

*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

2. HIPÒTESI I OBJECTIU

2. HIPÒTESI GENERAL

A les tiroides afectades per fenòmens d'autoimmunitat s'hi estructuren fol·licles limfoides ectòpics en els que es produeixen errades en els mecanismes de tolerància B perifèrica que desenvoquen en l'expansió local de cèl·lules B autoreactives. La manca d'eliminació total o parcial d'aquestes cèl·lules i l'existència de cèl·lules T autoreactives de baixa afinitat un cop iniciada la resposta contra determinats autoantígens, contribueixen a la cronificació *in situ* del procés autoimmunitari.

2.1 Hipòtesis concretes i objectius

Hipòtesi 1

A les tiroides de malalts amb autoimmunitat tiroïdal s'organitzen fol·licles limfoides ectòpics funcionals en els que es generen cèl·lules B autoreactives específiques d'antígens tiroïdals.

Objectiu 1

1.1 Demostrar que el teixit limfoide que s'organitza a les tiroides de pacients amb malaltia de Graves-Basedow i de tiroïditis de Hashimoto té una composició i una distribució cel·lulars similar a la dels fol·licles limfoides dels teixits limfoides secundaris.

1.2 Estudiar el tipus de cèl·lules B (B-1 o B-2) que constitueixen l'infiltrat limfocitari tiroïdal en general i els fol·licles limfoides intratiroïdals en particular.

1.3 Demostrar que en els fol·licles limfoides ectòpics intratiroïdals tenen lloc processos típics de reacció de centre germinal com proliferació de centroblastes, reordenaments secundaris dels gens de les immunoglobulines, mort cel·lular programada de centròcits, canvi d'isotip.

1.4 Demostrar que, de forma similar als fol·licles limfoides secundaris dels ganglis limfàtics, els centres germinals intratiroïdals són oligoclonals, és a dir, deriven de la proliferació d'un nombre inicial de cèl·lules B molt reduït.

Hipòtesi 2

Les cèl·lules B originades als fol·licles limfoides intratiroïdals són les responsables del manteniment de la resposta humoral contra els autoantígens descrits en les malalties autoimmunitàries de la tiroide (tiroglobulina, peroxidasa tiroïdal i receptor de la tirotròpina). L'adquisició de característiques de resposta dirigida per antígen (*antigen-driven*) pròpia dels malalts, seria un procés que es donaria als centres germinals intratiroïdals.

Objectiu 2

2.1 Fer una anàlisi de la reactivitat de les cèl·lules B dels fol·licles limfoides contra els principals autoantígens tiroïdals (tiroglobulina, peroxidasa tiroïdal i receptor de la tirotròpina) en el que s'estudiï la proporció i la distribució de les cèl·lules B autoreactives i en el que s'investigui l'especificitat contra antígens tiroïdals no caracteritzats.

2.2 Demostrar que els reordenaments de les immunoglobulines que produeixen els limfòcits B a la tiroide presenten característiques pròpies de direcció per antígen via hipermutació somàtica i maduració per afinitat.

Hipòtesi 3

La deleció de les cèl·lules B autoreactives no tindria lloc degut a un defecte en els mecanismes de tolerització propis dels fol·licles limfoides canònics.

Objectiu 3

Estudiar el nivell d'apoptosi dels fol·licles limfoides a l'òrgan diana i algunes molècules involucrades en aquest procés per comparació amb els que tenen lloc a teixits limfoides secundaris com gangli limfàtic o amígdala palatina.

Hipòtesi 4

En el manteniment de les respostes autoimmunitàries tiroïdals, la col·laboració dels limfòcits T autoreactius de baixa afinitat amb les cèl·lules B d'alta afinitat explicaria l'evolució lenta de la malaltia.

Objectiu 4

Estudiar si es produeixen reordenaments secundaris dels gens del TCR a les cèl·lules T que formen part dels fol·licles limfoides intratiroïdals.

Hipòtesi 5

El patró d'expressió de les quimiocines i citocines que dirigeixen l'arribada, l'estructuració final i el manteniment dels fol·licles limfoides terciaris a nivell de tiroide és similar o igual al que s'ha descrit pels fol·licles limfoides secundaris en gangli limfàtic o amígdala palatina.

Objectiu 5

5.1 Determinar al patró d'expressió de les principals quimiocines i citocines (CXCL12, CXCL13, CCL21, CCL22, LT α , LT β) involucrades en la formació dels centres germinals.

5.2 Estudiar la possible regulació de l'expressió de les esmentades quimiocines i citocines per citocines pro-inflamatòries presents en l'infiltrat de les tiroïdes amb autoimmunitat tiroïdal.

5.3 Determinar la capacitat dels tiròcits i d'altres tipus cel·lulars de produir quimiocines i de contribuir activament a l'organització dels fol·licles limfoides intratiroïdals. Demostrar la seva funcionalitat a través de la capacitat quimiotàctica.

5.4 Comparar el patró d'expressió a nivell qualitatiu i quantitatiu d'algunes quimiocines i citocines entre el teixit tiroïdal de malalts amb tiroïditis de Hashimoto i de Graves-Basedow que continguin centres germinals ectòpics amb aquells que no en continguin i amb els teixits control corresponents.

5.5 Identificar els tipus cel·lulars responsables de l'expressió o síntesi de les quimiocines detectades.

5.6 Establir, mitjançant una anàlisi multifactorial, el pes específic de cada factor quimiotàctic en el desenvolupament dels centres germinals ectòpics.

Hipòtesi 6

El patró d'expressió dels receptors de quimiocines i de receptors de citocines presents a l'infiltrat tiroïdal és similar o igual al que s'ha descrit pels fol·licles limfoides secundaris en gangli limfàtic o amígdala palatina.

Objectiu 6

6.1 Determinar al patró d'expressió en els leucòcits dels principals receptors de quimiocines i de citocines (CXCR4, CXCR5, CCR7, LT β R) involucrats en l'arribada i estructuració final dels centres germinals.

Hipòtesi 7

L'arribada selectiva i posterior acumulació a la tiroide de limfòcits infiltrants que expressen un determinat receptor de quimiocines repercuteix en un biaix en l'expressió dels receptors de quimiocines en les poblacions limfocitàries perifèriques.

Objectiu 7

7.1 Determinar el patró d'expressió dels principals receptors de quimiocines en els leucòcits de sang perifèrica de malalts amb autoimmunitat tiroïdal involucrats en l'arribada i estructuració final dels centres germinals.

7.2 Comparar el patró d'expressió dels principals receptors de quimiocines en els leucòcits de sang perifèrica de malalts amb autoimmunitat tiroïdal amb controls sans.

3. *PROTOCOLS*

3.1 MOSTRES

Les tiroïdes, sang i sèrum utilitzats en aquest estudi provenen de pacients amb malaltia de Graves-Basedow, tiroïditis de Hashimoto i goll multinodular. Com a teixits de referència també s'ha usat teixit tiroïdal procedent d'intervencions quirúrgiques cervicals a pacients amb neoplàsies de laringe. El diagnòstic clínic s'ha fet en base als paràmetres clínics habituals: a) determinació per radioimmunoassaig dels nivells plasmàtics de T3, T4, T4 lliure i TSH i b) detecció d'autoanticossos tiroïdals sèrics (els anticossos anti-microsoma (peroxidasa tiroïdal o TPO) i anti-tiroglobulina (Tg) s'han determinat per ELISA (Immunowell, San Diego, CA) i els anticossos anti-receptor de la tirotropina mitjançant RIA (Brahms Diagnostica, Berlin, Alemanya). Els diagnòstics clínics han estat confirmats amb l'anàlisi histopatològica de les glàndules. Excepte dos, els pacients amb hipertiroïdisme havien estat tractats amb carbimazol i/o propranolol i presentaven una funció tiroïdal normal en el moment de l'operació. Les dades clíniques corresponents als pacients que formen part de l'estudi es llisten a la *taula VIII*.

Les tiroïdes incloses a l'estudi s'han seleccionat en funció dels títols d'autoanticossos al sèrum i del grau d'infiltració limfocitària de la glàndula, que s'han usat com a indicadors d'un procés autoimmunitari actiu. A més dels esmentats teixits, s'han utilitzat mostres de timus humans (TMB), amígdala palatina (PT) i nòduls limfàtics (LN; un dels quals correspon a un dels malalts de tiroïditis de Hashimoto) com a teixits limfoides primaris i secundaris de referència.

3.2. PROCESSAMENT DEL TEIXIT

3.2.1 Obtenció de blocs de congelació

El teixit es mostreja de forma que els blocs siguin representatius del total de la glàndula i es talla en blocs d'aprox. 0,5cm³ que es dipositen submergits en isopentà refredat prèviament en un bany d'acetona amb gel sec. Els blocs es conserven a -70°C.

3.2.2 Obtenció de blocs parafinats

El teixit es talla en blocs d'aprox. 1cm³ i es dipositen submergits en 200ml de formol durant 12-48 hores. Després de deshidratació gradual en banys amb concentracions creixents d'alcohols, s'inclouen en parafina i es mantenen a T.A. fins que s'han d'utilitzar.

