originan en sitios anatómicos en donde existen órganos con adventicia: fibrosis mediastinal y mesenteritis esclerosante. La adventicia es un tejido rico en fibroblastos con capacidad de diferenciarse a miofibroblastos.⁶⁹ La combinación de mecanismos profibróticos que encontramos en este fenotipo clínico podría tener un tropismo dirigido hacia la adventicia vascular.

El inmunofenotipo de los pacientes con fenotipo limitado a cabeza y cuello fue similar al pancreato-hepatobiliar, con predominio de linfocitos T CD4+ citotóxicos y Tfh17, pero con mayor polarización hacia macrófagos M1 y fue el fenotipo donde más elevados se encontraron los porcentajes de células reguladoras: Th3, Bregs y pDC productoras de IL-10. Por lo tanto, dominaría la “fibrosis citolítica”, mediada por linfocitos T CD4+ citotóxicos y macrófagos M1, y el aumento ulterior de mecanismos reparadores manifestado por células reguladoras productoras de TGF- β 1 y IL-10.

Finalmente, los pacientes con fenotipo Mikulicz/sistémico fueron los que exhibieron las mayores concentraciones de células Th2 y menores de linfocitos T CD4+ citotóxicos, polarización hacia macrófagos M1 sobre M2, y menores porcentajes de subpoblaciones reguladoras y profibróticas (Th3, Tr1, Bregs, pDC IL-10); además, en contraste con los otros fenotipos, observamos un predominio de Tfh1 y Tfh2 sobre Tfh17. De hecho, se considera que la mayoría de las manifestaciones del fenotipo Mikulicz/sistémico pertenecen al fenotipo proliferativo de la ER-IgG4, en el cual predomina inflamación en los tejidos afectados y existe poca fibrosis.¹⁰ Lo anterior también explica nuestro hallazgos de menores porcentajes de células reguladoras y profibróticas encontrados en este fenotipo en comparación con los fenotipos en los cuales hay menos órganos afectados y mayor frecuencia de manifestaciones consideradas fibróticas como la fibrosis retroperitoneal, la mediastinitis esclerosante o la tiroiditis de Riedel.

El tratamiento con glucocorticoides y otros inmunosupresores puede disminuir la concentraciones de las distintas subpoblaciones celulares como se ha demostrado

en algunos estudios.^{13,18,20,35} Aunque en nuestro estudio no se determinaron las subpoblaciones celulares de manera prospectiva, no encontramos diferencias en las subpoblaciones celulares entre pacientes con y sin tratamiento al momento del reclutamiento; y nuestros resultados contra controles permanecieron similares al incluir solo a los pacientes sin tratamiento.

Es importante mencionar algunas de las limitaciones de nuestro estudio. En primer lugar, algunos fenotipos estuvieron infrarepresentados debido a que son infrecuentes en población hispana (e.j. fenotipo retroperitoneal/aórtico) y la muestra pequeña pudo haber impedido el encontrar resultados estadísticamente significativos; segundo, no se analizaron de manera prospectiva las distintas subpoblaciones celulares en el mismo paciente para determinar si se modifican con el tratamiento; tercero, no se determinaron otras subpoblaciones celulares que también se han reportado elevadas y con un papel fisiopatogénico putativo en ER-IgG4 como los plasmablastos, las pDC productoras de IL-33 e IFN- α o las células T cooperadoras periféricas (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺);^{16,49,70} y cuarto, no realizamos estudios mecanísticos por lo que nuestros hallazgos deben tomarse con los bemoles de un estudio basado en asociaciones y correlaciones.

A pesar de estas limitaciones, nuestro trabajo es el primero que analiza un número tan importante de subpoblaciones celulares relacionada con la fisiopatogenia de ER-IgG4 en una cohorte de pacientes de un solo centro, con abordaje y manejo homogéneos. Además, es el primer estudio en determinar las diferencias en el inmunofenotipo de cada uno de los fenotipos clínicos de la ER-IgG4 y el primero en reportar elevación de células Th9, Tr1, Th3 y macrófagos M1 en esta enfermedad.

