

*ESTRUCTURACIÓ DE LA RESPOSTA B A LES
MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES DE LA TIROIDE*

*MEMÒRIA DE LA TESI PRESENTADA PER A OBTENIR EL GRAU DE DOCTOR EN
CIÈNCIES BIOLÒGIQUES PER LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA.
BELLATERRA, GENER 2004*

Ma del Pilar Armengol i Barnils

A partir d'aquest punt té lloc una reorganització del fol·licle primari, que esdevé en la formació d'un **fol·licle limfoide secundari** que conté un **centre germinal**. Aquest procés reorganitzador està altament regulat i s'hi poden definir els tres punts essencials coneguts com a *check-points* o punts de control que es comenten a continuació.

1^{er} punt de control: selecció per especificitat antigènica

Té lloc a la zona externa del fol·licle (*figura 9*), rica en cèl·lules T col·laboradores (Th) (majoritàriament CD4⁺, CD62L⁻) i en cèl·lules dendrítiques interdigitants (IDCs)^{248,247}. Quan les Th reconeixen antigen en la superfície de les IDCs, migren cap al fol·licle primari on coincideixen amb els limfòcits B activats que també han reconegut antigen natiu (IgM^{baix}IgD^{baix}CD21^{baix}CD23⁻CD24^{alt}). L'activitat coordinada d'aquests dos tipus cel·lulars implica la inducció de senyals accessoris coestimuladors de les cèl·lules Th i de les presentadores d'antigen (APCs) i la producció de citocines i de factors quimiotàctics. Alguns senyals d'activació descrits fins ara com a centrals són les interaccions CD40/CD154 (per a les cèl·lules B) i CD28/CD86 (per a les cèl·lules T). El paper fonamental d'aquestes unions s'ha demostrat en ratolins tractats amb anticossos anti-CD40, anti-CD86 o amb CD40 soluble en els que no es generen fol·licles limfoides ni cèl·lules B madures^{249,250,251}. *In vivo* també s'ha demostrat la implicació d'aquestes interaccions en animals knockout per CD28²⁵² i en pacients amb la síndrome d'hiper-IgM lligada al cromosoma X²⁵³, en els que no es formen CGs.

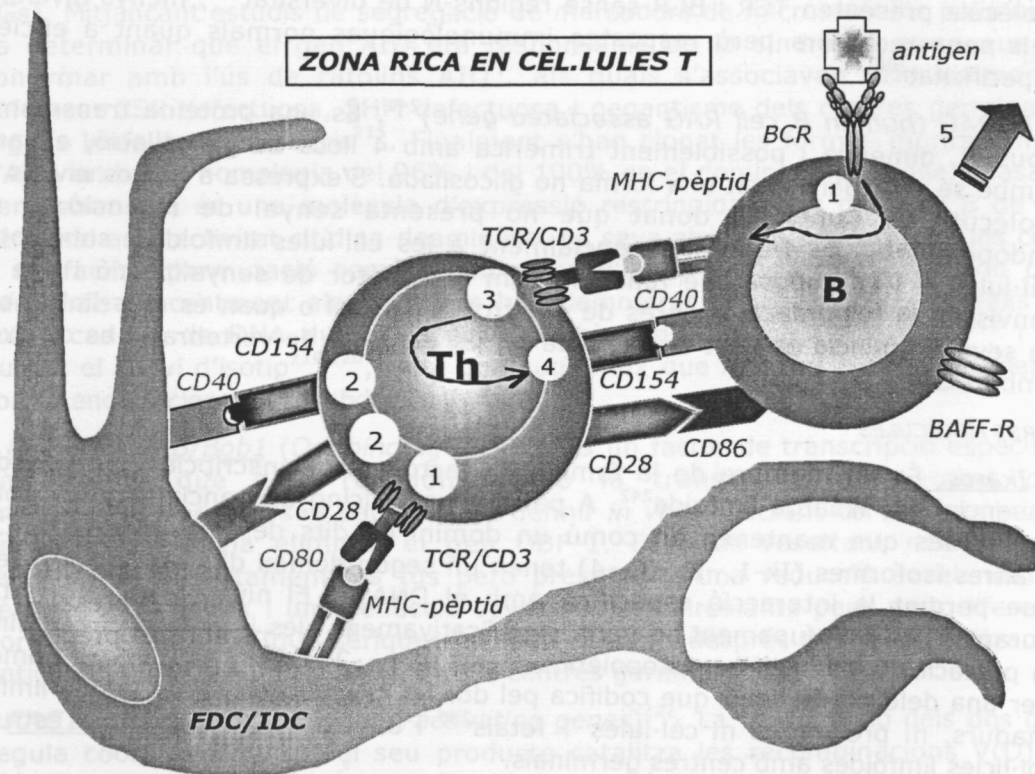


Fig. 9 1er punt de control o selecció per especificitat antigènica en la maduració perifèrica de les cèl·lules B que té lloc en la zona rica en cèl·lules T. Pas 1: les cèl·lules B específiques d'antigen s'activen per reconeixement a través del BCR d'antigen natiu en la superfície de les FDCs alhora que les cèl·lules T amb la mateixa especificitat reconeixen antigen processat i presentat per molècules de MHC de classe II en les FDCs. Pas 2: coestimulació de les cèl·lules T per les unions CD40/CD154 i CD80/CD28. Pas 3: interacció entre cèl·lules T i B específiques d'antigen. Pas 4: segon senyal d'activació per les cèl·lules B via la interacció CD40/CD154 i, pas 5: inici de la reacció centre germinal

Un cop activades, les cèl·lules B regulen negativament la seva Ig de superfície i inicien una fase de proliferació i d'expansió clonal massiva en la que es divideixen durant 6-7 hores²⁵⁴. Es diferencien a **centroblastes**, desplacen físicament la resta de cèl·lules que no es divideixen activament (*figura 10*) i s'organitza l'estructura anomenada **centre germinal** que té com a finalitat l'expansió del repertori de cèl·lules B madures perifèriques (IgM⁺IgD⁺). Els receptors de complement CR1 i CR2 a les cèl·lules B sembla que també juguen un paper important en l'inici i la progressió de la reacció centre germinal²⁵⁵, així com el receptor tipus I de la limfotoxina alfa²⁵⁶. Durant la fase proliferativa, que té lloc a la zona fosca (DZ), el repertori d'anticossos es diversifica mitjançant el mecanisme d'**hipermutació somàtica** en el que s'acumulen ràpidament mutacions somàtiques a l'atzar (10^3 bp⁻¹ per generació) en les regions variables de les cadenes pesades i lleugeres de les Igs^{257,258}. El mecanisme exacte pel qual té lloc la hipermutació somàtica no és totalment conegut, però se sap que la contribució dels enzims RAG-1 i RAG-2, l'activitat de l'enzim TdT i l'expressió de l'enzim d'AID són fonamentals. Com a conseqüència, es generen clons de cèl·lules B amb regions V_H CDR3 diferents²⁵⁹, que expressen BCRs molts diversos i la majoria dels quals no generen senyals de supervivència. En aquest context, si el procés d'hipermutació continués i, per tant, s'acumules un gran nombre de mutacions deletèries, la cèl·lula B podria acabar morint. Així, els centroblastes estan destinats a morir en absència de senyals positius que els rescatin de la mort cel·lular programada o apoptosi. Això ha estat demostrat en cèl·lules B de GC aïllades i cultivades durant 16 hores²⁶⁰ en les que la tendència a l'apoptosi es correlaciona amb l'alta expressió de gens apoptòtics com *c-myc*, *Bax* i *CD95* i amb l'absència d'expressió de gens antiapoptòtics com *Bcl-2*²⁰¹. És per això que és fonamental l'arribada de senyals de rescat antiapoptòtics i en aquest sentit, el reconeixement de la nova Ig produïda juga un paper central en la progressió de la resposta.

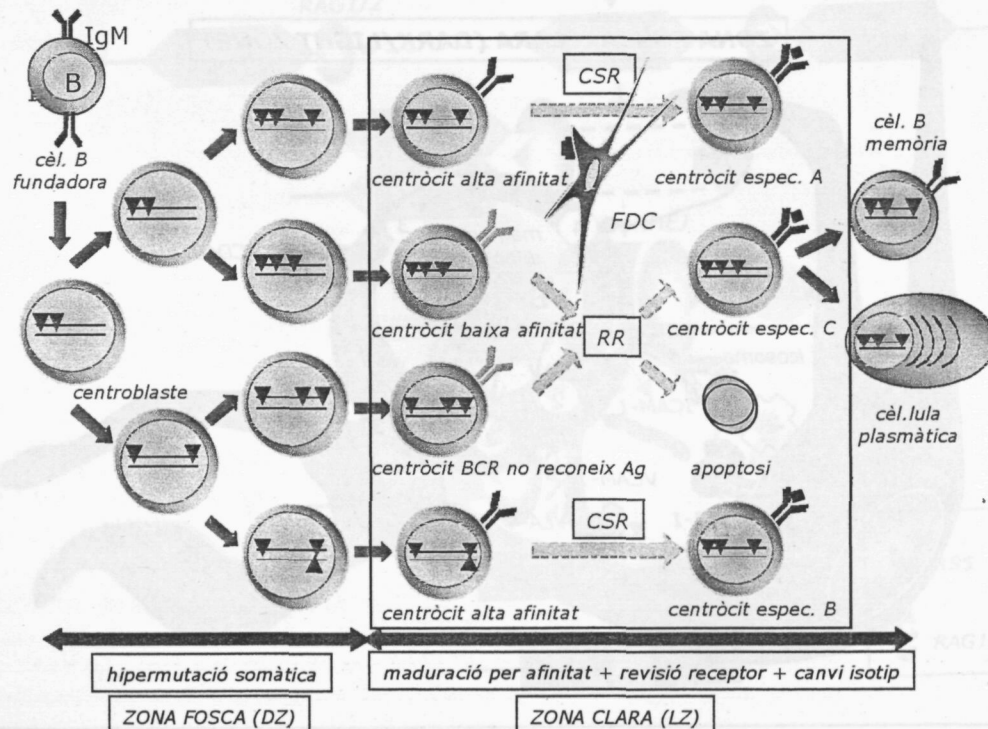


Fig. 10 Mecanismes que tenen lloc a la "reacció de centre germinal". Els triangles invertits assenyalen els llocs gènics en els que ha tingut lloc una modificació de les immunoglobulines. CSR, class switch recombination (canvi d'isotip); RR, receptor revision (revisió del receptor).

2^{on} punt de control: selecció per afinitat del receptor

Un cop aturada la hipermutació somàtica, té lloc el procés anomenat *maduració per afinitat* a la zona clara (LZ) dels centres germinals (*figura 11*). En aquesta àrea, a més de **centròcits** (cèl·lules B que han aturat el procés de replicació) que reexpressen la seva Ig de superfície, també es troben cèl·lules Th activades, macròfags (tingible body macrophages, TBM) i cèl·lules dendrítiques fol·liculars (FDCs). En general, s'assumeix que el BCR del centròcit ha de ser capaç de competir per la unió a l'antigen amb els immunocomplexos en la superfície de les FDCs. Així doncs, el centròcit de nova generació que expressarà receptor de baixa afinitat i no serà "competitiu" morirà per apoptosi, mentre que el que hagi incrementat l'afinitat del seu receptor després de la hipermutació serà seleccionat positivament²⁶⁰ i podrà diferenciar-se cap a cèl·lula B de memòria o cap a cèl·lula plasmàtica formadora d'anticossos^{248,261} en funció dels senyals de coestimulació rebuts de les FDCs. Així, se sap que la producció d'IL-4 dirigeix les cèl·lules B cap a la diferenciació a cèl·lules memòria, mentre que IL-10 les indueix a cèl·lules plasmàtiques²⁶². En tots els casos, però, actuen ambdós tipus de senyals, donat que la resposta humoral s'acompanya de la producció d'ambdues formes cel·lulars B.

S'ha demostrat que els senyals involucrats en la inhibició de la mort dels centròcits derivarien del reconeixement dels antigens pel BCR, que se segueix d'una inducció ràpida de l'expressió de molècules d'adhesió. També s'ha suggerit que la unió de CD40 és un senyal per prevenir apoptosi, però, encara que se sap que el reconeixement a través de CD40 la retarda en les cèl·lules B de centre germinal durant 48-72 hores, no la prevé del tot i, a més, el bloqueig de les interaccions entre CD40/CD154 no fa augmentar el nombre de cèl·lules apoptòtiques^{263,264}. En altres experiments s'ha demostrat també la presència de conexina 43 (Cx43) entre FDCs i entre FDCs-B que suggereix l'intercanvi de substàncies de baix pes molecular^{265,266} entre elles.