3.2.3 Obtenció de limfòcits infiltrants i cèl·lules fol·liculars tiroïdals

3.2.3.1 Digestió enzimàtica del teixit i càlcul del percentatge d'infiltració limfocitària

1/ *Digestió*. Es pesa el teixit després d'haver-ne eliminat el greix i el teixit conjuntiu i es talla en blocs d'aprox. 3mm³. Els fragments es renten durant 5min amb medi HBSS (Hank's balanced salt solution; Life Technologies, Gaithersburg, USA) suplementat amb L-glutamina 2mM (Sigma Chemical Co., St Louis, USA), estreptomicina 0,1mg/ml (CEPA, Espanya) i penicil·lina 100U/ml (Laboratorios Normon, Espanya), es recuperen i s'afegeixen a la solució de digestió preparada amb medi RPMI 1640 (Life Technologies) suplementat amb tripsina 2,5mg/ml (Sigma), col·lagenasa 0,2mg/ml tipus P (act. esp 2,7U/mg; Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanya) i DNAsa 0,05mg/ml (Sigma). Es realitzen digestions consecutives de 10min cadascuna a 37°C en agitació contínua i cada 10min es recull el material digerit en medi RPMI complet suplementat amb L-glutamina 2mM, gentamicina 40µg/ml, penicil·lina 100U/ml i 10% FCS a 4°C per tal d'inactivar els enzims i es filtra amb una malla de niló de 500µm de diàmetre de porus. Posteriorment es fan dos rentats per centrifugació de 10min a 500g i el material digerit es manté a 4°C fins que s'ha fet un recompte cel·lular (amb blau tripà) i una valoració de la viabilitat

(taronja d'acridina i bromur d'etidi). A la suspensió de material no digerit s'hi afegeix solució de digestió nova i el procés es repeteix fins que s'aconsegueix una digestió total del teixit, és a dir, una suspensió cel·lular formada principalment per cèl·lules fol·liculars tiroïdals (TFCs), limfòcits infiltrants (ITLs), macròfags, cèl·lules endotelials (END) i cèl·lules dendrítiques (DCs). Les cèl·lules amb una viabilitat superior al 80% i a una concentració aproximada de 5×10^6 cèls. per ml es criopreserven en vapors de N_2 líquid en sèrum boví fetal (FCS) que conté un 10% DMSO (dimetil sulfòxid), prèviament refredat a 4°C o bé s'utilitzen directament en funció dels requeriments de l'experiment.

2/ El càlcul del percentatge d'infiltració limfocitària de cada tiroide (respecte del total cel·lular) s'ha establert mitjançant anàlisi per citometria de fluxe d'una mostra de la suspensió cel·lular tenyida utilitzant la barreja comercial d'anticossos anti-CD45-FITC/anti-CD14-PE (Beckton Dickinson, San José, USA).

3.2.3.2 Separació de limfòcits infiltrants i de cèl·lules fol·liculars tiroïdals per adherència

En base a la capacitat de les cèl·lules epitelials d'adherir-se al plàstic, la suspensió cel·lular producte de la digestió mecànica/enzimàtica es cultiva en medi RPMI complet durant 16-24 hores en atmosfera de CO_2 (5%) a 37°C. Passat aquest temps, es recuperen els limfòcits del sobrenedant del cultiu i es purifiquen mitjançant un gradient de Ficoll (Ficoll Hypaque Lymphoprep; Pharmacia Biotech, Uppsala, Suècia) per eliminar restes cel·lulars, eritròcits i altres cèl·lules limfoblàstiques. Les cèl·lules epitelials tiroïdals que queden adherides al flascó (que representen el 90-95% del total de cèl·lules adherides) es recuperen utilitzant una solució de 0,25mg/ml de tripsina i 0,05M d'EDTA (Sigma) en medi RPMI. Ambdós tipus cel·lulars s'usen directament o es criopreserven com ITLs (limfòcits intratiroïdals) i TFCs (cèl·lules fol·liculars tiroïdals) purificades. Quan el cultiu cel·lular pot modificar l'expressió de molècules d'interès (com quimiocines, receptors de quimiocines, molècules d'adhesió i d'altres), els limfòcits intratiroïdals s'obtenen per gradient de densitat de Ficoll directament de la suspensió cel·lular provinent de la digestió. En aquests casos, els eritròcits que resten a la zona de més densitat (zona del ficoll) es rebutgen.

3.3 PROCESSAMENT DE LES MOSTRES DE SANG PERIFÈRICA

De cada pacient (tant malalts com controls) s'obtenen dues mostres de sang perifèrica en el moment de la intervenció o poques hores després per a determinar els nivells d'autoanticossos i per separar limfòcits de sang perifèrica (PBLs).

3.3.1 Obtenció del sèrum

Se separa per centrifugació a 1200g durant 10min a partir de 3-5ml de sang sense anticoagulant i es conserva a -20°C. Es fa servir per repetir la determinació d'autoanticossos (en els pacients amb autoimmunitat) o per fer-la per primer cop (en cas de pacients sense autoimmunitat tiroïdal coneguda) per s'uniformitzar els resultats donat que les mostres utilitzades provenen de diferents centres.

3.3.2 Obtenció dels limfòcits de sang perifèrica o PBLs

A partir de 20ml de sang perifèrica recollida en tub estèril amb heparina sòdica, es prepara una dilució amb un volum igual de sèrum fisiològic i se separen els limfòcits per gradient de Ficoll centrifugant 30min a 600g a T.A. Les cèl·lules recuperades de la interfase es renten dos cops per centrifugació amb medi RPMI complet i es criopreserven en vapors de N_2 líquid amb una solució de FCS i 10% DMSO fins que s'utilitzen.

<i>mostra</i>	<i>sexe</i>	<i>edat</i>	<i>αTg</i>	<i>αTPO</i>	<i>αTSHR</i>	<i>nomencil.</i>
GD228	D	62	neg	neg	80,0	GD1
GD255	D	30	neg	25,0	20,0	GD8
GD257	D	21	598,0	1155,0	67,0	GD2
GD258	D	16	neg	neg	118,0	GD19
GD278	D	39	neg	neg	16,0	GD4
GD373	H	69	172,1	39,2	178,0	GD10
GD378	D	25	177,3	152,3	1,0	GD20
GD381	D	46	162,8	48,1	ND	GD21
GD389	D	35	66,8	143,6	37,5	GD22
GD390	D	37	28,3	neg	8,4	GD23
GD391	H	45	ND	25,0	ND	GD24
GD393	D	50	35,0	42,0	62,0	GD25
GD394	D	50	neg	43,5	38,0	GD26
GD403	D	22	36,0	550,0	neg	GD15
GD412	D	26	239,0	124,3	8,8	GD27
GD413	D	44	37,2	39,4	20,6	GD28
GD416	D	25	56,4	40,5	neg	GD29
GD417	D	35	neg	25,0	75,0	GD30
GD421	D	32	179,0	945,0	23,3	GD31
GD423	D	34	70,0	53,0	15,5	GD7
GD424	D	32	neg	neg	4,1	GD18
GD425	D	26	neg	28,0	4,0	GD17
GD426	H	42	1265,0	1001,0	85,9	GD14
GD427	D	51	190,0	1001,0	14,9	GD13
GD429	H	29	neg	7000,0	neg	GD32
GD430	D	33	neg	46,0	10,1	GD6
GD452	D	23	ND	ND	28,0	GD3
GD451	D	33	neg	ND	33,0	GD5
GD431	D	34	neg	neg	neg	GD9
GD443	D	51	neg	neg	neg	GD11
GD449	D	35	neg	neg	1,14	GD12
GD448	D	26	neg	120,0	40,1	GD16
HT290	D	29	584,0	766,0	neg	HT5
HT384	D	51	ND	ND	ND	HT2
HT385	D	21	774,0	105000	neg	HT1
HT444	D	67	ND	ND	ND	HT3
HT447	D	45	neg	85,1	neg	HT4
BL	D	38	ND	ND	ND	HT5
JC	D	45	ND	ND	ND	HT6
RP	D	61	ND	ND	ND	HT7
AP1	D	39	ND	ND	ND	HT8
AP2	H	35	ND	ND	ND	HT9
MNG364*	H	53	neg	neg	1,2	MNG9
HD1	H	63	neg	neg	neg	
HD2	D	ND	neg	neg	neg	
MNG359	H	49	neg	neg	neg	MNG2
MNG360	D	63	neg	neg	2,5	MNG7
MNG361	D	39	neg	neg	7,0	MNG8
MNG362	D	60	neg	neg	1,6	MNG3
MNG376	D	62	neg	37,9	1,4	MNG4
MNG379	D	56	neg	neg	1,2	MNG10
MNG395	D	41	neg	neg	neg	MNG5
MNG396	D	37	neg	36,0	neg	MNG11
MNG399	D	57	neg	45,9	1,2	MNG1
MNG409	D	62	27,5	41,0	neg	MNG12
MNG419	D	49	36,0	23,0	neg	MNG13
MNG420	D	45	neg	neg	neg	MNG6

Taula VIII. Dades clíniques dels pacients inclosos a l'estudi que inclouen l'edat (anys), el sexe i els títols d'autoanticossos sèrics: a-Tg: anti-tiroglobulina, valors normals entre 67 i 115U/ml; a-TPO: anti-peroxidasa tiroïdal, valors normals entre 42 i 100U/ml; a-TSHR: anti-receptor de la tirotropina, valors normals <1,5 U/l. GD, malaltia de Graves-Basedow; HT, tiroïditis de Hashimoto; MNG, goll multinodular; HD, donant sà; neg, valors inferiors al límit de detecció; ND, no determinat.