En conclusión, los pacientes con ER-IgG4 presentan elevación de subpoblaciones celulares proinflamatorias y profibróticas. La variabilidad en la presentación clínica de los pacientes con ER-IgG4 podría deberse a la participación de diferentes subpoblaciones celulares y consecuentemente de una respuesta fibroinflamatoria distinta en cada fenotipo clínico.

10. Referencias.

1. Kamisawa T, Zen Y, Pillai S, Stone JH. IgG4-related disease. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2014;6736(14):1–12.
2. Hamano H, Kawa S, Horiuchi a, Unno H, Furuya N, Akamatsu T, et al. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *N Engl J Med*. 2001;344(10):732–8.
3. Kamisawa T, Egawa N, Nakajima H. Autoimmune pancreatitis is a systemic autoimmune disease. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(12):2811–2.
4. Kamisawa T, Funata N, Hayashi Y, Eishi Y, Koike M, Tsuruta K, et al. A new clinicopathological entity of IgG4-related autoimmune disease. *J Gastroenterol*. 2003;38(10):982–4.
5. Takahashi H, Yamamoto M, Suzuki C, Naishiro Y, Shinomura Y, Imai K. The birthday of a new syndrome: IgG4-related diseases constitute a clinical entity. *Autoimmunity Reviews*. 2010. p. 591–4.
6. Martín-Nares E, Ángeles-Ángeles A, Hernandez-Molina G. Major salivary gland enlargement in IgG4-related disease is associated with multiorgan involvement and higher basal disease activity. *Mod Rheumatol*. 2019 Jan 24:1-5.
7. Inoue D, Yoshida K, Yoneda N, Ozaki K. IgG4-Related Disease: Dataset of 235 Consecutive Patients. 2015;94(1354):1–8.
8. Wallace ZS, Deshpande V, Mattoo H, Mahajan VS, Kulikova M, Pillai S, et al. IgG4-Related Disease: Clinical and Laboratory Features in One Hundred Twenty-Five Patients. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(9):2466–75.
9. Wallace ZS, Zhang Y, Perugino CA, Naden R, Choi HK, Stone JH; ACR/EULAR IgG4-RD Classification Criteria Committee. Clinical phenotypes of IgG4-related disease: an analysis of two international cross-sectional cohorts. *Ann Rheum Dis*. 2019 Mar;78(3):406-412.
10. Zhang W, Stone JH. Management of IgG4-related disease. *Lancet Rheumatol*. September 2019.
11. Zen Y, Fujii T, Harada K, Kawano M, Yamada K, Takahira M, Nakanuma Y. Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis. *Hepatology*. 2007 Jun;45(6):1538-46.