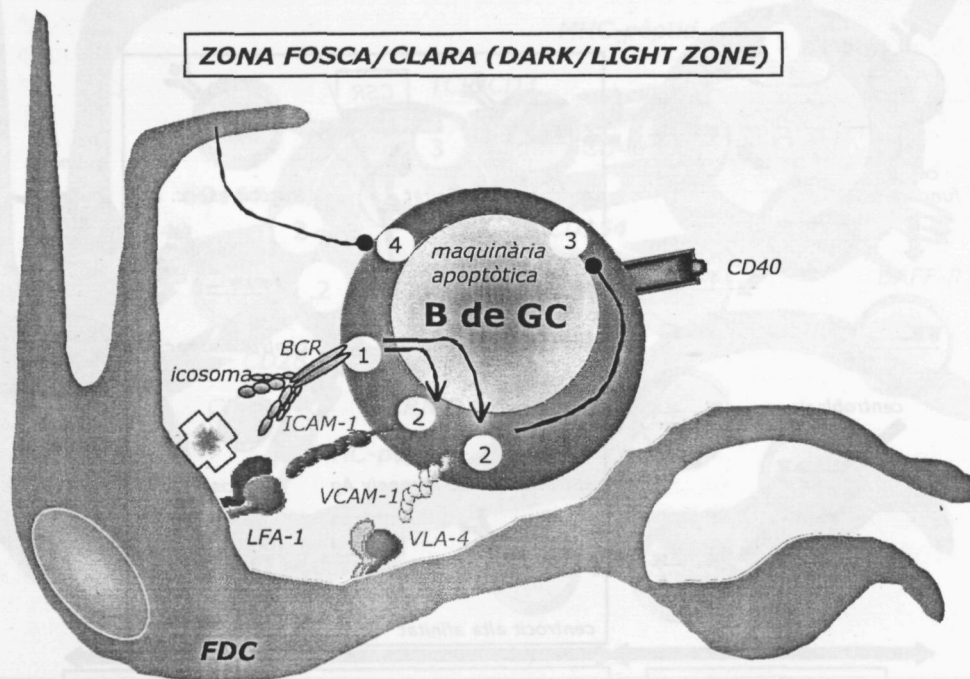


Fig. 11 Zon punt de control o selecció per afinitat ja en el centre germinal. Pas 1: les cèl·lules B de GC se seleccionen per competició en funció de l'afinitat del seu BCR per l'antigen, que indueix (pas 2) l'expressió de LFA-1 i VLA-4 en les cèl·lules FDC i dels seus respectius lligands en les cèl·lules B. Pas 3: aturada temporal de la maquinària apoptòtica. Pas 4: alliberament per part de les FDCs de substàncies de baix pes molecular que inhibeixen definitivament l'apoptosi i resultaria en el rescat final d'algunes cèl·lules B.

En tot aquest procés s'afegeix un altre mecanisme per tal de rescatar limfòcits que durant la resposta han perdut la capacitat de reconèixer eficientment l'antigen. Així, de forma similar a l'edició del receptor descrita en el moll d'os, les cèl·lules B perifèriques madures poden modificar l'especificitat del seu BCR mitjançant el fenomen de *revisió del receptor*^{267,268,234,269-271} en els centres germinals dels fol·licles limfoides secundaris (figura 12). La primera evidència d'aquest nou reordenament gènic va ser que RAG, tant a nivell d'mRNA com de proteïna, s'indueïa en els centròcits tant de la melsa com dels nòduls limfàtics en ratolins immunitzats²⁷² i *in vitro* tractant cèl·lules B esplèniques amb agonistes de CD40 i IL4 (que a la vegada indueixen canvi d'isotip). El tractament combinat amb LPS i IL-4²⁷² o amb IL-7 aconseguia també la reexpressió de RAG²⁷³. La revisió del receptor no està restringida a les cèl·lules B, sinó que els limfòcits T CD4⁺ també poden modificar la seva cadena β del TCR en perifèria²⁷⁴. Contràriament a l'edició del receptor en els òrgans primaris, que és dirigida a minvar l'autoreactivitat, la finalitat de la revisió del receptor és controvertida. La majoria d'autors coincideixen a considerarla com a un fenomen que té lloc per evitar l'apoptosi de cèl·lules que després de la hipermutació somàtica han minvat la seva afinitat per l'antigen^{269,270}. Això es va considerar usant animals transgènics en els que es trobaven anticossos autoreactius enlloc dels del repertori d'Igs endògenes^{97,96}. En aquests models, les B autoreactives es toleritzaven al moll d'os i els seus receptors es revisaven per generar especificitats reactives contra antígens no propis. Per tant, encara que pugui contribuir a mantenir la tolerància, també pot determinar una modificació en el repertori d'autoreactivitat.

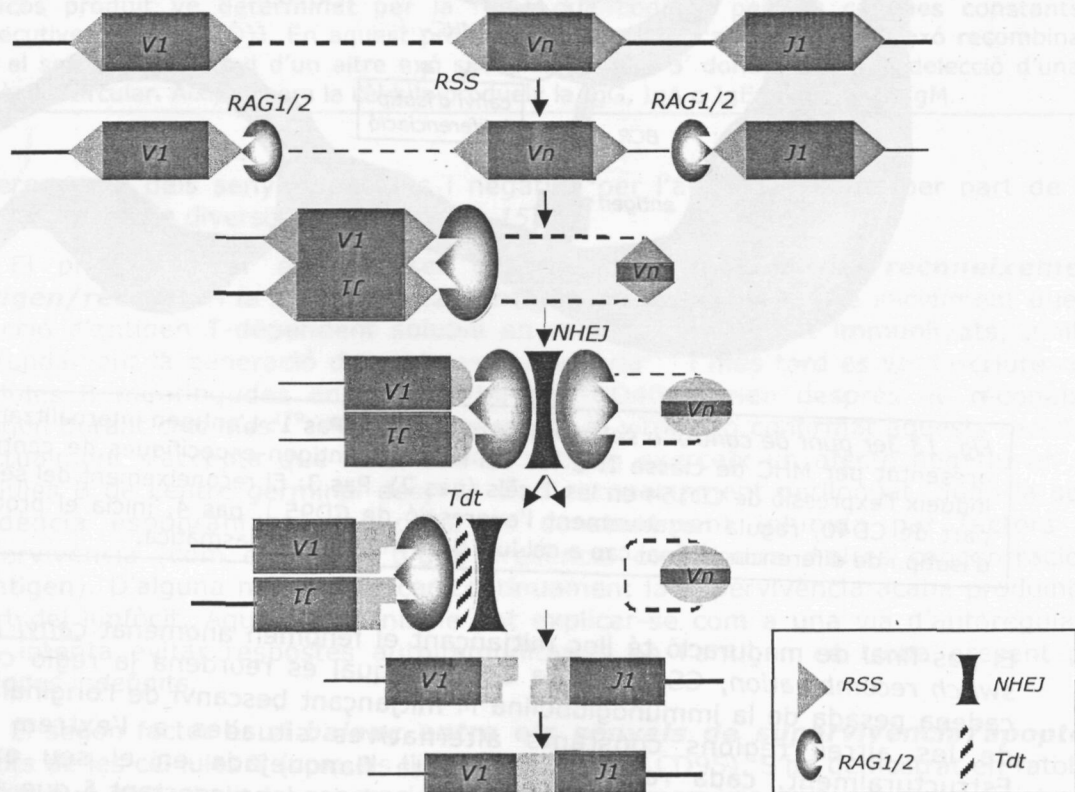


Fig. 12 Mecanismes que tenen lloc en la revisió del receptor destinada a evitar la mort cel·lular per apoptosi mitjançant la modificació secundària del receptor de la cèl·lula B quan després del procés d'hipermutació somàtica s'ha generat un receptor de menor afinitat per l'antigen. NHEJ, nonhomologous end-joining; RSS, seqüència de senyal de recombinació; Tdt, terminal deoxinucleotidyl transferase.

3^{er} punt de control: selecció per canvi d'isotip i maduració

Els mecanismes descrits als paràgrafs anteriors garanteixen la selecció de cèl·lules B memòria amb un BCR d'alta afinitat, però les cèl·lules B amb BCR irrelevant o no desitjat poden sobreviure i rebre senyals de maduració com a resultat del reconeixement de diferents antígens en les FDCs. És en aquest moment en que les cèl·lules T esdevenen crítiques en el procés de maduració de les cèl·lules B seleccionades o rescatades de la mort cel·lular (figura 13). L'antigen que les cèl·lules B han reconegut, pot ser processat i presentat per classe II a les cèl·lules Th, que a la vegada proporcionarien senyals de coestimulació cap a la diferenciació a cèl·lules B memòria o cèl·lules plasmàtiques.

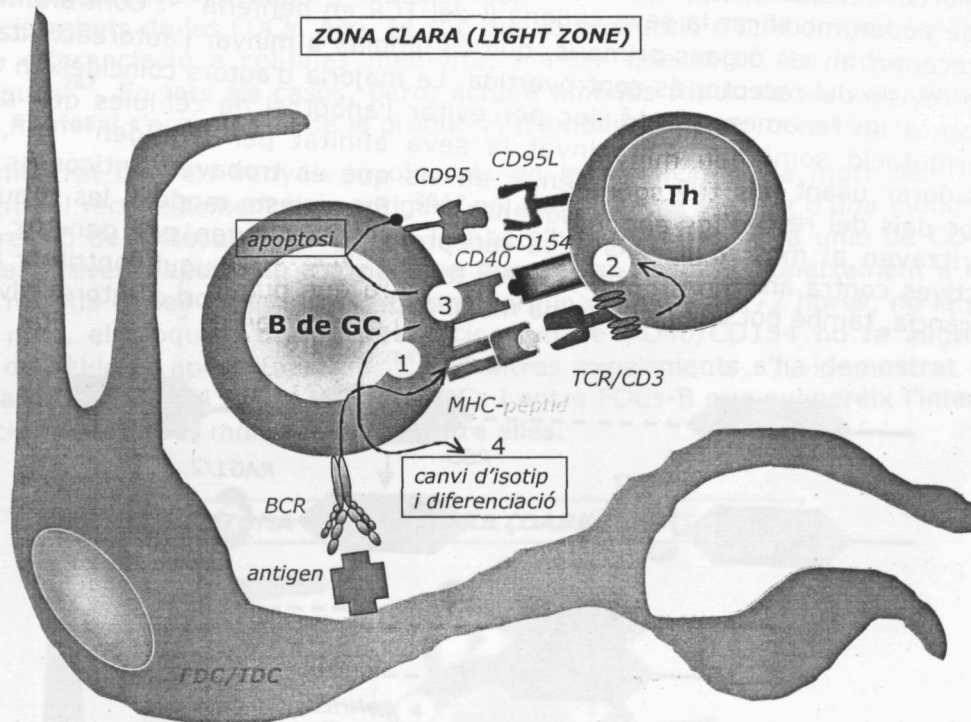


Fig. 13 3er punt de control o selecció per maduració. Pas 1: L'antigen internalitzat, processat i presentat per MHC de classe II a les cèl·lules Th antigen-específiques de centre germinal, induïx l'expressió de CD154 en les T cèls (pas 2). Pas 3: El reconeixement del seu lligand per part de CD40, regula negativament l'expressió de CD95 i, pas 4, inicia el procés de canvi d'isotip i de diferenciació final cap a cèl·lula B de memòria o plasmàtica.

El pas final de maduració té lloc mitjançant el fenomen anomenat *canvi d'isotip* (*class switch recombination, CSR*) (figura 14), pel qual es reordena la regió constant de la cadena pesada de la immunoglobulina M mitjançant bescanvi de l'original pel qualsevol de les altres regions constants alternatives situades a l'extrem 3' del gen. Estructuralment, cada regió constant està flanquejada en el seu extrem 5' per l'anomenada regió de "switch" (Sw) (excepte la cadena constant δ que s'expressa per splicing alternatiu d'RNA) que està formada per seqüències repetitives curtes en tàndem, que abarquen entre 1-10Kb, similars entre elles però no idèntiques. Les bases moleculars del canvi d'isotip no es coneixen del tot, però se sap que ve regulat per citocines per activació transcripcional del seu promotor. Així, el canvi d'isotip resulta en la deleció de seqüències gèniques que es troben a la línia germinal i que s'escindeixen formant cercles d'escissió de DNA. La contribució d'AID (proteïna editora d'RNA ja comentada) al canvi d'isotip es va descriure amb l'obtenció d'un ratolí genèticament modificat al qual se li havia anul·lat l'expressió d'AID. Aquest animal era normal excepte pel fet que les seves

cèl·lules B eren incapaces d'hipermutar i de canviar l'isotip²¹⁵. Paral·lelament, la descripció²⁷⁵ de que els malalts amb HIGM2 tenien mutacions en el gen AID i que això donava lloc a limfòcits B únicament IgM (similar al ratolí knockout), confirmava la importància d'aquesta molècula.

En el canvi d'isotip, la interacció CD40/CD154²⁶⁶ juga també un paper important, així com la interacció CD95/CD95L¹⁹⁹ en les que té lloc la formació d'un complex de senyalització de mort induïda (DISC)²⁷⁶ i la generació d'un apoptosoma que desencadena l'activació de tots els membres de la família de les caspases²⁷⁷ fins a l'apoptosi.

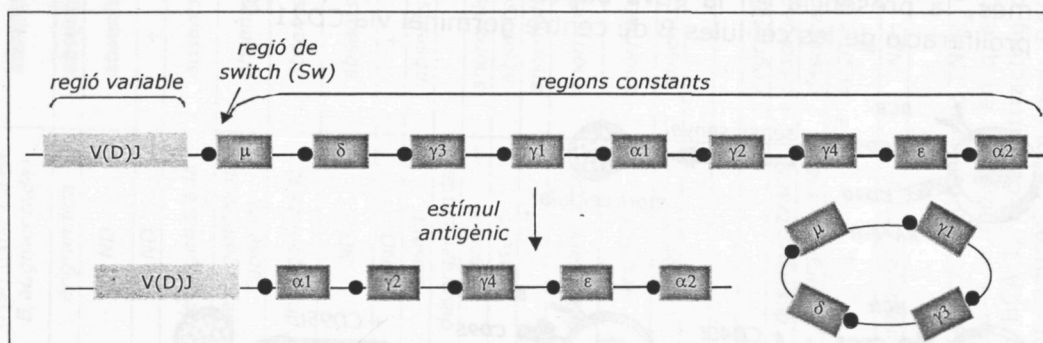


Fig. 14 Canvi d'isotip de les cadenes pesades de les immunoglobulines humanes. L'isotip de l'anticòs produït ve determinat per la regió que codifica per les cadenes constants consecutives a l'exó V(D)J. En aquest procés el segment de canvi (Sw) d'un exó recombinava amb el segment de canvi d'un altre exó situat a l'extrem 3' donant lloc a la delecció d'una seqüència circular. Així, es com la cèl·lula produeix la IgG, IgA o IgE enlloc de la IgM.