3.4 PRODUCCIÓ DE LÍNIES LIMFOBLÀSTIQUES TRANSFORMADES AMB EL VIRUS D'EPSTEIN BARR

Les línies limfoblàstiques s'obtenen transformant PBLs o ITLs dels pacients estudiats amb el virus d'Epstein Barr (EBV). El virus s'obté del sobrenedant del cultiu de la línia cel·lular B95.8 (*marmoset cell line*) crescuda fins a la saturació durant 8-10 dies en medi RPMI complet a 37°C i en atmosfera rica en CO₂ (5%). El sobrenedant del cultiu se centrifuga, es filtra amb un filtre de 0,45µm de porus i es manté a -70°C o es fa servir directament per la transformació.

Transformació: es fa en un tub cònic (per afavorir el màxim contacte cel·lular) en el que hi ha un "pellet" o botó cel·lular d'aproximadament 10⁷ PBLs o 10⁵ ITLs i sobre el que s'aplica 1ml de l'esmentat sobrenedant. S'incuba durant 1h a 37°C en atmosfera de CO₂ (5%) i sense ressuspendre el pellet, s'hi afegien 9ml de medi RPMI complet suplementat amb 20% FCS i 4µg/ml de ciclosporina A purificada. Es cultiva durant 3 setmanes canviant el medi cada 7 dies i evitant ressuspendre el botó cel·lular. La tercera setmana es ressuspèn el pellet i es cultiva en placa de 24 pous per tal d'expandir la línia que, a partir d'aquest moment, es cultiva en medi RPMI complet suplementat amb 10% de FCS.

Les línies obtingudes s'han anomenat amb el número de la glàndula seguit del sufix "ITLs" o "PBLs" segons la seva procedència.

3.5 ALTRES LÍNIES CEL·LULARS

Línia HT93. Generada per transfecció de cèl·lules fol·liculars tiroïdals humanes amb el plàsmid pX-8 que conté la regió antigènica del virus SV40⁴⁵⁸. Aquestes cèl·lules immortalitzades mantenen característiques de cèl·lules epitelials però han perdut la capacitat de sintetitzar tiroglobulina. Produeixen poc AMPc en resposta a l'estímul de la TSH mentre que hiperexpressen HLA de classe I i expressen HLA classe II sota estímuls de citocines. Creixen en monocapa en medi RPMI complet.

Línia DAP3. Línia cel·lular de fibroblastes murins⁴⁵⁹ que creixen en monocapa en medi RPMI complet. S'han usat per cotransfectar-les amb la parella de vectors pSVL i pSVL.TSHR i utilitzar-les com a substrate per cribatge dels sobrenedants de les línies de limfòcits intratiroïdals fussionades amb F3B6.

Línia 300.19. Línia murina de cèl·lules pre-B⁴⁶⁰ que creixen en suspensió en medi RPMI complet suplementat amb 10% sèrum boví fetal i amb 55µM 2β-mercaptoetanol. S'han usat per transfectar-les amb la construcció pcDNA3.TSHR i utilitzar-les com a substrate per cribatge dels sobrenedants de les línies de limfòcits intratiroïdals fussionades amb F3B6.

Línia F3.B6. Línia mielomatosa heterohíbrida humà-murí⁴⁶¹ que no és capaç de secretar anticossos i que es cultiva en medi RPMI/Glutamax (Life Technologies) complet que conté un 20% de sèrum boví fetal, suplementada amb 50mg/ml gentamicina i una dilució 1/25 de 8-azaguanina (Sigma) per mantenir les cèl·lules sensibles a HAT. S'ha utilitzat en la fusió del limfòcits intratiroïdals per obtenir cèl·lules en creixement continuat.

Daudi. Línia cel·lular limfoblàstica derivada d'un limfoma de Burkitt que expressa IgM de superfície, és negativa per β-2-microglobulina i positiva per EBV. S'ha expandit en medi

RPMI 1640 suplementat amb (2mM L-glutamine, 1,5g/L bicarbonat sòdic, 4,5g/L glucosa, 10mM HEPES i 1,0mM piruvat sòdic) amb 10% de sèrum boví fetal. S'ha fet servir en l'estandardització de l'amplificació del CDR3.

Nama/wa. Línia cel·lular limfoblàstica derivada d'un limfoma de Burkitt que expressa IgMk de superfície, i que s'ha mantingut en cultiu amb medi RPMI 1640 amb 2mM L-glutamina, 1,5g/L bicarbonat sòdic, 4,5g/L glucosa, 10mM HEPES, 1mM piruvat sòdic i 7,5% de sèrum boví fetal. S'ha fet servir en l'estandardització de l'amplificació del CDR3.

Ramos. Línia cel·lular limfoblàstica derivada d'un limfoma de Burkitt que expressa IgMl de superfície i secretada, és negativa per EBV, IL-4R positiva i CD23 positiva. S'ha expandit en medi RPMI 1640 suplementat amb (2mM L-glutamine, 1,5g/L bicarbonat sòdic, 4,5g/L glucosa, 10mM HEPES i 1,0mM piruvat sòdic) amb 10% de sèrum boví fetal. S'ha fet servir en l'estandardització de l'amplificació del CDR3.

3.6 OBTENCIÓ I CRIBATGE DE LÍNIES I CLONS DE CÈL·LULES B

Les línies i clons procedents de quatre tiroïdes s'han obtingut per fusió de F3B6 amb una quantitat variable d'ITLs ($4,5 \times 10^6$ del GD431, 9×10^6 del GD426, $1,5 \times 10^6$ de l'HT385, 9×10^6 del GD429) obtinguts segons l'apartat 2.3.2. En el cas de GD431 s'ha fet una fusió alternativa afegint 6×10^6 PBLs autòlegs irradiats obtinguts segons l'apartat 3.2.

3.6.1 Fusions i obtenció de línies

Rentat de les cèl·lules. Les cèl·lules F3B6 es mantenen en cultiu continuat amb medi complet selectiu RPMI/Glutamax (apartat 5), es recuperen per rentat enèrgic del flascó i es ressuspenen en medi RPMI sense suplementar. Els ITLs es recuperen i ressuspenen de la mateixa manera. Els dos tipus cel·lulars es barregen seguint les proporcions nITLs + 2nF3B6 en un tub de 50ml, se centrifuguen a 600g per tal de no compactar excessivament el botó cel·lular i s'elimina el sobrenedant.

Fusió. S'afegeix 1ml de PEG 50% pre-escalfat a 42°C i es barreja amb les cèl·lules durant 2min amb moviment de rotació manual a 37°C. Es dilueix el PEG amb 2ml d'RPMI barrejant durant 2min (a raó de 1ml/60") i posteriorment s'afegeixen 10ml d'RPMI en 5' (1ml/30") i 10ml més d'RPMI en 2min (1ml/10").

Es renten les cèl·lules durant 5min a T.A. a 700g i es ressuspenen en medi selectiu RPMI que conté HAT (GibcoBRL Products, Cheshire, UK) a raó de 10^6 cèl·lules totals/ml de medi. En el cas que s'utilitzin PBLs com a cèl·lules "feeders" irradiades, s'afegeixen en aquest moment a la mateixa concentració. Les cèl·lules se sembren en plaques de 96 pouets de fons pla a raó de 170µl/pou i es cultiven a 37°C en una atmosfera amb 5% CO₂ durant 7-10 dies.

3.6.2 Cribatge de les línies. ELISA per Igs, Tg i TPO

Donat que l'interès del treball no és l'obtenció de monoclonals sinó l'estudi de l'especificitat antigènica de les cèl·lules B infiltrants de la tiroide, per evitar d'obtenir un patró esbiaixat per sobrecreixement de determinades cèl·lules en detriment d'altres, al cap de 7 dies d'efectuada la fusió es prenen mostres de sobrenedant de cultiu dels pouets en els que s'ha detectat creixement actiu. Aquests s'utilitzen per quantificar la concentració d'Igs totals (IgG, IgM i IgA) mitjançant l'ELISA dissenyat al nostre laboratori i la secreció d'anticossos anti-Tg i anti-TPO utilitzant un kit comercial modificat. Els protocols es detallen als apartats 4.14.1 i 4.14.2 respectivament.

Es consideren línies secretores aquelles que produeixen més de 5ng/ml d'Igs i que són positives per anticossos contra qualsevol dels dos autoantígens considerats (Tg i TPO). Les línies cel·lulars en creixement que produeixen menys d'aquesta quantitat no s'expandeixen i es criopreserven en "bulk" per tal d'estudiar-les posteriorment.

3.6.3 Clonatge

Les línies de cèl·lules B considerades d'interès es clonen per dilució límit. Per a això es recullen les cèl·lules provinents de cada línia i es fa un recompte i un càlcul de la viabilitat cel·lular per dilució a la meitat amb una solució de taronja d'acridina i bromur d'etidi. Les cèl·lules es ressuspenen en medi de cultiu complet i se sembren en plaques de 96 pouets amb fons pla a raó de 3, 1 i 0,3 cèl·lules per pouet i es mantenen en cultiu a durant 5-7 dies. Es consideren clonals quan, després de cultiu durant 15 dies, el percentatge de pouets amb creixement cel·lular visible en la placa d'1 cèl·lula per pouet no supera el 30% del total de la placa.