12. Tanaka A, Moriyama M, Nakashima H, et al. Th2 and regulatory immune reactions contribute to IgG4 production and the initiation of Mikulicz disease. *Arthritis Rheum.* 2012 Jan;64(1):254-63.
13. Grados A, Ebbo M, Piperoglou C, et al. T Cell Polarization toward T(H)2/T(FH)2 and T(H)17/T(FH)17 in Patients with IgG4-Related Disease. *Front Immunol.* 2017 Mar 13;8:235.
14. Heeringa JJ, Karim AF, van Laar JAM, Verdijk RM, Paridaens D, van Hagen PM, van Zelm MC. Expansion of blood IgG4(+) B, T(H)2, and regulatory T cells in patients with IgG4-related disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 May;141(5):1831-1843.e10.
15. Mattoo H, Della Torre E, Mahajan VS, et al. Circulating Th2 memory cells in IgG4-related disease are restricted to a defined subset of subjects with atopy. *Allergy* 2014;69:399-402
16. Mattoo H, Mahajan VS, Della-Torre E, et al. De novo oligoclonal expansions of circulating plasmablasts in active and relapsing IgG4-related disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;134(3):679–87.
17. Della-Torre E, Rigamonti E, Perugino C, et al. B lymphocytes directly contribute to tissue fibrosis in IgG4-Related Disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Jul 15
18. Mattoo H, Mahajan VS, Maehara T et al. Clonal expansion of CD4+ cytotoxic T lymphocytes in patients with IgG4-related disease. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:825-838
19. Maehara T, Mattoo H, Ohta M, Mahajan VS, Moriyama M, Yamauchi M, Drijvers J, Nakamura S, Stone JH, Pillai SS. Lesional CD4+ IFN- γ + cytotoxic T lymphocytes in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis. *Ann Rheum Dis.* 2017 Feb;76(2):377-385.
20. Della-Torre E, Bozzalla-Cassione E, Sciorati C, Ruggiero E, Lanzillotta M, Bonfiglio S, Mattoo H, Perugino CA, Bozzolo E, Rovati L, Arcidiacono PG, Balzano G, Lazarevic D, Bonini C, Falconi M, Stone JH, Dagna L, Pillai S, Manfredi AA. A CD8 α - Subset of CD4+SLAMF7+ Cytotoxic T Cells Is Expanded in Patients With IgG4-Related Disease and Decreases Following Glucocorticoid Treatment. *Arthritis Rheumatol.* 2018 Jul;70(7):1133-1143.

21. Akiyama M, Suzuki K, Yamaoka K, Yasuoka H, Takeshita M, Kaneko Y, Kondo H, Kassai Y, Miyazaki T, Morita R, Yoshimura A, Takeuchi T. Number of Circulating Follicular Helper 2 T Cells Correlates With IgG4 and Interleukin-4 Levels and Plasmablast Numbers in IgG4-Related Disease. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Sep;67(9):2476-81.
22. Akiyama M, Yasuoka H, Yamaoka K et al. Enhanced IgG4 production by follicular helper 2 T cells and the involvement of follicular helper 1 T cells in the pathogenesis of IgG4-related disease. *Arthritis Res Ther* 2016;18:167
23. Furukawa S, Moriyama M, Miyake L, et al. Interleukin-33 produced by M2 macrophages and other immune cells contributes to Th2 immunoreaction of IgG4-related disease. *Sci Rep*. 2017 Feb 13;7:42413.
24. Ishiguro N, Moriyama M, Furusho K, et al. Activated M2 macrophage contributes to the pathogenesis of IgG4-related disease via TLR7/IL-33 signaling. *Arthritis Rheumatol*. 2019 Jul 23.
25. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y et al. Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD). 2011. *Mod Rheumatol*. 2012;22(1):21–30.
26. Wallace ZS, Khosroshahi A, Carruthers MD, et al. An International Multispecialty Validation Study of the IgG4-Related Disease Responder Index. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2018 Nov;70(11):1671-1678.
27. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001; 56:813–824.
28. Lighaam LC, Rispens T. The Immunobiology of Immunoglobulin G4. *Semin Liver Dis*. 2016 Aug;36(3):200-15.
29. Kanari H, Kagami S, Kashiwakuma D, Oya Y, Furuta S, Ikeda K, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Watanabe N, Okamoto Y, Yamamoto S, Iwamoto I, Nakajima H. Role of Th2 cells in IgG4-related lacrimal gland enlargement. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152 Suppl 1:47-53.
30. Saito Y, Kagami S, Kawashima S, Takahashi K, Ikeda K, Hirose K, Oshitari T, Yamamoto S, Okamoto Y, Nakajima H. Roles of CRTH2+ CD4+ T cells in