La interpretació dels senyals positius i negatius per l'apoptosi rebuts per part de les cèl·lules B depèn de diversos factors (figura 15).

- El primer factor que va ser descrit és **la durada del reconeixement antigen/receptor** i **la concentració antigènica**. Es va descriure inicialment que la injecció d'antigen T-dependents soluble en ratolins prèviament immunitzats, inhibia profundament la generació de cèl·lules B memòria²⁷⁸ i més tard es va descriure com cèl·lules B mantingudes en cultiu amb anti-CD40 morien després de reconèixer antigen durant cinc dies²⁷⁹. Altres experiments *in vitro* han confirmat aquests resultats i actualment s'accepta que la unió BCR/antigen exerceix un efecte negatiu en les cèl·lules B de centre germinal després d'un reconeixement perllongat, quan la seva tendència espontània a l'apoptosi és constantment inhibida per factors de supervivència (com és el cas d'una presència continuada d'altres concentracions d'antigen). D'alguna manera, forçar continuament la supervivència acaba produint la mort del limfòcit. Aquest mecanisme pot explicar-se com a una via d'autoregulació que intenta evitar respostes autoimmunitàries on l'antigen es troba present per períodes indefinits.
- El segon factor és el **balanç entre els senyals de supervivència/apoptosi** rebuts de les cèl·lules T (com els lligands de CD40 i CD95). S'ha demostrat en ratolins en els que s'ha abolit la generació de cèl·lules B memòria mitjançant administració d'anticossos anti-CD40L²⁸⁰ i en experiments *in vitro* en els que la supervivència de les cèl·lules B estimulades amb anti-Ig augmenta i es perllonga fins a 48 hores després de tractament amb anticossos anti-CD40. Les cèl·lules T dels GCs expressen tant CD40L²⁸¹ com CD95L però el cultiu amb anti-Ig pot inhibir l'apoptosi mediada per CD95. Darrerament s'ha descrit una altra interacció que regularia la supervivència de les cèl·lules B i que vindria donada per la **producció de BAFF** per les cèl·lules dendrítiques (o dels macròfags) de la zona rica en cèl·lules T dels fol·licles limfoides secundaris i de la melsa i el reconeixement d'aquests pel receptor de membrana en les

cèl·lules B. El mecanisme d'acció no es coneix del tot, però se sap que animals en els quals per diferents mètodes s'ha inhibit el reconeixement BAFF/BAFF-R es redueix el pool de cèl·lules B circulants, cosa que té efectes a nivell de producció d'Igs²⁸².

- El tercer factor que regula els senyals d'apoptosi deriva de **la presència de les cèl·lules dendrítiques fol·liculars**. Aquestes no solament presenten els epítops antigènics en la densitat adequada, sinó que actuen com a "cèl·lules nodridores" donat que les B aïllades de GC poden sobreviure en presència de clusters de FDCs²⁸³ i, a més, la presència en la seva superfície de C3 pot augmentar la supervivència i la proliferació de les cèl·lules B de centre germinal via CD21¹²⁹.

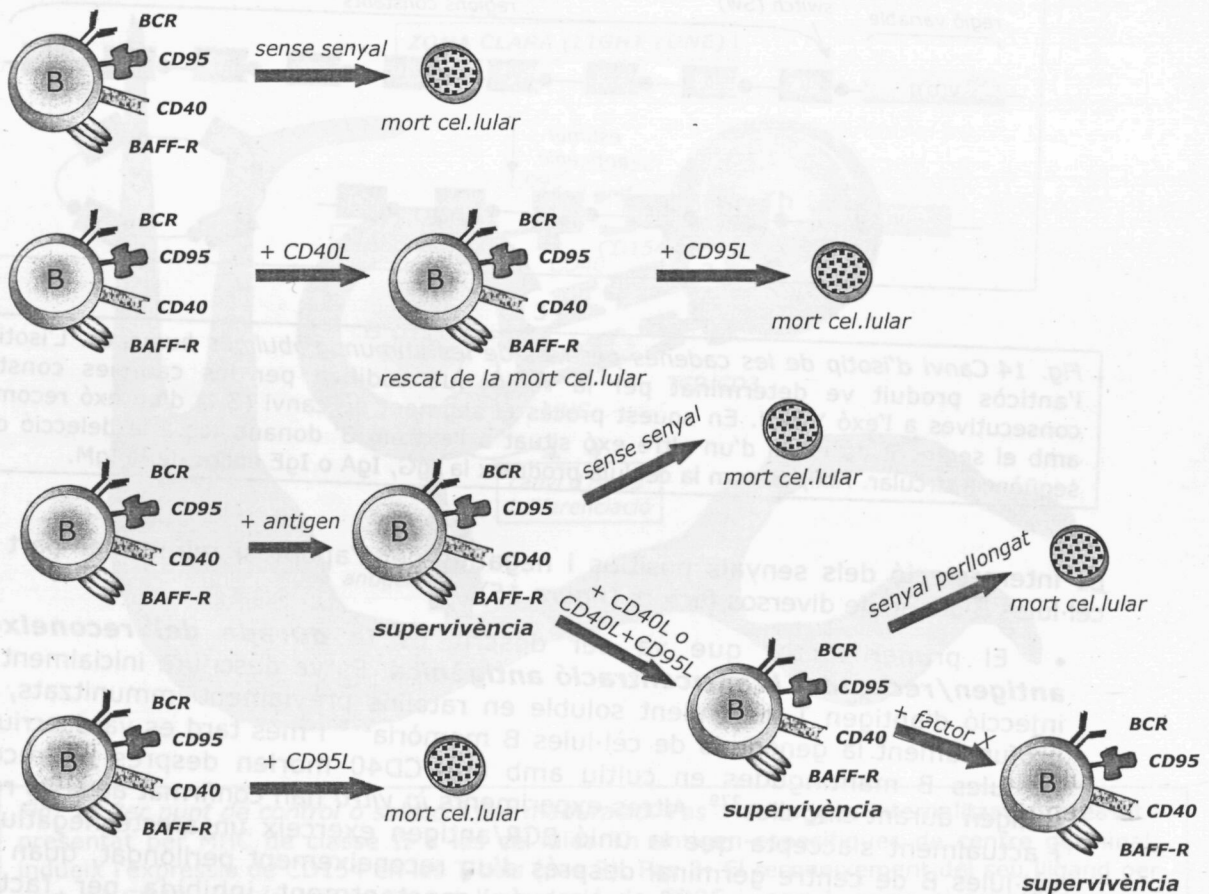


Fig. 15 Reconeixements que determinen el balanç entre els senyals de supervivència i de mort cel·lular de les cèl·lules B en la reacció de centre germinal.

1.2.4.1.5 Models animals amb desenvolupament alterat del teixit limfoide

L'estructura del teixit limfoide secundari es pot veure modificada com a conseqüència d'alteracions a diferents nivells: errors en l'expressió de factors de transcripció, absència/excés de determinades subpoblacions leucocitàries, errades en els mecanismes adhesius/attractors que modifiquin l'estructuració del microambient, etc. Donat que al llarg del present treball s'han anat comentant diversos models animals i malalties humanes amb alteracions del teixit limfoide, a la *taula V* es presenta un resum de molècules involucrades en la gènesi, estructuració i compartimentalització dels fol·licles limfoides.

model animal	nòduls limfàtics perifèrics				melsa			PPs
	presència / mida	xarxa FDCs	segregació T/B	GCs	segregació T/B	zona marginal	fol·licles 1ris	
LT α / (TNF β /)	absents	absent	absent	absents	desorganit (cèls T reduïdes, B augment)	desorganitzada	absents	absents
LT β /	- (+ a CVs i MLNs)	absent	absent	absents	desorganit (invasió cèls. a polpa vermella)	desorganit (àrea B augmentada)	absents	absents
TNF α /	+	absent	absent	absents	absent	engrandida	absents	reduïdes
TNFR-I/	+	absent	+	absents	+	ND	absents	reduïdes /normals
TNFR-II/	+	absent	+	ND	+	ND	+	+
TNFR-I-Ig	+	absent	parcialment desorganitzat	absents	parcialment desorganitzada	desorganitzada	absents	+
LT β R/	absent	absent	absent	absents	desorganitzada	desorganitzada (absent)	absents	absents
LT β R-Ig	parcialment absent	absent	absent	absents	parcialment desorganitzada	desorganitzada	absents	absents
LT β R-Ig + TNFR-I-Ig	absents	absent	absent	absents	ND	ND	absents	absents
BAFF-Ig	+	absent	desorganitzat	+	desorganitzada	ND	+	+
BAFF/	+	absent	desorganitzat	+	desorganitzada	absent	absents	ND
IL8R/	augmentat				desorganitzada	desorganitzada		
CCR7/	reduïts		no fol·licles 1ris	absents	reducció cèls. T	anormal	anormals	absents
CXCR4/	-	absent	absent	absents	absent	absent	anormals	reduïdes
CXCR5/	-			absents	desorganitzada			
CXCR5/CCR7/	totalment absents	absent	absent	absents	desorganitzada (sense cèls. B)	desorganitzada	anormals	+ sense GCs
CXCL13/	parcialment absent	ND	absent	absents	desorganitzada	anormal	anormals	
CXCL12/	absent	absent	absent	absents	absent	absent	absents	absents
CD40/	anormals		absent	absents				
CD154/	+	+	absent	absents				
AID/	engrandits	+	+	+	+		+ engrandits	
RAG-1/	+ reduïts	+	+ desorganitzat	+ desorg	+ (desorganitzada)	+ desorganitzada	+ desorganit	ND
RAG-2/	+ reduïts	+	+ desorganitzat	+ desorg	+ (desorganitzada)	+ desorganitzada	+ desorganit	ND
TACI/	augment mida	+	+ (augment cèls. B)	+	+ (augment nombre cèls. B)	+	+ (augment cèls B)	ND
aly/aly	absent	absent	absent	absents	desorganitzada	desorganitzada	ND	absents

Taula V. Models animals amb desenvolupament alterat del teixit limfoides. LT, limfotòxica; TNF, factor de necrosi tumoral; TNFR, receptor del factor de necrosi tumoral; BAFF, factor d'activació de cèl·lules B; X-Ig, fracció d'immunoglobulina unida a la molècula en qüestió; FDC, cèl·lules dendrítiques fol·liculars; GC, centre germinal; MLN, nòdul limfàtic mesentèric; aly, alimfoplàsia; BCA-1, B-cell attracting chemokine; TACI, transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor; AID, activation-induced deaminase; RAG, recombination-activating gene; "+" indica similar al ratolí normal, "+/-" lleugerament desorganitzat, "-" desorganitzat o indetectable.

1.2.4.2 Òrgans limfoides terciaris

En les inflamacions cròniques amb acumulació de cèl·lules mononuclears en resposta a patògens, transformacions neoplàsiques o processos autoimmunitaris, el procés inflamatori sol ser sostingut durant un període llarg de temps. Els infiltrats inflamatoris organitzats que es troben als òrgans diana de l'atac immunitari poden ser similars morfològicament als fol·licles limfoides dels òrgans limfoides secundaris, de les plaques de Peyer i de la melsa, per això diversos autors els anomenen **òrgans limfoides terciaris**³. Els mecanismes moleculars que condueixen a la formació de fol·licles limfoides ectòpics en aquests òrgans es van començar a deduir a partir dels experiments de Ruddle¹⁴⁶ en els que s'indueïa la neogènesi amb els mateixos mediadors que els involucrats en l'organogènesi limfoide durant el desenvolupament. Així, citocines de la família del TNF (LT α , LT β) i els seus receptors (LT β R, TNFR-I, TNFR-II), expressats ectòpicament i sota el control de promotors específics de llinatge cel·lular (ja comentades en anteriors apartats), induïen infiltrats inflamatoris crònics caracteritzats per la presència de vècules post-capil·lars activades amb HEVs i expressió incrementada de molècules d'adhesió (MAdCAM, PNA) mediadores de l'arribada de limfòcits naïve. Les proteïnes de la família del TNF no són les úniques mediadores de la neogènesi, sinó que també s'ha descrit el paper fonamental de quimiocines (CCL21, CXCL13), factors de transcripció (NF- κ B) i molècules d'adhesió. En realitat existeix una inter-relació en la regulació de l'expressió de la majoria d'aquestes molècules donat que determinats factors de transcripció s'indueixen quan s'expressen proteïnes del TNF i quimiocines, que alhora indueixen la transcripció de molècules d'adhesió.

1.2.4.3 Malalties autoimmunitàries amb limfoneogènesi

La presència d'infiltrats limfocitaris organitzats en estructures similars als fol·licles limfoides amb centres germinals s'ha descrit en diverses malalties autoimmunitàries.

1.2.4.3.1 Tiroïditis de Hashimoto

Söderström i col.laboradors van descriure a començaments dels anys 70 que l'infiltrat mononuclear tiroideu dels pacients amb hipotiroïdisme de Hashimoto semblava organitzat en centres germinals amb una gran quantitat de cèl·lules plasmàtiques i amb vècules d'endoteli alt²⁸⁴. Aquestes observacions van ser corroborades posteriorment per altres grups^{285,286} però a nivell histopatològic la descripció no va anar més enllà. Indirectament, però, existien evidències de la funcionalitat d'aquestes estructures que es trobaven especialment forçades per l'evidència d'un augment d'incidència de limfomes tipus MALT en malalts de Hashimoto.