3.6.4 Cribatge dels clons

Es fa per ELISA de forma similar al cribatge de les línies però utilitzant com a substracte el sobrenedant dels pouets quan assoleixen un 50-60% de confluència. Els clons que secreten Igs i/o que alliberen al sobrenedant anticossos contra Tg o TPO s'expandeixen i es mantenen en cultiu continuat a una concentració de $1,5 \times 10^6$ cèl·lules/ml. Quan assoleixen el 60-70% de confluència, es va recollint sobrenedant i es conserva a -70°C per tal d'anar monitoritzant el manteniment de la seva capacitat de secreció dels anticossos desitjats.

3.7 ANTÍGENS

S'utilitzen per a la detecció de cèl·lules B amb receptors específics d'antígens tiroïdals sobre seccions de tiroïdes que continguin centres germinals (apartat 3.11).

1/ Tiroglobulina i peroxidasa tiroïdal. Les proteïnes humanes purificades (biotinilades o sense conjuguar) són una donació de B. Leistler (Pharmacia&Upjohn, Freiburg, Alemanya). S'han obtingut a les següents concentracions: Tg-Bio 3,2mg/ml; Tg-sense conjuguar 2,67mg/ml; TPO-Bio 2,0mg/ml; TPO-sense conjuguar 2,3mg/ml i s'han mantingut en PBS amb un 0,05% NaN_3 a 4°C fins a utilitzar-les.

2/ Receptor de la tirotropina. S'ha obtingut del laboratori de B. Rapoport i S. MacLahan com a proteïna humana purificada amb una cua de cinc histidines (TSHR-289 o forma activa) que és reconeguda pels autoanticossos humans i altament sensible a la temperatura. És reconeguda per un anticòs de ratolí contra histidines conjugat amb biotina. També s'ha obtingut la proteïna sense conjuguar (forma inactiva no marcada) que no és reconeguda per anticossos humans. La concentració proteica d'ambdós antígens és d'1,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.8 ESTIMULACIONS AMB CITOCINES

Les monocapes de tiròcits i de la línia cel·lular HT93 es mantenen en cultiu amb medi complet suplementat amb 10% de sèrum boví fetal (FCS) fins que 2 hores abans d'iniciar l'estimulació es disminueix la concentració de FCS al 2%. Els cultius s'estimulen amb 200IU/ml d'IL-1 β humana recombinant (Dako, Glostrup, Denmark), 500IU/ml d'IFN γ humà recombinant (Dako) o 500IU/ml de TNF α humà recombinant (Dr. GR Adolph, Vienna, Austria).

3.9 TINCIÓ PER IMMUNOFLUORECÈNCIA I IMMUNOHISTOQUÍMICA I ANÀLISI DE LES IMATGES

3.9.1 Anticossos

Són els que figuren a continuació a la *taula IX*.

Taula IX. Llistat d'anticossos utilitzats. DUMC, Duke University Medical Center; HCPB, Hospital Clínic Provincial de Barcelona; LIR, Laboratory for Immunological Research; RFH, Royal Free Hospital; IGR, Institute Gustave Roussy.

especificitat	anticòs	procedència	hoste	isotip
Bcl-2	Bcl-2-100	Zymed Laboratories, San Fco, CA	ratolí	IgG1
CCL21	6Ckine	R&D Systems, MN, USA	cabra	IgG
CCR7	2H4	Pharmingen, San Diego, USA	ratolí	IgM
CD19	A3B1	R Vilella, HCPB, BCN	ratolí	IgG2a
CD19-FITC	Leu-12	Becton Dickinson, San José, USA	ratolí	IgG1
CD19-RPECy5	HD37	Dako, Glostrup, Dinamarca	ratolí	IgG2a
CD154	CD154	De-Cheng Shen, Xina	ratolí	IgM
CD20	93-1B3	R Vilella, HCPB, BCN	ratolí	IgG1
CD20	L26	Dako, Glostrup, Dinamarca	ratolí	IgG
CD21L	7D6	P Garrone, LIR, S-P, França	ratolí	IgG1
CD23	Leu-10	Becton Dickinson, San José, USA	ratolí	IgG1
CD23-RPE	M-L233	Labgen	ratolí	IgG1
CD3	UCHT1	P Beverley, Londres, UK	ratolí	IgG1
CD3	Cris-7	R Vilella, HCPB, BCN	ratolí	IgG2a
CD3-PerCP	UCHT1	Pharmingen, San Diego, USA	ratolí	
CD38	RM3A5	R Vilella, HCPB, BCN	ratolí	IgM
CD4		M Bofill, RFH, Londres	ratolí	IgG
CD40	HB14	TF Tedder, DUMC, Durham, NC	ratolí	IgG1
CD45RA-FITC, -PE		Becton Dickinson, San José, USA	ratolí	IgG1
CD45RO-FITC, -PE		Becton Dickinson, San José, USA	ratolí	IgG1
CD5	33-1C6	R Vilella, HCPB, BCN	ratolí	IgG2a
CD5-PE	CD5	Caltag	ratolí	IgG1
CD50	101-1D2	R Vilella, HCPB, BCN	ratolí	IgG1
CD50	152-2D11	R Vilella, HCPB, BCN	ratolí	IgG1
CD54	RM4A3	R Vilella, HCPB, BCN	ratolí	IgG
CD71	120-2A3	R Vilella, HCPB, BCN	ratolí	IgG1
CD77	38.13	J Wiels, IGR, França	rata	IgM
CD79	HM47	R Vilella, HCPB, BCN	ratolí	IgG
CD8		M Bofill, RFH, Londres	ratolí	
CD83	HB15	TF Tedder, DUMC, Durham, NC	ratolí	IgG2b
CD83-PE	HB15	Immunotech, Coulter, Florida, USA	ratolí	IgG2b
CD95	DX2	Pharmingen, San Diego, USA	ratolí	IgG1
CD95L	NOK-1	Pharmingen, San Diego, USA	ratolí	IgG
citoqueratina 8-18		Novocastra Labs, Newcastle, UK		
CLA-1	HECA-452	Pharmingen, San Diego, USA	rata	IgM
CXCL12	SDF-1 α	R&D Systems	cabra	IgG
CXCL13	BLC/BCA-1	R&D Systems	cabra	IgG
CXCR4	12G5	R&D Systems	ratolí	IgG2a
CXCR5	51.505.111	R&D Systems	ratolí	IgG2b
Cyclins	Ki-67	Boehringer Mannheim	ratolí	IgG1
HLA classe I	W6/32	ATCC	ratolí	IgG
HLA classe II	Edu-1	R Vilella, HCPB, BCN	ratolí	IgG2b
HLA classe II	RFDR2	G. Janossy, RFH, Londres, UK	ratolí	IgG
HLA-DR	L243	Becton Dickinson, San José, USA		IgG
hIgD-FITC	hIgD	Caltag	cabra	
hIgG-TRITC	hIgG	Southern Biotech	ratolí	
hIgM	A1B1	R Vilella, HCPB, BCN	ratolí	IgG
hIgs totals-TRITC	hIgtotal	Southern	cabra	Ig
PNA-FITC	NO	Sigma	cacahuets	NO
TPO	NO	-	humà	IgGAM
TPO	Mic-18	P Carayon, Marsella, França	ratolí	IgG

3.9.2 Protocols de tinció

3.9.2.1 Seccions de criòstat

Es duen a terme sobre seccions de congelació de 4µm de gruix (Frigocut, Reichert-Jung, Heidelberg, Alemanya) dipositades sobre portaobjectes i assecades durant 30min a T.A. En alguns casos les seccions es poden mantenir a -70°C fins que s'utilitzen i abans de començar la tinció, els portats es tornen a assecar durant 20-30min més a T.A.

Tinció indirecta simple i doble:

1/ En funció de l'antigen a detectar, algunes seccions es fixen prèviament amb paraformaldèhid (PFA) al 4% durant 15min en fred (CXCL12 i CXCL13) o amb acetona freda (CCL21).

2/ Després de rentar 15min amb PBS+1% BSA, les seccions s'incuben de 30min a 1h a T.A. amb 50µl d'anticòs primari en cambra humida i fosca. En algunes ocasions en que l'antigen és soluble, la incubació amb el primer anticòs es fa durant tota la nit a 4°C.

3/ Es fan dos rentats de 5min amb PBS que conté 0,01% BSA en un agitador orbital, s'elimina la resta de tampó i s'afegeixen 50µl d'anticòs secundari específic d'isotip conjugat amb el fluorocrom (FITC o Rodamina, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) (50µg/ml) o enzim (fosfatasa alcalina, AP o peroxidasa, PO) corresponent durant 30-60min. Posteriorment es repeteixen els rentats amb PBS al 0,01% BSA.

Quan les tincions són dobles, es repeteixen els passos b-c/ utilitzant un secundari conjugat amb un fluorocrom o enzim alternatiu. En els casos en que és necessària una amplificació del senyal, el segon anticòs s'utilitza conjugat amb biotina, s'inclouen dos rentats i una incubació de 20min a T.A. amb estreptavidina-FITC, -Rho, -PO o -AP.