- immunoglobulin G4-related lacrimal gland enlargement. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;158 Suppl 1:42-6.
31. Müller T, Beutler C, Picó AH, et al. Increased T-helper 2 cytokines in bile from patients with IgG4-related cholangitis disrupt the tight junction-associated biliary epithelial cell barrier. *Gastroenterology*. 2013 May;144(5):1116-28.
 32. Maehara T, Moriyama M, Nakashima H, Miyake K, Hayashida JN, Tanaka A, Shinozaki S, Kubo Y, Nakamura S. Interleukin-21 contributes to germinal centre formation and immunoglobulin G4 production in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. *Ann Rheum Dis*. 2012 Dec;71(12):2011-19.
 33. Gieseck RL 3rd, Wilson MS, Wynn TA. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nat Rev Immunol*. 2018 Jan;18(1):62-76.
 34. Ciccia F, Guggino G, Ferrante A et al. Interleukin-9 and T helper type 9 cells in rheumatic diseases. *Clin Exp Immunol*. 2016 Aug;185(2):125-32
 35. Kubo S, Nakayamada S, Zhao J, et al. Correlation of T follicular helper cells and plasmablasts with the development of organ involvement in patients with IgG4-related disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2018 Mar 1;57(3):514-524.
 36. Kamekura R, Takano K, Yamamoto M, Kawata K, Shigehara K, Jitsukawa S, Nagaya T, Ito F, Sato A, Ogasawara N, Tsubomatsu C, Takahashi H, Nakase H, Himi T, Ichimiya S. Cutting Edge: A Critical Role of Lesional T Follicular Helper Cells in the Pathogenesis of IgG4-Related Disease. *J Immunol*. 2017 Oct 15;199(8):2624-2629.
 37. Chen Y, Lin W, Yang H, Wang M, Zhang P, Feng R, Chen H, Peng L, Zhang X, Zhao Y, Zeng X, Zhang F, Zhang W, Lipsky PE. Aberrant Expansion and Function of Follicular Helper T Cell Subsets in IgG4-Related Disease. *Arthritis Rheumatol*. 2018 Nov;70(11):1853-1865.
 38. Cargill T, Makuch M, Sadler R, Lighaam LC, Peters R, van Ham M, Klenerman P, Bateman A, Rispen T, Barnes E, Culver EL. Activated T-Follicular Helper 2 Cells Are Associated With Disease Activity in IgG4-Related Sclerosing Cholangitis and Pancreatitis. *Clin Transl Gastroenterol*. 2019 Apr;10(4):e00020.

39. Ito F, Kamekura R, Yamamoto M, Takano K, Takaki H, Yabe H, Ikegami I, Shigehara K, Himi T, Takahashi H, Ichimiya S. IL-10(+) T follicular regulatory cells are associated with the pathogenesis of IgG4-related disease. *Immunol Lett.* 2019 Mar;207:56-63.
40. Maehara T, Mattoo H, Mahajan VS, Murphy SJ, Yuen GJ, Ishiguro N, Ohta M, Moriyama M, Saeki T, Yamamoto H, Yamauchi M, Daccache J, Kiyoshima T, Nakamura S, Stone JH, Pillai S. The expansion in lymphoid organs of IL-4(+) BATF(+) T follicular helper cells is linked to IgG4 class switching in vivo. *Life Sci Alliance.* 2018 Jan;1(1). pii: e201800050.
41. Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells. *Immunol Rev.* 2016 May;271(1):246-59.
42. Miyoshi H, Uchida K, Taniguchi T, Yazumi S, Matsushita M, Takaoka M, Okazaki K. Circulating naïve and CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in patients with autoimmune pancreatitis. *Pancreas.* 2008 Mar;36(2):133-40.
43. Kawamura E, Hisano S, Nakashima H, Takeshita M, Saito T. Immunohistological analysis for immunological response and mechanism of interstitial fibrosis in IgG4-related kidney disease. *Mod Rheumatol.* 2015 Jul;25(4):571-8.
44. Sumimoto K, Uchida K, Kusuda T, Mitsuyama T, Sakaguchi Y, Fukui T, Matsushita M, Takaoka M, Nishio A, Okazaki K. The role of CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} and CD19⁺ CD24^{high} CD27⁺ regulatory B cells in patients with type 1 autoimmune pancreatitis. *Pancreatol.* 2014 May-Jun;14(3):193-200.
45. Lin W, Jin L, Chen H, Wu Q, Fei Y, Zheng W, Wang Q, Li P, Li Y, Zhang W, Zhao Y, Zeng X, Zhang F. B cell subsets and dysfunction of regulatory B cells in IgG4-related diseases and primary Sjögren's syndrome: the similarities and differences. *Arthritis Res Ther.* 2014 May 29;16(3):R118.
46. Furukawa S, Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Tsuboi H, Iizuka M, Hayashida JN, Ohta M, Saeki T, Notohara K, Sumida T, Nakamura S. Preferential M2 macrophages contribute to fibrosis in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. *Clin Immunol.* 2015 Jan;156(1):9-18.
47. Kawakami T, Mizushima I, Yamada K, Fujii H, Ito K, Yasuno T, Izui S, Yamagishi M, Huard B, Kawano M. Abundant a proliferation-inducing ligand (APRIL)-