1.2.4.3.2 Artritis reumatoide i espondilitis anquilosant

Són processos autoimmunitaris sistèmics reumàtics humans en els que la membrana sinovial de les articulacions està intensament infiltrada per cèl·lules mononuclears que formen focus amb centres germinals que contenen cèl·lules T, cèl·lules B i plasmàtiques. Des del punt de vista de la formació de teixit limfoide terciari, l'artritis reumatoide (RA) és amb diferència la malaltia autoimmunitària estudiada més abundantment^{287,288,289,290,291,292,293,294,295} encara que també hi ha estudis en els que es demostra un desenvolupament clonal de cadenes VH dels anticossos a l'espondilitis anquilosant²⁹⁶ (SA). En ambdues malalties, el procés de limfoneogènesi articular provoca la diversificació del repertori de cèl·lules B a través de la hipermutació somàtica dels anticossos²⁹⁷ i la generació *in situ* de cèl·lules plasmàtiques²⁹⁸, cosa que suggereix que les cèl·lules B naïve podrien ser activades directament en els centres germinals ectòpics. En aquests fol·licles, tant les cèl·lules T CD8⁺CD154⁺ com les cèl·lules presentadores d'antigen professionals sembla que juguen un paper important²⁹⁹.

1.2.4.3.3 Síndrome de Sjögren primària

És una epitelitis autoimmunitària que afecta principalment el sistema glandular exocrí i que molts cops es presenta associada a l'artritis reumatoide i a diverses col·lagenosis autoimmunitàries. Histològicament, l'afectació de les glàndules salivals es caracteritza per una limfocitògenes amb presència d'HEVs³⁰⁰, cèl·lules dendrítiques³⁰¹, cèl·lules dendrítiques fol·liculars³⁰², proliferació clonal de cèl·lules B dirigida per antigen^{303,304} i presència de cèl·lules que expressen CXCL13 i CXCR5.

1.2.4.3.4 Myasthenia gravis

És una altra malaltia autoimmunitària mediada per anticossos en la que es desenvolupen fol·licles limfoides en un òrgan limfoide primari, el timus. El seu autoantigen, el receptor nicotínic de l'acetilcolina, és present de forma natural en el timus i els centres germinals que s'observen contenen cèl·lules B activades i plasmàtiques que produeixen anticossos patogènics contra aquest autoantigen³⁰⁵. S'han proposat diferents mecanismes que conduirien a la formació de fol·licles limfoides en la miastènia gravis (MG), com la hiperexpressió intratímica de CD23³⁰⁶ i la de Bcl-2³⁰⁷. La resecció tímica com a tractament de la MG millora en molts malalts la pèrdua de força muscular, cosa que indica que el teixit ectòpic que s'estructura en el timus juga un paper funcional en la reacció autoimmunitària³⁰⁸.

1.2.4.3.5 Malalties inflammatòries del budell. Malaltia de Crohn i colitis ulcerosa

La presència de teixit limfoide terciari s'ha demostrat en el teixit limfoide associat a mucoses i en el colon de malalts tant amb malaltia de Crohn com amb colitis ulcerosa³⁰⁹. Mitjançant RT-PCR de biòpsies s'ha detectat expressió de CXCL13 en zones properes als agregats limfoides que contenen cèl·lules dendrítiques i cèl·lules dendrítiques fol·liculars. Alhora s'ha demostrat cèl·lules T CXCR5⁺ disperses pels centres germinals ectòpics i cèl·lules B de la zona del mantell, cosa que s'ha relaciona amb el desenvolupament de la IBD (inflammatory bowel disease)³¹⁰.

molècula	funcions	alteració	malaltia associada
TNFα	<i>inflamació, organització esplènica</i>	<i>hiperexpressió</i>	<i>RA, IBD, MS, diabetis</i>
		<i>hipoexpressió</i>	<i>SLE</i>
IL-2	<i>proliferació cèls. T i NK</i>	<i>hiperexpressió</i>	<i>IBD</i>
IL-7	<i>proliferació dels precursors de cèls. T i B</i>	<i>hiperexpressió</i>	<i>IBD</i>
IL-10	<i>inducció cèls. T reguladores, angiogènesi i tumorigènesi</i>	<i>hiperexpressió</i>	<i>IBD</i>
IL-2R		<i>hiperexpressió</i>	<i>IBD</i>
IL-10R		<i>hiperexpressió</i>	<i>IBD</i>
IL-3	<i>supervivència de derivats hematopoietics</i>	<i>hiperexpressió</i>	<i>síndrome desmielinitzant</i>
IFNγ	<i>activació macròfags, augment expressió molècules MHC</i>	<i>hiperexpressió a pell</i>	<i>SLE</i>
TGFβ		<i>hipoexpressió</i>	<i>IBD</i>
TGFβR		<i>hipoexpressió</i>	<i>SLE</i>
LTα	<i>inflamació</i>	<i>hiperexpressió</i>	<i>RA, SLE, IBD, MS, diabetis, tiroïditis</i>
LT$\alpha\beta$	<i>respostes Th1, desenvolupament nòduls limfàtics, arquitectura i organització esplèniques</i>	<i>hiperexpressió</i>	<i>RA, SLE, IBD, MS, diabetis</i>
LIGHT	<i>activació limfòcits T i supervivència de timòcits</i>		<i>RA?, diabetis</i>
CD178	<i>apoptosi</i>		<i>SLE, EAE diabetis, AITD, AH</i>
CD154	<i>supervivència de cèl. B, estimulació i diferenciació</i>		<i>SLE, SS, IBD, RA, EAE</i>
RANKL	<i>supervivència DCs</i>	<i>hiperexpressió</i>	<i>RA</i>
OX40L	<i>costimulador cèls. T</i>		<i>EAE, RA, IBD</i>
BAFF	<i>supervivència/maduració cèls. B,</i>	<i>hiperexpressió</i>	<i>SLE, SS, RA</i>

Taula VI. Llistat de les malalties autoimmunitàries associades a un increment o una disminució en l'expressió de determinades molècules. RA, artritis reumatoide; IBD, inflammatory bowel disease; MS, esclerosi múltiple; SLE, lupus eritematos sistèmic; EAE, encefalitis autoimmunitària experimental; AITD, malalties autoimmunitàries de la tiroide; AH, hepatitis autoimmunitària; SS, síndrome de Sjögren.

1.2.4.3.6 Esclerosi múltiple

És una malaltia del sistema nerviós central en la que té lloc una destrucció de la veïna de mielina que protegeix els axons neuronals. L'espai subependimari del sistema nerviós central dels malalts que la pateixen tant en un estadi inicial com durant la progressió de la malaltia es veu infiltrat per cèl·lules mononuclears organitzades en estructures semblants als fol·licles limfoides³¹¹. En aquests pacients s'han analitzat els segments variables de les cadenes constants de les Igs i s'ha arribat a demostrar que les cèl·lules B del fluid cerebrospinal de la majoria de malalts mostren una expansió clonal amb hipermutacions somàtiques³¹².

El paper fisiopatogènic de la limfoneogènesi a l'autoimmunitat sembla relacionat amb la cronificació d'una resposta en l'òrgan diana de l'atac on l'aport d'antigen és continu i constant però en els que els mecanismes de control de la proliferació de cèl·lules potencialment autoreactives no estan clarament desenvolupats. A la *taula VI* es relacionen algunes malalties d'origen autoimmunitari amb la presència ectòpica de fol·licles limfoides secundaris.

1.2.4.4 Malalties infeccioses amb limfoneogènesi

El fenomen d'estructuració de fol·licles limfoides ectòpics funcionals a nivell dels pulmons també es dona en malalties autoimmunitàries secundàries a infeccions cròniques. Un dels casos més estudiats és la presència de nòduls limfoides intrahepàtics amb centres germinals que apareixen sovint després d'infeccions cròniques pel virus de l'*hepatitis C*^{313,314,315} i en la *sinovitis de Lime* secundària a infecció per *Borrelia burgdorferi*³¹⁶. L'*asma* és una malaltia crònica inflamatòria en la que hi ha uns nivells elevats d'IgE en els fluids de rentat del pulmons³¹⁷ amb producció local de TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 i RANTES. Tant en la forma humana com en el model murí d'inducció d'asma mitjançant immunització intratraqueal amb ovoalbúmina, s'observa desenvolupament de fol·licles limfoides secundaris amb centres germinals PNA⁺ amb cèl·lules dendrítiques fol·liculars, cèl·lules T CD4⁺, cèl·lules en proliferació activa, cèl·lules en apoptosi, diferenciació de vècules d'endoteli alt i presència de cèl·lules plasmàtiques productores d'IgG1, IgE i IgA contra l'ovoalbúmina³¹⁸. A l'estómac, la *infecció gàstrica* per *helicobacter pylori* indueix la formació de teixit limfoide a la mucosa gàstrica³¹⁹ que també s'ha associat amb el desenvolupament de limfomes gàstrics tipus MALT. Alguns autors que treballen en aquest model han suggerit que la limfoneogènesi pot estar induïda directament per l'expressió de CXCL13³²⁰.

1.2.4.5 Heterogeneïtat de la població de cèl·lules B

Definició: Les cèl·lules B circulants no formen una població homogènia en morfologia, localització i origen. Part de l'heterogeneïtat que mostren es deu a la maduració de la cèl·lula B en perifèria en resposta a l'estimulació antigènica, però també és deguda a la presència d'una població de cèl·lules B³²¹ (*B-1*) que se suposa que s'origina a partir d'una població diferent de cèl·lules mare (stem cells) inicialment en l'ontogènia. S'identifiquen com a cèl·lules B que expressen en superfície CD5 i IgM però no IgD (o molt poca) i que es troben en poques quantitats en els nòduls limfàtics perifèrics mentre que són majoritàries a la cavitat peritoneal. Aquest grup de cèl·lules B a la vegada se subdivideix en cèl·lules *B-1a* que expressen CD5 i *B-1b* que no l'expressen (encara que expressen mRNA de CD5)³²² i que en ratolí tenen en comú els següents marcadors:

B220^{int}IgM^{alt}IgD⁻CD23⁻CD43⁺HSA^{baix}. Les cèl·lules B-1 són presents tant en humans com en ratolins i en alguns casos, com en el conill, poden arribar a ser majoritàries.

Origen: La hipòtesi d'un origen cel·lular diferent s'argumenta per la semblança en la proporció relativa de cèl·lules B-1 en bessons monozigòtics³²³ i en membres de famílies amb malalts d'artritis reumatoide³²⁴ i en experiments en els que la injecció de cèl·lules B-1 peritoneals en ratolins irradiats, reconstituïa la població B-1 però no la B-2 i la reconstitució amb cèl·lules B-2 de moll d'os repoblava el compartiment B-2 però no el B-1³²⁵. Existeix una hipòtesi alternativa segons la qual, les poblacions B-1 i B-2 representen diferents estadis de desenvolupament o activació d'un mateix llinatge B³²⁶, donat que CD5 es pot induir en determinades situacions (cultiu amb PMA, estimulació amb anticòsso anti-IgM i IL-6). Darrerament es tendeix a considerar que el desenvolupament del llinatge B-1 és funció d'una senyalització perllongada via BCR³²⁷, donat que la disrupció de gens com CD19 o Vav que regulen aquesta senyalització resulta en la disminució del compartiment B-1 i a la inversa³²⁸.

Localització i funció: En l'home, les cèl·lules B-1 es detecten a les 20 setmanes en el fetge i en els nòduls limfoides de l'adult en els centres germinals³²⁹ a la zona del mantell fol·licular. El percentatge més elevat es troba en la circulació fetal i va minvant fins al voltant d'un 60-80% a la sang del cordó umbilical³³⁰. A partir d'aquesta disminució, les cèl·lules B CD5+ decreixen amb l'edat fins a un 5-30% als adults. Secreten grans quantitats d'IgM, IgG3 i IgA, se suposa que són responsables de la immunitat innata i les que ocupen la cavitat peritoneal contenen un subset de precursors de cèl·lules plasmàtiques productores d'IgA que tenen la capacitat de migrar cap a la lamina pròpia, cosa que suggereix que poden jugar un paper en la immunitat a les mucoses. La contribució d'aquestes cèl·lules al pool d'anticòssos total es basa en la generació de respostes en absència d'ajut de les cèl·lules T, majoritàriament contra diferents lligands múltiples repetitius com la fosfatidilcolina, immunoglobulines, DNA, proteïnes de membrana d'eritròcits i més preferentment contra polisacàrids bacterians. Clàssicament es considera que les cèl·lules B-1 presenten una propensió a les transformacions neoplàsiques³³¹ per que les cèl·lules B de malalts amb leucèmia limfàtica crònica produeixen autoanticòssos multispecífics³³². Les cèl·lules B-1 s'han relacionat amb fenòmens d'autoimmunitat tant en humans com en ratolí donat que estan incrementades en algunes malalties autoimmunitàries³³³ en perifèria. A l'home s'han descrit al menys dos lligands de CD5: CD72³³⁴ i la glicoproteïna induïda per antigen³³⁵, el paper dels quals no està definit però s'ha relacionat amb la coestimulació T/B durant les respostes immunitàries dependents de cèl·lules T.