3.9.2.3 Seccions de parafina

1/ Desparafinat i rehidratació gradual. Les seccions de 5µm se submergeixen en xilol durant 20min i en successius banys d'alcohols amb concentracions creixents d'aigua (alcohol absolut, alcohol 90%, alcohol 70%, alcohol 50%) durant 10min cadascun. Un cop rehidratats se submergeixen en PBS 10min i s'inicia la tinció.

2/ Tinció. Se segueixen els mateixos passos que a l'apartat 3.9.2.1 eliminant la fixació de la secció ja que prèviament ha estat fixat el teixit.

3.9.2.3 Protocols de revelat, muntatge i observació

Quan l'anticòs secundari usat es troba conjugat amb un enzim, s'incuben les seccions amb 50-100µl dels substractes adequats: DMBA+MBTH+H₂O₂ (Sigma) per la peroxidasa i Fast-Red (Sigma) per la fosfatasa alcalina. La reacció colorimètrica s'atura submergint la preparació en PBS i la secció es contratenyeix per tal d'evidenciar l'estructura tisular. Finalment les preparacions es munten en medi de muntatge que conté glicerol tamponat Fluoprep (BioMerieux SA, Marcy l'Etoile, França) si es tracta d'una secció en la que s'ha d'observar la fluorescència i se segellen o es munten amb DPX (Merck) si s'han d'observar a la llum visible.

Les imatges s'examinen i s'adquireixen en un microscopi Axioplan II (Zeiss, Wetzlar, Alemanya) utilitzant llum UV o transmissió, equipat amb una videocàmera i s'analitzen amb el programa Openlab® software (Improvision Ltd, UK). Per tal de comparar millor la distribució de determinades molècules en tincions d'immunofluorescència dobles, les microfotografies de fluorescència verda i vermella s'han digitalitzat i superposat. Altres imatges han estat deconvolucionades en un sistema de microscòpia confocal (Openlab® software) per millorar la resolució. Als peus de figura de l'apartat de resultats s'indica el processament que ha rebut cada imatge i s'inclou una barra groga indicativa d'una mida de 100µm.

3.9.2.4 Cèl·lules en suspensió

S'aplica a PBLs, ITLs, cèl·lules fol·liculars tiroïdals, clons de cèl·lules B transformades amb el virus d'Epstein barr, clons de cèl·lules B fusionades amb F3B6 i cèl·lules transfectants. L'adquisició i l'anàlisi es realitzen en un citòmetre de flux FACScan equipat amb el programa Cellquest (Becton Dickinson, San José, USA).

3.9.2.4.1 Tinció de superfície. Immunofluorescència directa o indirecta

1/ Es ressuspenen entre 10^5 i 3×10^6 cèl·lules per tub en 50µl d'anticòs primari o d'anticòs (o barreja d'anticòs) directament marcat(s) (FITC, PE o PerCP) a la dilució adient i s'incuben 30min a 4°C. S'elimina l'excés d'anticòs i les restes cel·lulars amb dues centrifugacions a 500g durant 5min.

2/ Si la tinció és directa, es ressuspen el pellet cel·lular amb 200µl de PBS i s'analitza directament amb el citòmetre de flux. Si la tinció és indirecta, les cèl·lules es ressuspenen amb 50µl d'anticòs secundari conjugat amb fluorocrom o amb biotina i s'incuben 30min a 4°C a la foscor. Passat aquest temps es fan dos rentats amb PBS, es ressuspenen en PBS i s'analitzen.

Quan es tracta de tenyir amb una barreja d'anticòs, alguns del quals són directament marcats i altres no, les cèl·lules s'incuben en primer lloc amb el primari sense conjugat. Després de dos rentats, s'incuben durant 30min a 4°C amb 50µl d'anticòs secundari conjugat i es tornen a rentar. Un cop eliminat l'excés d'anticòs no incorporat, el botó cel·lular s'incuba durant 10min amb 50µl de sèrum normal de ratolí per bloquejar llocs remanents. Els secundaris s'afegeixen diluïts en sèrum normal de ratolí sense rentar. Un cop finalitzada la incubació de 30min a 4°C, es renta com s'ha descrit prèviament, es ressuspen en PBS i s'analitza al citòmetre.

3.9.2.4.2 Tinció de citoplasma

Les cèl·lules (de 2×10^6 a 5×10^6 /tub) es renten amb tampó de PBS+1%FCS i es fixen amb paraformaldehid al 4% en PBS durant 20min a 4°C. Després de dos rentats de 10min amb PBS al 2% FCS, s'incuben amb l'anticòs primari durant 30min en fred. Les cèl·lules es renten i s'incuben 30min amb 50µl de l'anticòs secundari diluït en PBS. Un cop eliminat l'excés d'anticòs no incorporat mitjançant dos rentats, les cèl·lules es ressuspenen en PBS i s'analitzen al citofluorímetre.

3.10 IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DELS CENTRES GERMINALS

La quantitat de mostra de tiroïdes obtinguda (en pes) és variable, però es calcula que la mitjana del pes dels blocs és d'aprox. 5 grams. Els blocs s'han cribat sistemàticament per detectar la presència de fol·licles limfoides observant 1 de cada 10 seccions de criòstat consecutives tenyides amb hematoxilina i eosina (H/E). Un cop detectats, la seva presència s'ha confirmat per immunofluorescència (IFL) en tinció específica contra aglutinina de cacauet (PNA-FITC, *peanut agglutinin*) i anti-IgD-FITC (en seccions de criòstat) o amb anti-CD20 (si són seccions de blocs fixats en formalina).

La caracterització fenotípica s'ha fet en seccions consecutives de 4µm (de 10 a 80 seccions, en funció de la mida del LF) en les que s'han estudiat per IFL directa o indirecta marcadors fenotípics, molècules d'adhesió, marcadors relacionats amb funció cel·lular (proliferació, reordenaments i d'altres), quimiocines i els corresponents receptors. Els anticòs utilitzats i els protocols de tinció s'han especificat als apartats 3.9.1 i 3.9.2.

3.11 DETECCIÓ DE CÈL·LULES B I PLASMÀTIQUES ESPECÍFIQUES PER Tg I TPO

S'ha dut a terme sobre seccions de criòstat i en tincions de suspensió de limfòcits intratiroïdals.

1/ *Incubació amb l'antigen.* Els portats amb les seccions s'assequen durant 30min a T.A. i s'incuben amb 100µl de PBS que conté: TPO-Bio a 10µg/ml o Tg-Bio a 100µg/ml o la combinació d'ambdós antigens.

2/ *Detecció de l'antigen.* Després de rentar 2 cops de 15min amb PBS+1% BSA en agitació forta, les seccions s'incuben durant 45min a T.A. amb 50µl d'estreptavidina-FITC en cambra humida i fosca.

3/ *Detecció de les cèl·lules B i plasmàtiques.* Es repeteixen els dos rentats i s'afegeixen 50µl d'anticòs secundari contra-Igs totals humanes-TRITC, contra IgGs-TRITC o contra IgMs-TRITC. S'incuba durant 1 hora a T.A., es repeteixen els rentats de l'anterior apartat i es munten les preparacions en glicerol tamponat.

Per tal de demostrar l'especificitat del reconeixement antigen/anticòs, en la tinció s'inclouen preparacions en les que s'ha fet una incubació prèvia amb 1mg/ml de Tg o TPO no conjugats amb biotina com a bloqueig. De cada secció, a més d'estudiar la distribució de les cèl·lules que han reconegut antigen, es fa un recompte del nombre de fol·licles limfoides en els que es detecten cèl·lules tenyides positivament per Tg o TPO i també un recompte aproximat dels percentatge de cèl·lules positives en cada fol·licle limfoide.

3.12 MORFOMETRIA DELS FOL·LICLES LIMFOIDES INTRATIROIÐALS

Per tal d'estudiar l'estructura dels fol·licles limfoides intratiroiðals, s'han obtingut seccions de congelació i de parafina tenyides amb H/E de 57 fol·licles limfoides pertanyents a 22 glàndules, de les quals 20 LFs pertanyen a malalts amb Graves-Basedow i 37 a malalts amb tiroïditis de Hashimoto. L'estructura ha estat comparada amb la dels fol·licles limfoides presents en alguns òrgans limfoides secundaris (39 LFs presents en nòduls limfàtics reactius i 26 d'amígdala palatina). De cadascun s'ha mesurat l'àrea total del fol·licle limfoide (LF), l'àrea ocupada pel mantell fol·licular (MZ), l'àrea ocupada pel centre germinal (GC), el perímetre del LF i els diàmetres màxim i mínim, utilitzant el programa de morfometria d'Openlab. Els LFs a estudiar s'han triat a l'atzar.

3.13 SEPARACIÓ CEL·LULAR AMB CITÒMETRE DE FLUXE

S'ha utilitzat per seleccionar els clons de cèl·lules transfectants que expressen els nivells més alts del domini extracel·lular del TSHR (300.19TSHR i DAP3TSHR) i també per separar limfòcits B i limfòcits T (tant de sang perifèrica com intratiroiðals) per tal de ser usats en els experiments de quimiotaxi en gradients de CXCL12.

Els clons dels transfectants se seleccionen utilitzant antisèrums policlonals humans amb títols alts d'autoanticossos contra el TSHR i es detecten amb un anticòs anti-Ig(G+A+M) humanes-FITC.