- producing macrophages contribute to plasma cell accumulation in immunoglobulin G4-related disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2019 Jun 1;34(6):960-969.
48. Arai Y, Yamashita K, Kuriyama K, Shiokawa M, Kodama Y, Sakurai T, Mizugishi K, Uchida K, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Kudo M, Okazaki K, Strober W, Chiba T, Watanabe T. Plasmacytoid Dendritic Cell Activation and IFN- α Production Are Prominent Features of Murine Autoimmune Pancreatitis and Human IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. *J Immunol*. 2015 Oct 1;195(7):3033-44.
49. Watanabe T, Yamashita K, Arai Y, Minaga K, Kamata K, Nagai T, Komeda Y, Takenaka M, Hagiwara S, Ida H, Sakurai T, Nishida N, Strober W, Kudo M. Chronic Fibro-Inflammatory Responses in Autoimmune Pancreatitis Depend on IFN- α and IL-33 Produced by Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Immunol*. 2017 May 15;198(10):3886-3896.
50. Schülke S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front Immunol*. 2018 Mar 19;9:455.
51. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018 Sep;233(9):6425-6440.
52. Altintas N, Erboga M, Aktas C, Bilir B, Aydin M, Sengul A, Ates Z, Topcu B, Gurel A. Protective Effect of Infliximab, a Tumor Necrosis Factor- α Inhibitor, on Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats. *Inflammation*. 2016 Feb;39(1):65-78.
53. Wang H, Li J, Gai Z, Kullak-Ublick GA, Liu Z. TNF- α Deficiency Prevents Renal Inflammation and Oxidative Stress in Obese Mice. *Kidney Blood Press Res*. 2017;42(3):416-427.
54. Hong X, Min SN, Zhang YY, Lin YT, Wang F, Huang Y, Yu GY, Wu LL, Yang HY. TNF- α Suppresses Autophagic Flux in Acinar Cells in IgG4-Related Sialadenitis. *J Dent Res*. 2019 Nov;98(12):1386-1396.