1.3 AUTOIMMUNITAT

Aquest terme es refereix a la manca de tolerància i desenvolupament d'una resposta immunitària contra components del propi individu que té com a conseqüència clínica la malaltia autoimmunitària. Malgrat que el sistema immunitari està concebut per reconèixer molècules alienes al propi organisme, el procés de generació aleatòria dels receptors de les cèl·lules T i B (reordenaments de segments gènics, variacions nucleotídiques, mutacions puntuals aleatòries, etc) porta intrínsec la generació d'una proporció de receptors autoreactius i això explica que al voltant del 5% de la població pateixi alguna forma d'autoimmunitat. Donat que els criteris per a que una malaltia es consideri autoimmunitària no són homogenis, la seva classificació es fa en funció de: a/ l'etiologia (primàries o secundàries), b/ la distribució, o c/ el mecanisme efector (produïdes per anticòssos o per limfòcits).

Segons la *distribució* dels teixits afectats, es classifiquen en sistèmiques (o no específiques d'òrgan, com el lupus eritematós sistèmic) i òrgan-específiques (com la diabetis tipus I). Aquesta classificació no necessàriament es correspon amb l'origen de la malaltia. Una classificació alternativa seria la distinció entre les malalties amb una alteració general en la selecció, regulació o mort de les cèl·lules T o B (com la manca de

CD95 o CD178) i aquelles en les que té lloc una resposta aberrant contra un antigen determinat (propi o aliè) que causaria l'autoimmunitat (com la demielinització de les neurones després d'una infecció per *Campilobacter jejuni*). Tot i això, molt sovint és difícil de determinar si una malaltia humana és deguda a una anormalitat global o és antigen-específica, per tant s'estableix una classificació pràctica en funció de la distribució de l'afectació orgànica (*taula VII*). Encara que qualsevol organ pot ser la diana d'un atac autoimmunitari, sembla que existeix una predilecció per les respostes contra les glàndules endocrines i, entre elles, la tiroide, el pàncreas i l'escorça adrenal.

Segons el *mecanisme efector*, es fa una distinció entre les malalties degudes a la generació d'anticossos o aquelles que són mediades per cèl·lules T. Dins de les primeres es distingeixen les que els anticossos són els responsables directes (hipersensibilitat de tipus II) i les que els causants de les llesions i la simptomatologia són els nivells alts d'immunocomplexos (hipersensibilitat de tipus III).

Segons l'*etiologia*, les primàries es deuen a un error intrínsec del sistema immunitari. En alguns casos la causa està ben establerta i són hereditàries de transmissió mendeliana. Les secundàries es desencadenen per un agent extern associat (fàrmac, un procés infecciós, presència d'un tumor) i solen desaparèixer quan s'elimina l'agent causant.

<i>específiques d'òrgan</i>	<i>no específiques d'òrgan</i>	<i>sistèmiques</i>
<i>Tiroïditis de Hashimoto</i>	<i>Síndrome de Sjögren</i>	<i>Lupus eritematós sistèmic</i>
<i>Mixedema primari</i>	<i>Anèmia hemolítica autoimmunitària</i>	<i>Lupus eritematós discoide</i>
<i>Tirotoxicosi o malaltia de Graves-Basedow</i>	<i>Púrpura trombocitopènica autoimmunitària</i>	<i>Esclerodèrmia</i>
<i>Anèmia perniciosa</i>	<i>Leucopènia idiopàtica</i>	<i>Dermatomiositis</i>
<i>Gastritis atròfica autoimmunitària</i>	<i>Cirrosi biliar primària</i>	<i>Artritis reumatoïdea</i>
<i>Malaltia d'Adison</i>	<i>Cirrosi criptogènica</i>	<i>Hepatitis crònica activa amb Ag Hbs negatiu</i>
<i>Diabetis mellitus tipus 1</i>	<i>Colitis ulcerosa</i>	
<i>Menopausa prematura</i>		
<i>Síndrome de Goodpasture</i>		
<i>Miastenia gravis</i>		
<i>Infertilitat masculina</i>		
<i>Pèmfing vulgar</i>		
<i>Pemfigoide</i>		
<i>Oftalmopatia simpàtica</i>		
<i>Uveïtis facògena</i>		
<i>Esclerosi múltiple</i>		

Taula VII. Classificació de les malalties autoimmunitàries humanes en funció de la distribució dels teixits afectats.

1.3.1 Mecanismes relacionats amb el trencament de la tolerància perifèrica

1.3.1.1 Mimetisme molecular

Les proteïnes presents en els animals filogenèticament superiors són estructuralment molt conservades i en moltes ocasions són similars a les dels virus i altres agents microbians que infecten hostes. Així, una resposta immunitària contra aquests epítops proteïcs, alhora que eliminarà l'agent infecciós, pot conduir a una cross-reacció contra epítops propis i desenvolupar un fenomen autoimmunitari. Com a exemple, s'han

suggerit associacions entre la infecció pel virus Coxsakie B4 (P2-C) i la resposta contra la decarboxilasa de l'àcid glutàmic 65 (GAD65, un dels autoantígens a la diabetis autoimmunitària humana)³³⁶. A nivell epidemiològic, s'ha suggerit l'associació entre el virus de la rubèola, el citomegalovirus, el virus coxsakie i la diabetis mellitus insulino-dependent³³⁷. Hi ha d'altres reactivitats creuades com la que s'estableix entre la proteïna d'estrés tèrmic hsp65 humana a l'artritis reumàtica i l'hsp65 de *Mycobacterium bovis* o el complex piruvat deshidrogenasa humana a la cirrosi biliar primària i la d'*Escherichia coli*³³⁸, l'esclerosi múltiple i la celiàquia associats a la presència de virus d'Epstein-Barr, el virus limfotrópic de tipus I, el citomegalovirus, el virus de l'hepatitis C, l'herpesvirus i el virus de la rubèola.

La predicció de les seqüències potencialment cross-reactives en funció únicament de l'homologia proteica no és una eina eficaç i actualment es treballa en la generació i anàlisi de models computeritzats que han demostrat com un clon de cèl·lules T aïllat d'un pacient amb esclerosi múltiple amb un únic TCR pot reconèixer i ser activat (amb una afinitat equivalent a la que mostra per la proteïna bàsica de la mielina) per cinc pèptids diferents provinents del virus de l'herpes simple, el d'Epstein-Barr, l'adenovirus tipus 12, papiloma virus i el bacteri *Pseudomonas aeruginosa*³³⁹.

1.3.1.2 Epítops críptics

És un concepte aplicable sobretot a cèl·lules B quan parlem d'aquells que en condicions normals no són accessibles al sistema immunològic per que es generen en petites quantitats o no són accessible normalment per que són a l'interior de la molècula. En determinades situacions, les condicions de processament i presentació antigèniques podrien passar a ser favorables i els epítops críptics ser presentats encara que existeixi tolerància central contra ells. S'han descrit diversos mecanismes per explicar-ho que poden tenir lloc simultàniament: (1) increment en la quantitat d'antigen a l'abast³⁴⁰, (2) increment de la síntesi de molècules de MHC de classe II que faci augmentar la quantitat d'antigen presentat, l'expressió de molècules d'adhesió o les molècules de coestimulació, (3) la presència de cèl·lules presentadores d'antigen diferents que tinguin una maquinària de processament i presentació diferents³⁴¹ i (4) la modificació del repertori de pèptids presentats per acció local de citocines³⁴².

1.3.1.3 Expansió d'epítops dominants i críptics (epitope-spreading)

És un model que permet explicar la progressió de malalties autoimmunitàries com a conseqüència d'una resposta immunitària contra epítops endògens secundaris que serien alliberats durant una malaltia crònica o durant una resposta immunitària quan es produeix un dany tisular. Hi ha evidències a favor d'aquesta hipòtesi usant models animals en els que s'indueix la malaltia amb pèptids corresponents als epítops dominants d'un autoantigen i en els que posteriorment es detecten reaccions immunitàries tant de cèl·lules T com B contra altres epítops de la mateixa proteïna o de proteïnes que formaven part del mateix complex proteic. L'exemple més clar d'expansió d'epítops és el del model animal d'encefalomielitis autoimmunitària experimental recurrent (R-EAE). La immunització de ratolins amb pèptids derivats de la proteïna bàsica de la mielina (MBP) més adjuvant produeix una resposta immunodominant contra un únic determinant d'MBP a la primera fase de la malaltia. En la fase crònica, la resposta s'amplifica a d'altres determinants i s'expandeixen epítops intramoleculars³⁴³ i intermoleculars (PLP, proteolipidic protein). En ratolins NOD s'observa una resposta contra GAD65 a la primera fase de la malaltia que en fases posteriors es modifica i s'expandeix a altres antígens específics de cèl·lula β -pancreàtica com insulina i carboxipeptidasa H (CP-H)³⁴⁴. L'expansió d'epítops críptics també s'ha demostrat en un model de desmielinització de rates induït per infecció per virus del xarampió, en el que s'observa una resposta contra MBP³⁴⁵.

1.3.1.4 Superantígens

Els superantígens (sAgs) són proteïnes microbianes o víriques que poden mediar la interacció entre cèl·lules presentadores d'antigen que expressen molècules de MHC de classe II i cèl·lules T policlonals a les quals s'uneixen per fora de la cavitat d'unió d'antigen en determinades regions variables de la cadena TCR β ³⁴⁶. La interacció inespecífica i policlonal resulta en l'activació de les cèl·lules T pot arribar a ser del 20% del repertori. Quan la primera interacció amb el sAg té lloc en etapes inicials del desenvolupament, s'inactiven les cèl·lules reactives. Si el primer reconeixement té lloc després del naixement, té lloc una activació simultània dels clons que comparteixen la mateixa família TCRV β reactius i una expansió policlonal.

La contribució dels sAgs a la patogènesi d'autoimmunitat³⁴⁷ s'ha suggerit en malalties en les que s'ha demostrat activitat superantigen associada a la presència d'alguns virus i l'enriquiment de determinades famílies TCRV β , com V β 7 en pàncrees de diabètics^{348,349} i restricció de V β en malalties autoimmunitàries de la tiroide³⁵⁰ però no s'ha acabat de demostrar.

1.3.1.5 Citocines

La contribució de les citocines i dels seus receptors al desenvolupament d'autoimmunitat ve donada bàsicament per la modulació de l'activació de diferents poblacions cel·lulars regulada per l'expressió local de citocines. Aquest és un fenomen comú en situacions infeccioses³⁵¹ que pot col·laborar en l'activació de cèl·lules autoreactives en "repòs" mitjançant la desviació a una resposta de tipus Th1 o Th2³⁵². A grans trets, les citocines poden actuar a diversos nivells:

Efecte immunosupressor de les citocines pro-inflamatòries: com el TNF α que actua com a anti-inflamatòria en ratolins NOD i en ratolins amb EAEda com en animals amb una deficiència congènita d'IL-12, com en animals tractats amb anticossos, millora malalties autoreactives com la diabetis al ratolí NOD, l'encefal-lomielitits al·lèrgica experimental (EAE), la uveïtis autoimmunitària experimental (UAE) i l'artritis induïda per col·lagen. Al contrari, el rol jugat per les citocines pot ser rellevant en el control d'autoimmunitat mitjançant la desviació a una resposta Th2 per altres citocines com IL-4³⁵³ o TGF β . En aquest sentit se sap que quan són expressades ectòpicament en el pàncrees de ratolins NOD amb predisposició a fer diabetis, es prevé l'aparició de la malaltia.

Hi ha un espectre divers de malalties humanes en les que s'ha demostrat una disfunció pel que fa a les citocines o als seus receptors. Una de les més estudiades és l'*artritis reumatoide* (RA), en la que hi ha una inflamació de la membrana sinovial que condueix a la destrucció del teixit connectiu dels malalts. La destrucció sembla causada directament per l'alliberament de citocines pro-inflamatòries i altres mediadors degut a l'activació de les cèl·lules endotelials, macròfags i fibroblastes com a conseqüència de la infiltració limfocitària de la sinòvia. Les citocines que s'han descrit en els malalts que pateixen RA, principalment tipus Th1, tant a nivell d'expressió de mRNA com de proteïna, són majoritàriament pro-inflamatòries i algunes derivades de limfòcits T, però també hi són presents citocines anti-inflamatòries com el TGF β i la IL-10³⁵⁴. L'*esclerosi múltiple* (MS) és també una malaltia autoimmunitària sistèmica en la que s'ha descrit una polarització cap a citocines Th1³⁵⁵. Una altra malaltia en la que es detecten citocines pro-inflamatòries tipus Th1 (sobretot IFN γ i IL-2) *in situ* és la *malaltia de Crohn*. En aquesta anomalia, s'observa un important infiltrat de cèl·lules T i macròfags a la làmina pròpia. També se n'observen d'altres com TNF α , IL-1 i IL-6³⁵⁶, TGF β i anti-inflamatòries com la IL-10.

1.3.1.6 Quimiocines

La manifestació clínica de moltes malalties autoimmunitàries és usualment la conseqüència d'una resposta immunològica inicial contra un antigen que desemboca en una activació i acumulació selectiva de leucòcits al teixit diana. Les quimiocines són candidates a contribuir en els processos inflamatoris aguts o crònics degut a les seves propietats quimioattractants i activadores.

Modulació dels processos angiogènics i angiostàtics. Com s'ha comentat a l'inici, algunes quimiocines tipus CXC que contenen el motiu aminoacídic ELR, com CXCL5 i CXCL8, són responsables de promoure la neovascularització i permetre una migració cel·lular sostinguda i un aport continuat d'oxigen i de nutrients³⁵⁷. Això s'ha demostrat en malalties com l'artritis reumatoide³⁵⁸.

De forma similar a les citocines, hi ha diverses malalties humanes amb disfunció pel que fa a les quimiocines o als seus receptors.