Les cèl·lules T i B se seleccionen per tinció específica contra les molècules CD3 i CD19 respectivament directament conjugades amb -FITC i -PE amb un FACSVantage (Becton-Dickinson) i la puresa de les cèl·lules obtingudes oscil·la entre un 94 i 99%.

3.14 ELISA

3.14.1 ELISA per detecció d'Igs en sobrenedants

1/ *Sensibilització de la placa i bloqueig.* S'ha dissenyat un ELISA en el que se sensibilitzen els pouets de la placa amb 5µg/ml d'anticòs de conill anti-Ig(G+A+M) humanes (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, USA) diluït en PBS durant tota la nit a T.A. Després de rentar dos cops amb PBS/0,5% tween durant 7min cada rentat, es bloquegen els llocs remanents durant 2h amb PBS que conté un 2% (w/v) d'albúmina sèrica bovina (BSA; Sigma).

2/ Incubació sobrenedants i recta patró. Es renten els pous 4 cops i s'aplica per duplicat 50µl del sobrenedant de les línies o clons a testar. Com a recta patró es fa servir una barreja d'Igs humanes (9,760µg/ml IgGs; 2,060µg/ml IgAs; 0,730µg/ml IgMs; Dade Behring, Deerfield, USA) i com a controls se sembren 2 pous amb medi de cultiu complet i dos més amb PBS+BSA+sèrum normal de conill. Després d'incubar 4 h a T.A. es renten 4 cops amb PBS/tween.

3/ Reconeixement pel segon anticòs i revelat. S'utilitza un anticòs de conill contra Igs humanes biotinat (Jackson) ressuspès en PBS que conté un 2% BSA i un 5% de sèrum normal de conill i s'incuba durant 1 hora a T.A. Després de 4 rentats de 5min cadascun s'incuba amb estreptavidina-PO (Southern Biotechnology, Birmingham, U.S.A.) ressuspesa en PBS/BSA 2% 20min i es tornen a rentar 4 cops. La reacció es revela s'afegint el substrate comercial TMB (Sigma) i es llegeix l'absorvència a 600nm. La reacció s'atura afegint H₂SO₄ 2N i es torna a llegir l'absorvència a 450nm.

3.14.2 ELISA per quantificació de Tg i de TPO en sobrenedants

S'utilitza una modificació dels kits comercials d'Immunowell en els que les plaques d'ELISA han estat prèviament sensibilitzades amb antigen i bloquejades.

1/ Incubació sobrenedants i recta patró. S'atemperen les plaques a T.A. durant 20min i s'apliquen a cada pou i per duplicat 50µl del sobrenedant de les línies o clons a testar. Com a recta patró es fa servir dilucions seriades 1/2 d'un sèrum humà (del mateix kit) amb anticossos anti-Tg o anti-TPO positius a concentració coneguda i com a controls negatius se sembren 2 pous amb medi de cultiu d'hibridomes complet, dos més amb PBS+BSA+sèrum normal de conill i 2 pous més amb el control negatiu del kit comercial. Després d'incubar tota la nit a T.A., es renten 3 cops de 5min amb PBS/0,05% tween.

2/ Reconeixement pel segon anticòs i revelat. S'utilitzen 50µl d'un anticòs (1/10.000) de conill contra Igs(G+A+M) humanes conjugat amb AP (Jackson) ressuspès en PBS que conté un 2% BSA i un 5% de sèrum normal de conill i s'incuba durant 1 hora a T.A. Després de 3 rentats de 5min, la reacció es revela s'afegint el substrate comercial TMB i es llegeix l'absorvència a 600nm. La reacció s'atura afegint 50µl de H₂SO₄ 2N i es torna a llegir l'absorvència a 450nm.

3.14.3 ELISA per quantificació de CXCL12 en sobrenedants

El disseny d'un ELISA per a la determinació dels nivells de CXCL12 en el sobrenedant de cultius de cèl·lules epitelials tiroïdals i de la línia cel·lular tiroïdals HT93 s'ha fet amb la col·laboració de la Dra. T Gallart (Servei d'Immunologia, l'Hospital Clínic de Barcelona).

1/ Sensibilització de la placa i bloqueig. La placa se sensibilitza amb 100ng/ml d'anticòs contra el CXCL12α humà (R&D, Minneapolis, Minnesota) diluït en PBS durant 2 hores a 4°C. Després de rentar la placa dos cops amb PBS/tween 0,05% durant 7min cada rentat, es bloqueja durant tota la nit a 4°C en una solució de PBS amb un 2,5% de BSA.

2/ Incubació sobrenedants i recta patró. S'elimina l'excés de solució de bloqueig rentant tres cops amb PBS/tween 0,05% durant 7min cada rentat i s'apliquen els sobrenedants dels cultius cel·lulars a raó de 50µl/pouet. La recta patró per la quantificació de CXCL12 es fa per dilucions seriades a la meitat de CXCL12α recombinant (PeproTech, Rocky Hill, New Jersey) d'entre 200 i 0,39ng/ml. Les mostres i la recta patró s'incuben a T.A. 4 hores (o tota la nit, si s'escau).

3/ Reconeixement pel segon anticòs i revelat. El CXCL12α soluble es detecta amb un anticòs anti-CXCL12-biotina humà després d'incubar 1 hora a T.A. L'ELISA es revela després de fer dos rentats, incubar 20min a temperatura ambient amb estreptavidina-PO i afegir TMB com a substrate. Les concentracions finals es llegeixen a 450nm i a 600nm després d'aturar la reacció de revelat amb 50µl de 2N d'H₂SO₄.

3.15 ASSAJOS DE QUIMIOTAXI

Els assajos de transmigració s'han dut a terme en plaques de transwell de 5µm de mida de porus (Corning, Corning, NY), per triplicat o per duplicat en funció del nombre de cèl·lules disponibles. S'han utilitzat limfòcits T i B tant de sang perifèrica com intratiroidals, separats prèviament per separació cel·lular (sorting, apartat 3.13) en funció de l'expressió de CD3 i CD19 respectivament.

3.15.1 Quimiotaxi amb limfòcits intratiroidals

S'ha dut a terme per tal de demostrar la funcionalitat dels receptors de quimiocines CXCR4 presents en els limfòcits T i B que infiltren les glàndules amb autoimmunitat tiroïdal. El protocol experimental ha estat el següent: s'han dipositat de 3×10^4 a 10^5 cèl·lules CD3⁺ o CD19⁺ ressuspeses en 100µl de medi complet amb un 2% de sèrum boví fetal a la cambra superior de la placa de transwell. A la cambra inferior s'hi ha dipositat medi de cultiu amb la mateixa concentració de sèrum boví fetal però que conté concentracions variables de CXCL12 humà (R&D Systems) de 10ng/ml fins a 1000ng/ml. Després d'incubació a 37°C en una atmosfera amb 5% CO₂ durant 4 hores, s'han recuperat les cèl·lules migrades a la cambra inferior i s'han comptat el nombre de cèl·lules utilitzant esferes magnètiques (Flow-Count™ Fluorospheres; Coulter, Miami, FL) seguint les indicacions d'ús. Els experiments s'han repetit tres cops i en cadascun d'ells s'ha inclòs un duplicat en el que no s'ha afegit CXCL12 al medi per tal de calcular la migració espontània i un duplicat en el que les cèl·lules han estat prèviament incubades durant 30min amb 20µg/ml d'anticòs anti-CXCR4 (12G5) per demostrar l'especificitat de la migració via CXCL12.

3.15.2 Quimiotaxi amb limfòcits de sang perifèrica

La finalitat d'aquest assaig ha estat demostrar la capacitat de secreció de CXCL12 per part dels tiròcits (i de la línia cel·lular HT93) en cultiu estimulats amb citocines pro-inflamatòries. Per a això, l'única variació respecte el protocol descrit anteriorment és que la cambra inferior de la placa de transwell s'ha omplert amb el sobrenedant del tiròcits o d'HT93 estimulats amb IL1β, IFNγ o TNFα (a 200, 500 o 500IU/ml respectivament). Donat que la cinètica de producció de CXCL12 per part dels tiròcits i de les HT93 és molt similar i el pic de producció de la quimiocina se situa al voltant de les 6 hores d'estímul, els assajos de quimiotaxi s'han dut a terme amb aquests sobrenedants.

En ambdós protocols, els índex de migració s'ha calculat com a quocient entre la mitjana de les cèl·lules que han migrat en cada condició i la mitjana de cèl·lules migrades espontàniament.

3.16 REACCIÓ DE TUNEL (TdT-MEDIATED DUTP NICK-END LABELING ASSAY)

És una tècnica que permet la detecció de cèl·lules apoptòtiques en fase avançada de mort cel·lular programada i que permet distingir aquest fenomen de la necrosi. Es basa en una reacció enzimàtica mediada per l'enzim TdT, que incorpora nucleòtids marcats en l'extrem 3'-hidroxiterminal del DNA genòmic. S'ha realitzat sobre seccions de criòstat de 4µm i de parafina de tiroïdes que contenen centres germinals usant un kit comercial (*In situ cell death detection*; Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanya) i sobre seccions de timus i d'amígdala humans utilitzats com a substrat de referència de la reacció.