55. Distler JHW, Györfi AH, Ramanujam M, Whitfield ML, Königshoff M, Lafyatis R. Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019 Dec;15(12):705-730
56. Pillai S. T and B lymphocytes in fibrosis and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2019 Nov;31(6):576-581.
57. Yamada K, Zuka M, Ito K, Mizuguchi K, Kakuchi Y, Onoe T, Suzuki Y, Yamagishi M, Izui S, Malissen M, Malissen B, Kawano M. LatY136F knock-in mouse model for human IgG4-related disease. *PLoS One*. 2018 Jun 14;13(6):e0198417.
58. Cui Y, Masaki K, Zhang X, Yamasaki R, Fujii T, Ogata H, Hayashida S, Yamaguchi H, Hyodo F, Eto H, Koyama S, Iinuma K, Yonekawa T, Matsushita T, Yoshida M, Yamada K, Kawano M, Malissen M, Malissen B, Kira J. A novel model for treatment of hypertrophic pachymeningitis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019 Jan 15;6(3):431-444.
59. Bosurgi L, Cao YG, Cabeza-Cabrero M, Tucci A, Hughes LD, Kong Y, Weinstein JS, Licona-Limon P, Schmid ET, Pelorosso F, Gagliani N, Craft JE, Flavell RA, Ghosh S, Rothlin CV. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science*. 2017 Jun 9;356(6342):1072-1076.
60. Ramani K, Biswas PS. Interleukin-17: Friend or foe in organ fibrosis. *Cytokine*. 2019 Aug;120:282-288.
61. Pesce J, Kaviratne M, Ramalingam TR, Thompson RW, Urban JF Jr, Cheever AW, Young DA, Collins M, Grusby MJ, Wynn TA. The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):2044-55. Epub 2006 Jun 15.
62. Lei L, He ZY, Zhao C, Sun XJ, Zhong XN. Elevated frequencies of CD4(+) IL-21(+) T, CD4(+) IL-21R(+) T and IL-21(+) Th17 cells, and increased levels of IL-21 in bleomycin-induced mice may be associated with dermal and pulmonary inflammation and fibrosis. *Int J Rheum Dis*. 2016 Apr;19(4):392-404.
63. Zeng H, Zhang R, Jin B, Chen L. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol*. 2015 Sep;12(5):566-71.

64. Jeon SG, Kayama H, Ueda Y, Takahashi T, Asahara T, Tsuji H, Tsuji NM, Kiyono H, Ma JS, Kusu T, Okumura R, Hara H, Yoshida H, Yamamoto M, Nomoto K, Takeda K. Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog.* 2012;8(5):e1002714.
65. Barbarin V, Xing Z, Delos M, Lison D, Huaux F. Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 May;288(5):L841-8.
66. Sun L, Louie MC, Vannella KM, Wilke CA, LeVine AM, Moore BB, Shanley TP. New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011 Mar;300(3):L341-53.
67. Kawashiri SY, Origuchi T, Umeda M, Nishino A, Shimizu T, Fukui S, Koga T, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Maeda T, Kawano M, Yamamoto M, Izumi Y, Kawakami A. Association of serum levels of fibrosis-related biomarkers with disease activity in patients with IgG4-related disease. *Arthritis Res Ther.* 2018 Dec 14;20(1):277.
68. Vaglio A, Maritati F. Idiopathic Retroperitoneal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2016 Jul;27(7):1880-9.
69. Kuwabara JT, Tallquist MD. Tracking Adventitial Fibroblast Contribution to Disease: A Review of Current Methods to Identify Resident Fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Sep;37(9):1598-1607.
70. Kamekura R, Yamamoto M, Takano K, Yabe H, Ito F, Ikegami I, Takaki H, Shigehara K, Suzuki C, Himi T, Takahashi H, Ichimiya S. Circulating PD-1(+)/CXCR5(-)/CD4(+) T cells underlying the immunological mechanisms of IgG4-related disease. *Rheumatol Adv Pract.* 2018 Oct 17;2(2):rky043.