Una de les més estudiades és l'esclerosi múltiple (MS) o el seu model murí equivalent EAE, en els que la proteïna bàsica de la mielina (MBP) és un dels autoantígens i és una malaltia mediada per cèl·lules T. La conseqüència patològica és la demielinització del sistema nerviós central. Estudis clínics han demostrat que l'expressió de les quimiocines CCL3, CCL4 i CCL5 i els receptors CCR2, CCR3 i CCR5 està incrementada al teixit dels malalts^{359,360,361,362}. Els ratolins genèticament deficientes en CCR2 són resistents a la EAE induïda per pèptid derivat de la MBP. A més, els nivells de CCL2 i de CXCL10 varien inversament al fluid cerebrospinal en malalts amb MS aguda respecte els controls, de forma que CCL2 està disminuït respecte els individus sans mentre que CXCL10 està incrementat. Una altra dada evidencia la importància que pot tenir CCR5 en el desenvolupament de la malaltia donat que en mostres (obtingudes post-mortem) de teixit de sistema nerviós central de malalts, CCR5 es troba localitzat a les cèl·lules T infiltrants, en macròfags i en cèl·lules de la microglia³⁶².

El rol de les quimiocines també s'ha estudiat en mostres de teixit sinovial de malalts amb artritis reumatoide. En aquests es troben nivells elevats de CCL2, -3, -4, -5, CXCL5, -8, -9 i -10 respecte els controls sans^{363,364,365-367} que podrien afavorir la neovascularització. Per contra, també s'ha detectat abundantment quimiocines angiostàtiques com CXCL9 i -10, que podrien compensar l'efecte de les primeres. En malalts amb formació ectòpica de fol·licles limfoides a les articulacions, s'ha demostrat la presència de cèl·lules dendrítiques fol·liculars productores de CXCL13³⁶⁸. A nivell de receptors també s'han descrit alteracions en monòcits circulants que expressen CCR1, -2 i -4, mentre que el fluid sinovial està enriquit en cèl·lules CCR3⁺ i CCR5⁺³⁶⁹. A més, diversos laboratoris han reportat una acumulació de CCR5, CXCR2, -3, -4 i/o -6 en cèl·lules T memòria CD4⁺ infiltrants^{370,371,372,373,374}.

1.3.2 Predisposició genètica

Clínicament està ben demostrada l'existència de predisposició genètica a les malalties autoimmunitàries així com l'associació freqüent de diverses malalties autoimmunitàries en un mateix individu o en persones de la mateixa família. El paper que juguen els factors genètics en les malalties autoimmunitàries és complex (molt rarament es regeixen per herència mendeliana) i, on es veu més ben il·lustrat és en els estudis amb bessons univitel·lins que pateixen diabetis mellitus insulino-depenent (IDDM) o malaltia de Graves-Basedow. En aquests hi ha una concordància propera al 50% i al 30% respectivament³⁷⁵. Aquests percentatges són clarament més elevats que els de la població general de risc, però alhora són inferiors al 100%, la qual cosa indica que altres factors aleatoris (ambientals, etc) juguen també un paper decisiu. En general, les malalties autoimmunitàries són poligèniques i en el seu desenvolupament hi estan implicats de 10 a 20 gens de penetrància variable.

Hi ha diversos factors genètics clarament compartits entre les diverses malalties autoimmunitàries, els més importants dels quals es localitzen al complex principal d'histocompatibilitat (MHC) o sistema HLA a l'home. Durant molts anys, els antígens humans leucocitaris de classe II DR i DQ s'han associat amb el risc genètic de desenvolupament de malalties autoimmunitàries. Alguns exemples són els següents:

- l'associació més clara entre HLA i malaltia autoimmunitària és la descrita entre l'al·lel B27 i l'espondilitis anquilosant, de tal manera que la tipificació d'un individu com a HLA-B27 s'utilitza com a confirmació diagnòstica de la malaltia.
- Una altra malaltia en la que s'ha establert una associació clara amb la presència de determinats al·lells és la diabetis mellitus tipus I. Els haplotips més freqüentment relacionats són DQB1*0302-DQA1*0301 i DQB1*0201-DQA1*0501. Alguns autors han suggerit que el risc més elevat d'IDDM associat amb l'MHC resideix a la cadena β de DQ a la posició 57, on un residu diferent a l'asparagina presenta un risc incrementat de patir la malaltia. També s'han descrit haplotips que conferirien protecció davant de la malaltia com DQB1*0602-DQA1*0102. A més dels esmentats, s'ha suggerit la participació de fins a 22 loci gènics (en diferents cromosomes) que podrien predisposar a la malaltia, dels quals només se n'ha confirmat un, situat a la regió polimòrfica del promotor del gen de la insulina.
- Pel que fa a les malalties autoimmunitàries de la tiroide, els estudis amb bessons han demostrat una taxa de concordança del 20-30% en univitel·lins i del 98% en bivitel·lins. A la malaltia de *Graves-Basedow* s'ha descrit un augment del risc significativament associat amb els al·lells DR3, DQ2 i DQ5. Altres estudis han demostrat que l'al·lel DQA1*0501, tot i que presenta desequilibri de lligament amb DR3, per si sol també confereix susceptibilitat a GD en malalts que no expressen DR3³⁷⁶. També es coneix des de fa temps la relació entre *tiroïditis de Hashimoto* i presència de l'al·lel DR5.
- Altres malalties autoimmunitàries com l'*esclerosi múltiple* i l'*artritis reumatoide* han estat relacionades amb la presència dels al·lells HLA-DR5 i HLA-DR4 respectivament.

A més del sistema HLA, existeixen altres associacions positives entre malaltia autoimmunitària i expressió de determinades molècules com els **polimorfismes de la regió reguladora** de l'expressió **del cluster de HLA classe II**, que es van considerar a partir de treballs en els que es demostrava que la inducció d'aquestes molècules per IFN γ en tiròcits d'individus amb malaltia de GD era superior a la dels individus sans³⁷⁷. També s'ha suggerit l'associació entre algunes AITDs amb polimorfismes d'altres gens que són codificats a l'MHC, com la proteïna d'*estrés tèrmic hsp70*³⁷⁸ i com el *TNF β* ³⁷⁹ també s'han relacionat amb la susceptibilitat a desenvolupar la malaltia de Basedow. S'han descrit també associacions positives amb gens que codifiquen per proteïnes implicades en la **presentació antigènica** per **HLA classe I** com el polimorfisme Arg/His de *LMP2* (genera un lloc de restricció HhaI), l'al·lel de TAP, TAP1*0301 amb malaltia de *Graves-Basedow* i associacions negatives com la que existeix amb l'al·lel de TAP, TAP1*0401³⁸⁰.

També existeixen gens de risc no relacionats amb l'MHC que són molt comuns en les malalties autoimmunitàries endocrines. Un d'ells és *CTLA-4*, cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, que determina un fenotip autoimmunitari dramàtic quan és eliminat genèticament en ratolins. El polimorfisme més freqüent és un canvi Ala/Gly en posició 49 del primer exó i s'ha relacionat tant amb diabetis, com tiroïditis, com malaltia d'Addison³⁸¹ i el desenvolupament d'autoimmunitat en aquests casos sembla relacionat amb una disminució de la resposta T. Hi ha d'altres gens en aquesta mateixa regió, com *CD28* i com *ICOS* (inducible T-cell co-stimulator) que també poden contribuir en l'associació³⁸².

Un altre gen que causa la *síndrome poliglandular autoimmunitària tipus I* (APS tipus I) i que requereix un comentari especial és *AIRE*³⁸³. Codifica per un factor de transcripció^{384,385} que s'expressa fonamentalment en les cèl·lules epitelials medul·lars

tímiques i, en menys quantitat, en cèl·lules dendrítiques tímiques i en òrgans limfoides perifèrics^{386,387}. Els models animals defectius en aquests factor de transcripció presenten malalties autoimmunitàries endocrines multiorgàniques³⁸⁸, cosa que sembla indicar que la deficiència d'AIRE pot esdevenir un factor de risc en el desenvolupament de les esmentades malalties.

Pel que fa als autoantígens tiroïdals i contràriament al que se suposava fins ara³⁸⁹, s'ha demostrat l'existència d'associació entre tiroglobulina i l'AITD familiar³⁹⁰.

La susceptibilitat a patir una malaltia no només s'ha investigat en humans sinó que també s'ha intentat determinar en models animals de malalties autoimmunitàries. No disposem d'una soca homogènia per cadascuna d'aquestes malalties, però sí que existeix per les més comunes. Actualment es disposa de dos models de tiroïditis espontània^{391,392}, d'un model murí de malaltia de Graves-Basedow^{393,394,395} i del ratolí NOD com a model en ratolí de diabetis insulino-dependent³⁹⁶. De forma similar a la genètica humana, hi ha molts gens fora del clusters de MHC associats a autoimmunitat que tenen la seva equivalència amb els humans i que si es manipulen genèticament poden alterar el desenvolupament d'autoimmunitat. Alguns d'aquests en la regió MHC són les modificacions I-A⁹⁷ a H-2^{h4} en ratolí NOD que deixa de fer diabetis però que esdevé susceptible a tiroïditis^{391,392}.

1.4 MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES I NO AUTOIMMUNITÀRIES DE LA TIROIDE

Representen més del 30% de les malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan i són un conjunt de condicions autoimmunitàries que van des de la hiperfunció de la glàndula (com en el cas de la tirotoxicosi o malaltia de Graves-Basedow, GB), a la hipofunció de la glàndula (en el cas de la tiroïditis de Hashimoto (HT) i el Mixedema Primari) i desemboquen en la mort cel·lular del tiròcit³⁹⁷. Cal esmentar, però, que hi ha pacients en els que es presenten característiques clíniques típiques tant d'hiperfunció com d'hipofunció de la tiroide en els diferents moments evolutius de la malaltia³⁹⁸.

1.4.1 Tiroïditis de Hashimoto

Generalitats. És una forma crònica d'hipotiroïdisme que acostuma a aparèixer entre els 30 i 55 anys, i que té una incidència més elevada en dones que en homes (20:1). Existeix una predisposició genètica a patir la malaltia (està associada a DR5) i en molts casos les persones afectades presenten altres malalties autoimmunitàries. A nivell sèric, els malalts presenten nivells alts d'anticossos dirigits sobretot contra la peroxidasa tiroïdal, contra la tiroglobulina i de vegades contra el receptor de la TSH a títols més baixos.

Estructura tisular. Es caracteritza per un infiltrat leucocitari inflamatori massiu a la tiroïde, que va paulatinament desplaçant el parènquima i engrandint la glàndula, que en general s'acaba fibrosant i en molts casos apareix un goll. Progressivament el tiròcits es deplecionen i es redueix la producció hormonal que condueix a l'hipotiroïdisme clínic³⁹⁷. En funció del grau d'evolució de la malaltia, la llum del col·loïd limitada pels fol·licles tiroïdals es va reduint fins que acaba per col·lapsar-se i, en els darrers estadis de la malaltia, els tiròcits poden arribar a ser indetectables en seccions de criostat. La glàndula sol ser molt vascularitzada i abundar estructures endotelials. La població limfocitària que infiltra la glàndula, tant en forma d'infiltrat difús com organitzat en fol·licles limfoides, és de cèl·lules T (CD8⁺>CD4⁺), cèl·lules B, cèl·lules dendrítiques mieloides, cèl·lules plasmàtiques i macròfags en proporcions variables.

Mecanisme patogènic. Segueix essent un tema que no es coneix del tot. Inicialment, la HT es va considerar una malaltia immunitària mediada per cèl·lules T CD4+, que un cop en la glàndula induïrien l'expressió de molècules de MHC de classe II i d'IFN_γ que, a la vegada, contribuiria a l'expansió de la població T autoreactiva i a la perllongació de la resposta^{399,400}. Com a conseqüència, es formaria un infiltrat limfocitari difús i un d'

organitzat. La producció d'autoanticossos específics de glàndula tiroïdal s'ha proposat com un mecanisme d'hipotiroidisme clínic pel bloqueig del receptor de l'hormona estimuladora de la tiroide (TSHR) i per la capacitat dels anticossos anti-peroxidasa de fixar complement i de la seva activitat citotòxica, però també es coneix la contribució directa de les cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques a la destrucció dels tiròcits³⁹⁷ (figura 16).

1.4.2 Malaltia de Graves-Basedow

Generalitats. És la tiroïdopatia més freqüent al nostre país. Afecta predominantment les dones d'entre 30 i 45 anys i es caracteritza per la presència d'autoanticossos (TSI) contra el receptor de la TSH, que produeixen la seva activació i donen lloc a una secreció excessiva d'hormones tiroïdals⁴⁰¹. L'activació continuada del cycle cel·lular provoca finalment la hipertròfia de la glàndula. En el sèrum dels malalts amb malaltia de GB és molt corrent detectar també anticossos contra la peroxidasa tiroïdal i, en menys títol, contra la tiroglobulina. Existeix un grup de malalts de GB en els que la hipertròfia de la glàndula no dóna lloc a una hiperfunció i en els que es detecten autoanticossos anomenats TGI (Thyroid Growth Immunoglobulins). El paper d'aquests no es coneix, com també es desconeix si reaccionen contra el TSHR o contra el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGF)⁴⁰². Malgrat que la tirotoxicosi de Graves es considera una malaltia autoimmunitària específica d'òrgan, freqüentment es presenta associada a una oftalmopatia infiltrativa (TAO)⁴⁰³ i, en d'altres casos, a dermatopaties.