3.16.1 Seccions fixades i incloses en parafina. Desparafinat i rehidratació

Prèviament a la reacció d'hibridació, les seccions se submergeixen en xilol i en successius banys d'alcohols amb concentracions creixents d'aigua seguint el mateix protocol que a

l'apartat 3.9.2.2. Un cop hidratats, se submergeixen en PBS 10min i s'incuben en 200 μ l de PBS que conté 20 μ g/ml de proteïnasa K (Sigma) de 5 a 15min (segons el substrat) a T.A. per tal d'eliminar proteïnes i enzims que puguin interferir a la reacció.

3.16.2 Seccions de criostat. Fixació i permeabilització

Les seccions de 4 μ m s'assequen durant 30min, es fixen en un bany de PBS/paraformaldehid al 4% a 4 $^{\circ}$ C durant 20min i es renten en agitació intensa durant 20min a T.A. en PBS. La permeabilització es fa amb una solució que conté 0,1% de Tritó X-100/ 0,1% de citrat trisòdic durant 6min en gel i posteriorment s'elimina l'excés de solució rentant dos vegades de 10min en PBS.

3.16.3 Reacció TUNEL, revelat i contratinció

La reacció d'hibridació s'ha fet a 37 $^{\circ}$ C en cambra humida durant 4 hores seguint les instruccions del fabricant en un volum final de 50 μ l que conté la concentració adequada de TdT i dNTPs, un dels quals s'ha substituït per dUTP-FITC. Després de dos rentats de 10min en agitació intensa a T.A. en PBS, els dUTP-FITC incorporats s'han detectat per incubació durant 30min amb un anticòrpus contra FITC conjugat amb fosfatasa alcalina. El substracte cromogènic, compost per Tris-CIH 0,1M pH 8,2, que conté naftol fosfat (Sigma) al 0,02% (w/v)/ 0,2% dietilformamida (v/v) es barreja amb fast-red (Sigma) al 0,1% (w/v) i es filtra directament sobre les seccions. Quan la reacció colorimètrica ha tingut lloc (entre 5 i 15min), es renten les seccions durant 5min en PBS i es contratenyeixen en hematoxilina de Mayer (Merck&Co., U.S.A) durant 30 segons. S'elimina l'excés d'hematoxilina amb aigua que contingui ions i les seccions se submergeixen en PBS 3min fins a muntar-los en medi Fluoprep i observar-los al microscopi amb llum visible. Els controls negatius inclouen tots els apartats anteriors excepte l'addició de TdT a la reacció d'hibridació.

S'han considerat cèl·lules apoptòtiques aquelles que presenten un nucli condensat picnòtic amb tinció vermella restringida al nucli i citoplasma blau d'aspecte intacte. S'ha fet un recompte dels nuclis apoptòtics utilitzant el programa Openlab, i s'ha estudiat la seva distribució en funció de la localització al mantell fol·licular (MZ), al centre germinal (GC) o a l'exterior del fol·licle limfoide. Els resultats s'expressen com a nombre de nuclis positius per mm² i s'han comparat amb els detectats als òrgans limfàtics utilitzats com a referència.

3.17 OBTENCIÓ DE DNA GENÒMIC

3.17.1 Preparació del DNA genòmic

El DNA genòmic s'ha preparat a partir de botons cel·lulars congelats en N₂ i conservats a -70 $^{\circ}$ C o de cèl·lules en cultiu. El mètode usat és una modificació del protocol de "salting out" que consisteix a lliurar les cèl·lules en solució TEN 8 (0,1M NaCl, 10mM EDTA pH 8,0, 20mM Tris pH 7,5, 12u/mg proteïnasa K) a raó de 500 μ l de solució per cada 10⁷ cèl·lules. S'incuba de 2 a 3 hores a 55-60 $^{\circ}$ C fins que el lisat quedi homogeni i es desproteïnitza amb KAc 1,5M agitant vigorosament durant 15 segons. S'afegeix 1 volum de cloroform-isoamilalcohol (49:1), es barreja per inversió, se centrifuga (2500rpm 15min a 4 $^{\circ}$ C) i es recupera la fase aquosa on es troba el DNA. Aquest es precipita amb 2-2,5 volums d'etanol absolut barrejant per inversió fins que s'observa la malla de DNA que es pot recuperar, rentar amb etanol al 70% fred i recuperar per centrifugació (2500rpm 5min a 4 $^{\circ}$ C). S'asseca i es ressuspèn amb un volum adequat d'H₂O autoclavada o de TE (10mM Tris, 1mM EDTA). Les mostres de DNA es conserven a -70 $^{\circ}$ C i se'n separa una petita quantitat per calcular la concentració, puresa i integritat.

3.17.2 Càlcul de la concentració i de la puresa i integritat del DNA

La *concentració* i la *puresa* de les preparacions es determina per espectrofotometria amb lectura a 230nm, 260nm, 280nm i 320nm d'una dilució del DNA total obtingut. La concentració (en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) es calcula amb la fórmula: $(A_{260} \times 0,064 - A_{280} \times 0,031) \times$ factor de dilució. El quocient A_{230}/A_{260} s'utilitza com a índex de lectura de sals i es considera correcte quan està entre 0,4 i 0,6. La relació $A_{260}/A_{280} = a$ 0,8 o superior es fa servir com indicador de la puresa adequada i la lectura a A_{320} com a presència d'anells aromàtics que interfereixen la lectura a 260nm. La *integritat* del DNA es comprova mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa al 0,8% i es considera no degradat quan la banda és de pes molecular alt i no s'observa bandejat tènue de fons i de pes molecular inferior o la imatge en escala típica de les cèl·lules en apoptosi.

3.18 OBTENCIÓ D'RNA TOTAL I RETROTRANSCRIPCIÓ

Els RNAs totals s'han obtingut a partir de diferents substractes cel·lulars (botons de cultius cel·lulars primaris o de línies cel·lulars transformades congelats, monocapes en cultiu, blocs de teixit de congelació, microdisseccions de teixit) que han condicionat l'homogenització i tipus de lisi inicials.

3.18.1 Microdissecció dels fol·licles limfoides tiroïdals

Per tal d'estudiar l'expressió de molècules directament relacionades amb l'estructuració/funció dels fol·licles limfoides canònics (RAG1 i RAG2) s'ha fet una extracció d'RNA restringida a aquestes estructures mitjançant una microdissecció de la zona d'interès. Així, a partir de la identificació dels LFs en una secció de congelació de tiroïdes de $4\mu\text{m}$ tenyida amb H/E, s'han obtingut entre 4 i 10 seccions consecutives més de $20\mu\text{m}$ sense tenyir en les que s'han escindit els LFs sota un estereomicroscopi (SV8, Zeiss). Les seccions de tiroïdes en les que no s'han identificat fol·licles limfoides ectòpics s'han utilitzat com a control negatiu i s'han processat seguint el mateix protocol.

3.18.2 Purificació de l'RNA total

El protocol és una modificació que té com a base el mètode de Chomczynsky⁴⁶².

Els botons cel·lulars congelats (de 10^5 a 10^6 cèl·lules sense descongelar) es ressuspenen amb una barreja 1:1 de solució desnaturalitzant (isotiocianat de guanidina 4M/ acetat sòdic 50mM pH 4, 0,5% N-lauril sarcosina sòdica i 4% de 2 β -mercaptoetanol 100mM) i fenol àcid saturat amb aigua a una relació aproximada de 2ml de solució per 10^7 cèl·lules. S'homogenitzen amb pipeta i es deixen 5min en gel per dissociar els complexos nucleoproteics. S'hi afegixen 0,2 volums de cloroform-isoamilalcohol (49:1) i es barreja per inversió durant 30 segons. S'incuba 15min en gel i tot seguit se centrifuga ($10000g$ 30min a 4°C) i es recupera la fase aquosa on es troba l'RNA. Aquest es precipita amb 1 volum d'isopropanol durant 4 hores a -20°C (o alternativament durant 1 hora a -70°C) i s'obté l'RNA centrifugant a $10000g$ a 4°C durant 30min. El pellet d'RNA es renta tres vegades amb etanol 75% fred, s'asseca i es ressuspen amb un volum adequat d' H_2O -DEPC (H_2O destil·lada tractada durant una nit amb dietilpirocarbonat al 0,1% (Sigma) a 37°C i autoclavada). Les mostres d'RNA es conserven a -70°C . Quan la quantitat inicial de cèl·lules per l'extracció no supera 10^6 cèl·lules, en la precipitació s'afegixen $0,4 \mu\text{mol}/\text{L}$ de glicogen (Boehringer-Mannheim).

Quan la mostra prové de monocapes de cèl·lules en cultiu (primari o línies transformades) s'han introduït diverses modificacions: 1/ la solució desnaturalitzant s'afegix a la monocapa (prèviament lliure de sèrum boví fetal) a raó de 2ml per 75mm^2 després d'haver-la rentat amb PBS. 2/ El protocol d'extracció és el mateix però el pellet d'RNA es ressuspen amb 0,5 volums del volum inicial de solució desnaturalitzant

i es fa una re-extracció d'RNA. Es precipita amb 1 volum d'isopropanol a -20°C durant 16 hores i es recupera el pellet per centrifugació.

Quan l'extracció d'RNA es fa a partir de *blocs de teixit congelat* d'aproximadament $0,5\text{cm}^3$ de volum: 1/ el volum de solució desnaturalitzant s'augmenta a $4\text{ml}/\text{cm}^3$ de teixit i s'homogenitza en un homogenitzador elèctric en fred. 2/ Es fa una segona purificació de l'RNA ressuspenent-lo per segon cop amb 1ml de solució desnaturalitzant i reprecipitant-lo com s'ha descrit en l'anterior apartat.