11. Material suplementario.

Tabla suplementaria 1. Subpoblaciones celulares en pacientes con ER-IgG4 de acuerdo a fenotipo proliferativo vs fibrótico.			
	Proliferativo (N=33)	Fibrótico (N=10)	P
Th2 (IL-4; %)	4.70 (1.09-18.50)	4.80 (1.04-19.40)	0.83
Th2 (IL-13; %)	6.24 (1.10-18.40)	7.33 (1.10-23.60)	0.62
Th2 (IL-5; %)	4.72 (1.46-23)	5.19 (1.20-9.96)	1
TCD4+ (IL-21; %)	5.68 (1.46-22.90)	6.56 (3.32-16.80)	0.76
Th9 (%)	6 (1.67-26.80)	5.79 (1.44-11.80)	0.72
TCD4+ citotóxicos (%)	26.10 (13-51.40)	24.70 (9.82-53.10)	0.70
Tfh (CXCR5+ ICOS+Bcl6+) (%)	6.06 (2.61-18.30)	6.39 (4.20-12.70)	0.45
Tfh1 (%)	11 (4.14-20.40)	9.54 (7.87-11.30)	0.22
Tfh2 (%)	12.20 (5.27-23.40)	9.15 (5.95-13.40)	0.055
Tfh17 (%)	7.42 (4.42-18)	12.95 (8.42-18.20)	0.002
Tfr (%)	11.30 (7.27-19.90)	9.09 (7.32-13.50)	0.041
Tregs (FOXP3 +; %)	11.30 (7.27-19.90)	9.09 (7.32-13.50)	0.56
Tr1 (%)	7.47 (3.43-16.10)	11.05 (6.68-23)	0.01
Th3 (%)	12.10 (3.65-23)	12.75 (7.16-25.50)	0.54
Bregs (%)	13.80 (5.22-20.50)	14.40 (7.54-19.80)	0.81
pDC IL-10 (%)	12.20 (2.99-21.20)	13.20 (8.25-29.20)	0.27
Macrófagos M2 (%)	10.20 (5.29-17.60)	11.80 (8.03-13.40)	0.11
Macrófagos M1 (%)	14.10 (4.53-26.30)	18.20 (4.95-26.80)	0.059

Todos los resultados se presentan en medianas del porcentaje de células (intervalo min-max). La comparación entre ambos grupos se realizó mediante prueba de U de Mann-Whitney.

Tabla suplementaria 2. Subpoblaciones celulares en pacientes con ER-IgG4 activa vs inactiva.			
	Activa (N=22)	Inactiva (N=21)	P
Th2 (IL-4; %)	3.16 (1.04-19.40)	5.76 (1.09-18.50)	0.123
Th2 (IL-13; %)	6.36 (1.10-23.60)	6.45 (1.30-18.40)	0.923
Th2 (IL-5; %)	4.60 (1.20-23)	5.47 (2.36-9.96)	0.369
TCD4+ (IL-21; %)	6.07 (2.74-16.80)	6.36 (1.46-22.90)	0.437
Th9 (%)	5.34 (1.44-26.80)	6.91 (1.67-18.50)	0.308
TCD4+ citotóxicos (%)	25.80 (17.90-53.10)	26.10 (9.82-40.70)	0.528
Tfh (CXCR5+ ICOS+Bcl6+) (%)	7.93 (2.67-18.30)	5.54 (2.61-7.35)	<0.001
Tfh1 (%)	10.47 (4.71-19.50)	9.59 (4.14-20.40)	0.942
Tfh2 (%)	12.27 (5.69-23.40)	10.40 (5.27-18.90)	0.206
Tfh17 (%)	10.60 (5.21-18.20)	7.01 (4.42-11.10)	<0.001
Tfr (%)	10.70 (7.41-19.90)	10.90 (7.41-19.90)	0.874
Tregs (FOXP3 +; %)	10.95 (7.06-14.30)	11.40 (7.10-15.40)	0.610
Tr1 (%)	11.50 (5.21-23)	6.67 (3.43-11.60)	0.001
Th3 (%)	13.75 (8.09-25.50)	11.30 (3.65-21.70)	0.010
Bregs (%)	13.74 (7.52-19.80)	14 (5.22-20.50)	0.496
pDC IL-10 (%)	13.65 (8.60-29.20)	10.20 (2.99-21.20)	0.005
Macrófagos M2 (%)	11.35 (6.99-13.50)	9.68 (5.29-17.60)	0.148
Macrófagos M1 (%)	17.10 (5.86-26.80)	13.17 (4.53-26.30)	0.017

Todos los resultados se presentan en medianas del porcentaje de células (intervalo min-max). La comparación entre ambos grupos se realizó mediante prueba de U de Mann-Whitney.