Estructura tisular. Es caracteritza per una hiperplàsia fol·licular difusa de la glàndula tiroïdal, que molts cops implica la presència d'un goll de mida considerable. Els fol·licles hiperfuncionants presenten un augment de l'alçada de l'epiteli i una disminució de la llum fol·licular i sovint s'observen vacuols de reabsorció al pol apical de l'epiteli. La tiroide acostuma a estar força vascularitzada i tant el grau d'infiltració limfocitària com el grau d'organització de l'infiltrat (difús o en fol·licles limfoides) és variable en funció de l'estadi de la malaltia. La població limfocitària que infiltra la glàndula és majoritàriament de cèl·lules T (CD4⁺>CD8⁺), cèl·lules B, cèl·lules dendrítiques mieloides, cèl·lules plasmàtiques i macròfags en proporcions variables.

Mecanisme patogènic. El procés autoimmunitari que dóna lloc a la malaltia de GB sembla que es desencadena a partir de l'activació de les cèl·lules T CD4⁺ específiques de la tiroide que reclutarien cap a la glàndula cèl·lules B autoreactives i les induirien a la producció d'immunoglobulines estimuladores de la tiroide (TSI) contra el TSHR. Això desembocaria en la hiperfunció de la glàndula i en l'hipertiroidisme clínic (figura 16).

1.4.3 Mixedema primari

També s'anomena *tiroïditis limfocítica atròfica*, és un hipotiroidisme amb una incidència semblant a la de la tiroïditis de Hashimoto però la glàndula s'atrofia de forma aguda, en part per la presència d'anticossos anti-TSHR que contraresten l'efecte estimulador del creixement de la TSH. En general, es detecten anticossos circulants contra la resta d'antígens tiroïdals a títols molt baixos.

1.4.4 Altres patologies tiroïdals

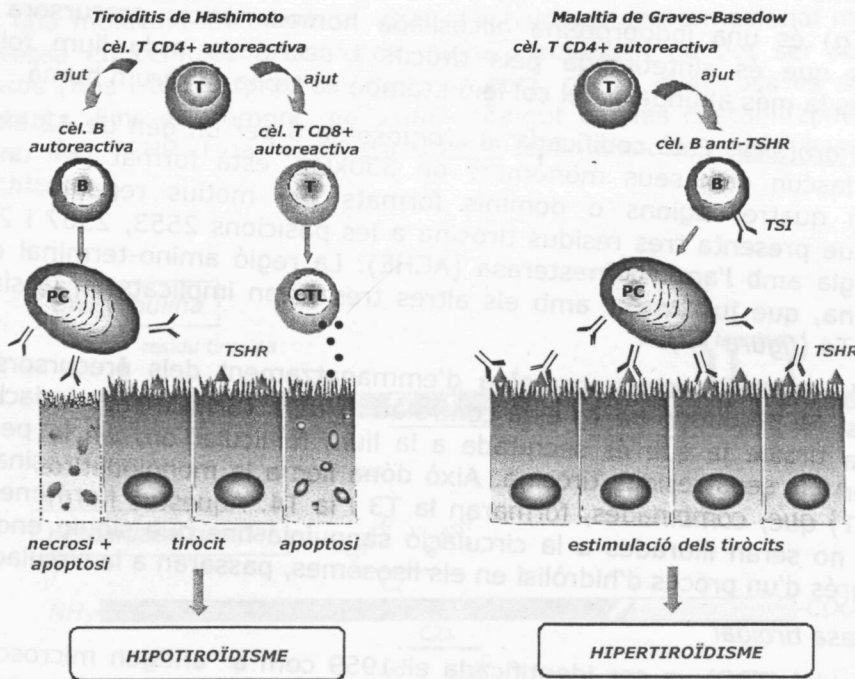
1.4.4.1 Goll simple i goll multinodular

- El *goll simple* és una patologia de la tiroide que cursa amb creixement de la glàndula com a conseqüència d'una hipertròfia i hiperplàsia dels tiròcits produïda per un hipersecreció de TSH. Si el trastorn es perllonga, se solen combinar fases d'hiperplàsia amb fases d'invulsió i desenvolupa en un goll multinodular.

- El *goll multinodular* generalment afecta dones de més de 50 anys i que no sembla desencadenada per un procés autoimmunitari, encara que en el sèrum dels malalts es poden trobar nivells mínims d'autoanticossos tiroïdals. La glàndula es caracteritza per

hipertròfia i hiperplàsia de les cèl·lules epitelials tiroïdals com a resultat de l'existència d'un o més nòduls hiperfuncionants. La seva etiopatogènia autoimmunitària no és del tot descartable donat que, en alguns casos, entre els nòduls s'observen àrees d'infiltració limfocítica (tiroïditis focal)⁴⁰⁴ que, molt extraordinàriament pot estar organitzada en fol·licles limfoides.

Fig. 16 Comparació dels mecanismes patogènics per explicar el desenvolupament de la tiroïditis de Hashimoto i la malaltia de Graves-Basedow. CTL, limfòcits T citotòxics; TSI, anticossos anti-TSHR estimuladors.



1.4.5 Models animals d'autoimmunitat tiroïdal

- Models d'hipotiroidisme. Encara que no es coneix fins el moment cap model animal de tiroïditis com la humana, s'han descrit al menys tres models espontanis que presenten algunes característiques similars, basats en la predisposició genètica dels animals: la soca de pollastre obès OS⁴⁰⁵, la tiroïditis espontània a la rata BB wistar diabètica⁴⁰⁶ i al ratolí NOD-H-2^{h4407}. També s'ha induït tiroïditis autoimmunitària experimental (EAT) mitjançant immunització amb antígens tiroïdals⁴⁰⁸ i amb transferència de cèl·lules prèviament immunitzats amb antígens tiroïdals^{409,410}. Aquests estudis han demostrat el paper central de les cèl·lules T CD4⁺ en la inducció de la EAT, mentre que han considerat la producció d'autoanticossos i la resposta de les cèl·lules B com un fenomen d'amplificació i de cronificació de la resposta inflamatòria. En general, però, en aquests models no s'observa una destrucció massiva de la tiroide, la imatge histològica és diferent de la de la tiroïditis de Hashimoto i són autolimitats.
- Models d'hipertiroïdisme. No existeixen models espontanis. Les estratègies per desenvolupar la malaltia de Graves-Basedow han consistit en immunitzacions de ratolins amb fibroblastes transfectats amb molècules híbrides murines d'MHC de classe II (I-A^k i I-A^d) i el receptor de la TSH humana³⁹⁴. Aquests animals presenten anticossos anti-TSHR en sèrum, nivell augmentats d'hormones tiroïdals i una tiroide hiperplàsica. D'aquesta soca s'han aïllat clons de cèl·lules T capaços de proliferar

enfront la TSHR⁴¹¹. Una altra aproximació ha estat la immunització de ratolins femelles amb cèl·lules transfectades amb el cDNA del TSHR³⁹³. En aquest model, la freqüència d'hipertiroïdisme és més baixa però s'observa un infiltrat limfocitari i una oftalmopatia.

1.4.6 Elements i mecanismes involucrats en el desenvolupament de les AITDs

1.4.6.1 Autoantígens

1.4.6.1.1 Tiroglobulina

La tiroglobulina (Tg) és una iodoproteïna glicosilada homodimèrica, precursora de les hormones tiroïdals que és sintetitzada pels tiròcits i secretada a la llum fol·licular. Quantitativament és la més abundant del col·loïd i també es troba al sèrum humà.

Estructura gènica i proteica: Està codificada al cromosoma 8 per un gen de 42 exons⁴¹² i 2748 residus. Cadascun dels seus monòmers de 330kDa, està format per un pèptid senyal de 19aa i quatre regions o dominis formats per motius repetits. La regió carboxiterminal (que presenta tres residus tirosina a les posicions 2553, 2567 i 2746) té un 28% d'homologia amb l'acetilcolinesterasa (ACHE). La regió amino-terminal conté el quart residu tirosina, que juntament amb els altres tres estan implicats en la síntesi de les hormones T3 i T4 (figura 17).

Funció i regulació: S'utilitza com a proteïna d'emmagatzament dels precursors de les hormones tiroïdals. La producció de Tg està controlada per la TSH i la seva iodació depèn de l'activitat de la tiroide ja que és secretada a la llum fol·licular on, via la peroxidasa tiroïdal, es ioda en els seus residus tirosina. Això dóna lloc a la monoiodetirosina (MIT) i diiodetirosina (DIT) que, combinades, formaran la T3 i la T4. Aquestes hormones unides a la tiroglobulina no seran lliurades a la circulació sanguínia fins que siguin endocitades pels tiròcits. Després d'un procés d'hidròlisi en els lisosomes, passaran a la circulació.

1.4.6.1.2 Peroxidasa tiroïdal

La peroxidasa tiroïdal (TPO) va ser identificada el 1959 com a "antigen microsomal". És l'enzim involucrat en la síntesi de les hormones tiroïdals i un dels principals autoantígens en les AITDs.

Estructura gènica i proteica: El gen que codifica la TPO humana està format per 150Kb i conté 17 exons⁴¹³, encara que s'ha descrit un "splicing" alternatiu que resulta d'una deleció de 171bp. És una glicoproteïna dimèrica de membrana, situada en la zona apical de la superfície cel·lular dels tiròcits, que pesa 107kDa (figura 17), formada per 933 residus aminoacídics amb una única zona transmembrana⁴¹⁴.

Funció i regulació: És un enzim que, en presència de H₂O₂, catalitza la reacció de iodació de la tiroglobulina i l'ensamblatge de la T3 i de la T4. Fins ara no s'ha obtingut l'estructura tridimensional de la molècula, però utilitzant difracció de raigs-X s'han obtingut dades de petits cristalls sobre el domini extracel·lular.

1.4.6.1.3 Receptor de la tirotropina

Estructura gènica i proteica: És un membre de la família dels receptors lligats a proteïna G, amb set regions transmembrana, físicament molt proper a d'altres receptors d'hormones glicoproteïques (com les gonadotrofines), que presenta un lloc d'unió per la TSH a la zona basal de la cèl·lula fol·licular tiroïdal (figura 17) i que a diferència d'altres glicoproteïnes de la família sofreix un processament intramolecular que genera dos fragments. La seva seqüència conté 744aa (més un pèptid senyal de 20aa). Està format per dues subunitats (A i B) lligades per ponts disulfur⁴¹⁵. La subunitat hidrosoluble extracel·lular A, té un pes de 55kDa i té un lloc d'unió per a la TSH i la subunitat B, amb

set dominis transmembrana i una cua citoplasmàtica, insoluble en aigua, de 35kDa, està ancorada en la bicapa lipídica.

Funció i regulació: La quantitat de TSHR present en la superfície de la membrana cel·lular oscil·la entre 10^2 - 10^4 receptors. Una característica important del TSHR que explicaria el seu potencial en l'estimulació antigènica és que, en una proporció variable dels TSHR de la superfície cel·lular, es trenca un polipèptid anomenat regió C pèptid, que es desintegra ràpidament donant lloc a les subunitats A i B del receptor. Quan la desintegració de l'extrem N-terminal de la subunitat B continua fins a nivell de la membrana plasmàtica, la subunitat A se'n desprèn. Tant l'alliberament del C pèptid, com de la subunitat A, pot iniciar o propagar una resposta immunològica contra el TSHR⁴¹⁶.

El TSHR és una molècula làbil amb un grau d'estructura conformacional molt elevat, que quan s'expressa en cèl·lules procarïotes queda insoluble i no pot ser reconeguda pels autoanticossos (fins i tot després del replegament), per la qual cosa és difícil obtenir-ne grans quantitats. Fins el moment, no s'han obtingut formes cristal·litzades de la fracció extracel·lular del TSHR i la seva estructura tridimensional està basada en model computeritzats.

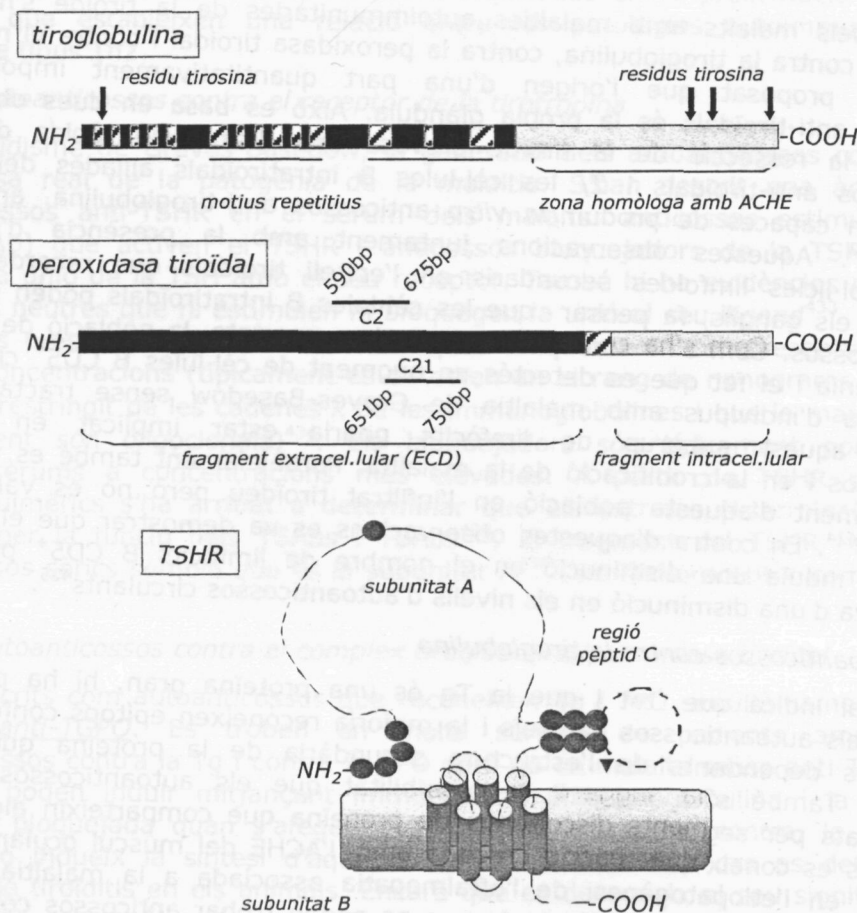


Fig. 17 Estructures moleculars de la tiroglobulina, la peroxidasa tiroïdal i el receptor de la tirotropina.

1.4.6.1.4 Transportador de ions Na^+/I^-

També s'anomena Na^+/I^- symporter. És una proteïna que es va descriure com a possible autoantigen a les AITDs perquè als malalts de Hashimoto la seva expressió es va trobar restringida a les cèl·lules epitelials tiroïdals que es trobaven en contacte amb l'infiltrat limfocitari (malgrat que a l'hipertiroïdisme de Graves s'expressa en tots els tiroïdals). S'encarrega de la captació i del transport del iode a través de la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials de la tiroide⁴¹⁷. La producció està regulada tant positivament per la TSH mitjançant factors de transcripció (com TTF-1, Pax-8)⁴¹⁸ com per la tiroglobulina que provoca una inhibició de la funció tiroïdal, la captació de iode i la permeabilització vascular induïda per la TSH⁴¹⁹. Alhora, la IL-1 α , l'IFN γ i el TNF α la regulen negativament.

1.4.6.1.5 64kD

És una proteïna que s'expressa al múscul extraocular i a la tiroide que es considera un autoantigen de l'oftalmopatia associada a les AITDs ja que autoanticossos de malalts amb autoimmunitat tiroïdal són capaços de reconèixer una proteïna d'aquesta mida anomenada també 1D1⁴²⁰.

1.4.6.2 Autoanticossos

En el sèrum dels malalts amb malalties autoimmunitàries de la tiroide s'han descrit autoanticossos contra la tiroglobulina, contra la peroxidasa tiroïdal i contra el receptor de la TSH. S'ha proposat que l'origen d'una part quantitativament important dels autoanticossos anti-tiroïdals és la pròpia glàndula. Això es basa en dues observacions principals: 1/ la resecció de la tiroide provoca una disminució ràpida dels nivells d'autoanticossos anti-tiroïdals i 2/ les cèl·lules B intratiroïdals aïllades dels infiltrats limfocitaris són capaces de produir *in vitro* anticossos anti-tiroglobulina, anti-TPO⁴¹⁴ i anti-TSHR^{421,422}. Aquestes observacions juntament amb la presència d'estructures similars als fol·licles limfoides secundaris en l'epiteli tiroïdal que recorden els que s'observen en els ganglis, fa pensar que les cèl·lules B intratiroïdals poden ser l'origen dels autoanticossos. Com s'ha comentat en anteriors apartats, la població de limfòcits B no és homogènia i el fet que es detectés un augment de cèl·lules B CD5⁺ circulants en sang perifèrica d'individus amb malaltia de Graves-Basedow sense tractar⁴²³ va fer pensar que aquest subgrup de limfòcits podria estar implicat en la síntesi d'autoanticossos i en la cronificació de la malaltia. Paral·lelament també es van aportar dades d'increment d'aquesta població en l'infiltrat tiroïdeu però no es van confirmar posteriorment⁴²⁴. En contra d'aquestes observacions es va demostrar que el tractament dels pacients induïa una disminució en el nombre de limfòcits B CD5⁺ però que no s'acompanyava d'una disminució en els nivells d'autoanticossos circulants⁴²⁵.

1.4.6.2.1 Autoanticossos contra la tiroglobulina

L'anàlisi inicial indica que, tot i que la Tg és una proteïna gran, hi ha pocs epítops reconeguts pels autoanticossos naturals i la majoria reconeixen epítops conformacionals, que són més dependents de l'estructura secundària de la proteïna que no de la seqüència⁴²⁶. També s'ha suggerit la possibilitat que els autoanticossos reconeguin epítops formats per segments discontinus de proteïna que comparteixin alguns residus crítics. A més es coneix una reacció creuada amb l'ACHE del múscul ocular, que podria ser rellevant en l'etiopatogènesi de l'oftalmopatia associada a la malaltia de Graves-Basedow⁴²⁷. Hi ha individus sans en els que es poden trobar anticossos contra Tg però que reconeixen regions molt conservades entre espècies⁴²⁸.

1.4.6.2.2 Autoanticossos contra la peroxidasa tiroïdal

L'autoimmunitat contra la TPO es manifesta en forma d'anticossos IgG tant en malalts amb hipertiroïdisme, hipotiroïdisme i eutiroidisme amb malaltia subclínica. Els esmentats autoanticossos reconeixen epítops conformacionals de la TPO, de forma que no reconeixen ni les formes desnaturalitzades, ni pèptids sintètics, ni TPO recombinant

expressada en cèl·lules procariotes⁴¹⁴. La producció d'aproximadament 200 anticossos recombinants humans expressats com Fab (obtinguts per la clonació de les cadenes pesades i lleugeres de les immunoglobulines de cèl·lules B perifèriques i d'infiltrants de la tiroide, probablement cèl·lules plasmàtiques) ha confirmat l'existència de múltiples epítops conformacionals B que no estan restringits a una sola subclasse d'Ig (IgG1, IgG4 i IgG2). Es tracta d'anticossos d'elevada afinitat (10^{-10} M kD) que utilitzen un repertori molt restringit de cadenes pesades i lleugeres⁴²⁹ i que els gens de les cadenes pesades presenten un alt grau de mutacions somàtiques, cosa que suggereix un procés de maduració per afinitat dirigida per antigen. En assajos de competició s'ha demostrat que la majoria d'autoanticossos contra la TPO reconeixen quatre epítops dominants que se solapen i que abarquen una regió immunodominant de la proteïna (590-750bp)⁴³⁰. Aquests autoanticossos (que són reconeguts pel 65-52% del malalts amb autoimmunitat tiroïdal) no inhibeixen la capacitat enzimàtica de la TPO, de forma que no es poden considerar directament responsables del desenvolupament de l'hipotiroïdisme. Cal comentar que només els autoanticossos tipus IgG1 intervenen en la lisi de cèl·lules que expressen TPO en assajos d'ADCC, dada que suggereix que els anticossos anti-TPO poden ser responsables de les lesions tisulars *in vivo*⁴³¹.

També s'han descrit IgEs anti-TPO a baixes concentracions en malalts amb tiroïdopaties⁴³², que probablement no estan implicades en la presentació antigènica *in vivo*, però que estableixen una relació entre les patologies autoimmunitàries i les respostes de tipus Th2.

1.4.6.2.3 Autoanticossos contra el receptor de la tirotropina

A l'hipertiroïdisme de Graves-Basedow, la generació dels autoanticossos contra el TSHR són la causa real de la patogènia de la malaltia. S'han descrit una àmplia varietat d'autoanticossos anti-TSHR en el sèrum dels malalts: anticossos estimuladors de la tiroide (TSAb) que activen el TSHR i anticossos bloquejadors de la TSH (TBAb) que inhibeixen la unió de la TSH amb el seu receptor. També hi ha evidències de l'existència d'anticossos neutres que ni estimulen ni bloquegen la unió al seu lligand⁴³³. Els anti-TSHR estimuladors presenten algunes característiques úniques com ser presents en el sèrum en baixes concentracions (típicament es detecten en el rang de nanograms per mililitre), tenir un ús restringit de les cadenes λ de les immunoglobulines i que la majoria són IgG1 (probablement són oligoclonals)⁴³⁴. Els bloquejadors són típicament policlonals i es troben al sèrum a concentracions més elevades. A partir de TSHR mutants i de receptors quimèrics s'ha arribat a determinar que els extrems N-terminal i C-terminal són crítics per la funció dels TSAb i TBAb⁴³⁵. El fragment del TSHR reconegut pels autoanticossos sèrics sembla que és la subunitat A⁴³⁶ i no l'holoreceptor com es creia fins ara.

1.4.6.2.4 Autoanticossos contra el complex tiroglobulina/peroxidasa tiroïdal

Van ser descrits com autoanticossos que reconeixen Tg i TPO simultàniament⁴³⁷ i es van anomenar *anti-TGPO*. Es troben en molts sèrums de pacients amb títols alts d'autoanticossos contra la Tg i contra la TPO però no en malalts sense anti-Tg. En models animals es poden induir mitjançant immunització amb tiroglobulina i la seva unió a l'antigen és bloquejada quan s'afegeix tiroglobulina freda. Per contra, la immunització amb TPO no induïx la síntesi d'aquests anticossos i en cap cas es detecten signes histològics de tiroïditis en els animals. Encara que es desconeix el seu significat fisiològic es considera que poden derivar del repertori de cèl·lules B natural per processos autoimmunitaris en els que es troben involucrades la tiroglobulina i la peroxidasa tiroïdal.

Inicialment es va suggerir que un dels mecanismes de mort de les cèl·lules epitelials a la tiroide era l'activitat citotòxica dels autoanticossos contra els tiròcits com a resultat de la deposició d'immunocomplexos a la membrana basal fol·licular, l'activació del complement i la posterior necrosi i es va demostrar tant *in vivo*^{438,397} com *in vitro*^{439,440,431}. Aquests experiments van donar suport a la hipòtesi de que els autoanticossos contra els

principals autoantígens tiroïdals eren els responsables de la destrucció de la glàndula, alhora que els tiròcits atacats per complement alliberaven citocines proinflamatòries (IL-1 i IL-6) que podien afavorir la infiltració i l'activació limfocitàries⁴⁴¹.

1.4.6.3 Citocines, quimiocines i autoimmunitat tiroïdal

Funcionalment, l'associació de les malalties tiroïdals a la desviació Th1/Th2 no està totalment acceptada perquè hi ha dades contradictòries provinents de determinacions de citocines i de quimiocines. Alguns autors en base a les citocines detectades, han suggerit que tant la tiroïditis de Hashimoto com la malaltia de Graves-Basedow poden ser Th1⁴⁴², mentre que per altres el fenotip associat a Graves-Basedow és Th2⁴⁴³. Estudis realitzats amb clons aïllats de l'infiltrat d'aquesta darrera patologia van revelar un patró heterogeni (Th1/2/0) amb predominància Th1. Quan el fenotip de les citocines produïdes per aquests clons es compara amb l'especificitat antigènica, s'observa que els clons que responen a TPO són predominantment Th1, mentre que els específics de TSHR són Th2/Th0. Actualment es tendeix a considerar que l'hipotiroïdisme de Hashimoto s'associa a la presència de cèl·lules Th1 productores d'IFN γ i l'hipertiroïdisme de Graves-Basedow a la presència de citocines tipus Th2 que inhibeixen les respostes Th1, promouen la immunitat humoral i són responsables de l'alliberament d'IL-4, IL-5 i IL-10¹⁷. Aquestes dades es confirmen amb resultats del nostre laboratori en les que s'ha estudiat la producció de citocines en cèl·lules individuals i en clons per citometria i s'ha observat que les cèl·lules infiltrants CD4⁺ de mida més gran procedents de malalts de Graves-Basedow són predominantment productores d'IL-4 mentre que les CD8⁺ en tiroïditis de Hashimoto sintetitzen IFN γ ⁴⁴⁴.

Les cèl·lules T, però, no són les úniques capaces de secretar citocines en les malalties autoimmunitàries de la tiroide. Els tiròcits, tant en situació basal com sota estímuls, són les cèl·lules endocrines amb més capacitat de produir citocines (IL-1, IL-6⁴⁴⁵, IL-8, TGF β) i quimiocines (MCP-1⁴⁴⁶, IP10, Mig⁴⁴⁷) *in vitro* que poden jugar un paper en l'estimulació local i en el manteniment de la resposta immunitària contra els autoantígens tiroïdals⁴⁴⁸.

1.4.6.4 Mecanismes de destrucció dels tiròcits

L'activitat citolítica dels limfòcits intratiroïdals pot estar mediada tant per l'exocitosis de grànuls que contenen *perforina*, descrits en limfòcits intratiroïdals de Hashimoto⁴⁴⁹, com pel reconeixement dels "death receptors"^{450,451}. El paper de la perforina no està clar ja que, encara que els tiròcits de HT poden expressar molècules de classe I i de classe II durant el procés autoimmunitari i que clons CD8⁺ i línies T mostren capacitat citotòxica enfront cèl·lules tiroïdals autòlogues^{452,453,454}, les cèl·lules T autoreactives aïllades dels infiltrats tiroïdals no tenen aquesta activitat citotòxica espontània³⁹⁷. L'expressió inapropiada de molècules que contenen receptors de mort (com CD95/CD178) estaria relacionada amb la mort dels tiròcits sobretot en la malaltia de Hashimoto. El patró d'expressió d'aquestes dues molècules en tiroïdes normals és confós perquè alguns autors han descrit absència de CD95 i presència de CD178 mentre que d'altres han reportat justament el contrari^{455,456}. Se sap que les dues molècules s'indueixen en tiròcits en cultiu, per tant sembla que només les mostres de tiroïdes provinents de teixits normals serien útils per determinar la importància de CD95 i CD178 en autoimmunitat. Contràriament al que passa a la malaltia de Graves, sembla que hi ha acord en considerar que on sí que s'expressen simultàniament és en teixits de Hashimoto i que s'indueixen durant la malaltia. Hi ha altres parelles receptor/lligand de la mateixa família (TNF α ⁴⁴⁸ i TRAIL⁴⁵⁷) presents en els teixits tiroïdals durant la tiroïditis que podrien contribuir de forma similar a l'apoptosi dels tiròcits.