3.18.3 Càlcul de la concentració i de la puresa i la integritat de l'RNA

La *concentració* i la *puresa* de les preparacions es determina per espectrofotometria amb lectura a 230nm, 260nm, 280nm i 320nm d'una dilució de l'RNA obtingut. La concentració (en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) es calcula amb la fórmula: $(A_{260} \times 0,045 - A_{280} \times 0,031) \times$ factor de dilució. El quocient A_{230}/A_{260} s'utilitza com a índex de lectura de sals i es considera correcte quan està entre 0,4 i 0,6. La relació $A_{260}/A_{280}=2$ o superior es fa servir com a indicador de la puresa i la lectura a A_{320} com a presència d'anells aromàtics que interfereixen la lectura a 260nm.

La *integritat* de l'RNA es comprova mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa a l'1% en el que la mostra s'ha ressuspenent en tampó desnaturalitzant (50% formamida, 5,4% formaldehid, MOPS 1x), s'ha escalfat a 68°C durant 10min i s'ha refredat fins a 4°C immediatament. L'RNA es visualitza a la llum UV per tinció amb bromur d'etidi utilitzant RNA ribosomal d'*E.coli* (Boehringer Mannheim) com a control de qualitat. Es considera que l'RNA està íntegre quan les bandes corresponents als RNAs ribosòmics presenten aproximadament una intensitat 2/1 en el ratio 28S/18S.

3.18.4 Eliminació del DNA genòmic

S'ha fet en totes les mostres, donat que en un cas els encebadors utilitzats en l'amplificació posterior per PCR no s'han pogut dissenyar en diferents exons.

Cada $10\mu\text{g}$ de mostra s'han tractat amb una solució de 40 μl de Dnasa I (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suècia), 20U RNAsin, 5mM DTT, tampó 1x (50mM Tris-HCl, 75mM KCl, 3mM MgCl_2 pH 8,3; Life Technologies) durant 30min a 37°C en un bany. L'RNA s'ha precipitat afegint un 10% d'acetat sòdic 3M, 2,5 volums d'etanol absolut i $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$ glicogen (Boehringer Mannheim) durant 1 hora a -20°C . L'RNA obtingut per centrifugació a 10000g per 30min a 4°C s'ha rentat amb etanol 75% i s'ha ressuspenent en H_2O -DEPC. Després del tractament es torna a quantificar i comprovar la integritat de l'RNA.

3.18.5 Retrotranscripció

Després de desnaturalitzar 0,2-2 μg d'RNA total i 20pmol d'oligo-d(T)18 (Pharmacia Biotech) a 68°C durant 5-8 minuts, s'afegeixen 40U/ μl RNAsin (Clontech), 1mM de cada dNTP (Life Technologies), 200U/ml transcriptasa reversa MMLV i tampó 1x (10mM Tris-HCl pH 8,8, 5mM MgCl_2 , 50mM KCl, Tritó X-100 0,1%; Promega) en un volum final de 10-20 μl durant 1 hora a 42°C . La reacció s'atura elevant la temperatura durant 3min a 95°C . En algunes mostres, la retrotranscripció s'ha preparat utilitzant com a transcriptasa reversa la SuperScript II (a raó de 100U/ μg RNA) en 20 μl d'una solució que conté: 0,01M DTT, tampó 1x (50mM Tris-HCl pH 8,3, 75mM KCl, 3mM MgCl_2) i 1mM de cada dNTP.

En el cas de RAG2, la reacció de retrotranscripció s'ha fet amb el mateix encebador 3' que s'usa per la PCR.

El producte final de la retrotranscripció s'ha diluït de 5 a 50 vegades en H_2O o en TE i s'ha mantingut congelat.

3.19 PCR, HIBRIDACIÓ AMB OLIGOSONDES ESPECÍFIQUES I SEMIQUANTIFICACIÓ

Aquesta tècnica s'ha aplicat a la detecció del missatge per RAG1, RAG2, LT α , LT β , LT β R, IFN γ , GAPDH i CXCL12 (en els estudis d'inducció d'expressió de la quimiocina per estimulació amb citocines inflamatòries).

3.19.1 Encebadors i oligosondes

El disseny dels encebadors i de les oligosondes (*taula X*) (Sigma-Genosys) s'ha fet utilitzant el programa OLIGO, seguint els criteris que permetin una màxima especificitat a l'amplificació, en base a les seqüències dels corresponents cDNAs i DNAs publicats. Els primers per amplificar GAPDH han estat dissenyats pel Dr. O. Domínguez. Un cop dissenyats, s'han comprovat l'especificitat utilitzant la base de dades FASTA. En tots els casos, excepte RAG1, els encebadors "sense" i "antisense" s'han dissenyat en diferents exons per tal d'eliminar la possibilitat de coamplificar DNA genòmic.

3.19.2 Comprovació dels cDNAs i normalització

En els experiments en el que s'ha fet una semiquantificació dels amplimers obtinguts per PCR, per a poder comparar els resultats de l'amplificació entre les diferents mostres s'han normalitzat les quantitats de cDNA en funció de l'expressió del gen constituït per GAPDH (gliceraldehid fosfat deshidrogenasa) considerat de mitjana expressió. Així, s'han fet dilucions seriades de cada mostra de cDNA i se n'han usat 2 μ l de cada per amplificar amb primers específics per a GAPDH a 22 cicles (la reacció d'amplificació es troba a la fase exponencial). Per cada mostra s'ha escollit la dilució de cDNA que donava una intensitat de banda semblant a les altres mostres en un gel d'agarosa tenyit amb bromur d'etidi. La intensitat del senyal de les amplificacions dels gels s'ha quantificat mitjançant el programa Quantity-One en l'aparell Molecular Imager-FX (Bio-Rad, Hercules, USA).

3.19.3 Protocol de la reacció en cadena de la polimerasa

S'amplifiquen entre 1 i 5 μ l del cDNA d'interès en un volum final de 10-20 μ l en una solució que conté 200mM de cada dNTP, 1,5-2,5mM MgCl₂, tampó 1x (10mM Tris-HCl pH 9, 50mM KCl, Tritó X-100 al 0,1%), 0,3 μ mol/l de cada encebador i 300mU de polimerasa Dynazyme™ II (Finnzymes Inc., Oy, Finlàndia). La reacció es cobreix amb una gota d'oli mineral per evitar evaporacions. Els protocols d'amplificació estan inclosos a la *taula X*. Les reaccions s'han fet per duplicat i com a controls negatius s'han inclòs: a/ un tub amb tots els reactius excepte cDNA i b/ un altre tub en el que el cDNA s'ha substituït per RNA sense retrotranscriure.

3.19.4 Electroforesi i transferència

1/ Electroforesi. El producte de PCR, al qual s'afegeixen la quantitat necessària de tampó de blau de bromofenol 5x (10% Ficoll, 0,5% blau de bromofenol i 5M EDTA), es resol en un gel d'agarosa al 1-2,5% (en funció de la mida de l'amplímer) en tampó TAE 1x tenyit amb bromur d'etidi (0,4mg/ml) i s'analitza en un transil·luminador de llum ultraviolada.

2/ Transferència alcalina. Els amplimers de DNA es transfereixen per capil·laritat a una membrana de niló Hybond-N+ (Amersham, Buckinghamshire, UK) (prèviament equilibrada amb 20xSSC; (1xSSC: 0,15M NaCl, 0,013M citrat sòdic)) durant unes 16 hores, utilitzant com a tampó de transferència 0,4N NaOH quan la mida de l'amplímer és inferior a 450bp. Un cop finalitzada la transferència, la membrana de niló es renta 20min amb una quantitat abundant de 20xSSC en agitació. Per amplimers de mida més gran, el gel s'ha tractat amb una solució 20xSSC i s'ha transferit amb aquesta mateixa solució (augmenta la retenció a membrana) i posteriorment s'ha desnaturalitzat durant 5min amb una solució 1,5M NaCl i 0,5N NaOH. Després de neutralitzar la membrana amb 1,5M

NaCl, 0,5M Tris-HCl (pH 7.2) i 1mM EDTA pH 7, s'ha fixat el DNA per irradiació amb llum ultraviolada (Stratalinker, Stratagene, San Diego, USA). La membrana es conserva seca a T.A. o s'utilitza directament en la pre-hibridació.

3.19.4 Hibridació

3.19.4.1 Marcatge de les oligosondes

El marcatge terminal es fa durant 1 hora a 37°C utilitzant 15U de Polinucleòtid quinasa T4 (T4PNK, New England Biolabs, Beverly, USA) i la solució de marcatge que inclou 20pmols d'oligosonda, tampó (70mM Tris-HCl pH 7,6, 10mM MgCl₂, 5mM DTT) i 20μCi de (γ³²P)-dATP (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suècia). Els nucleòtids radioactius no incorporats s'eliminen utilitzant columnes MicroSpin™ (Pharmacia) i es quantifica la radioactivitat incorporada amb un comptador de radiació β.

3.19.4.2 Pre-hibridació, hibridació i rentats

1/ Prehibridació: La membrana equilibrada durant 10min amb un volum suficient de 2xSSC, es pre-hibrida amb una solució que conté 2xSSC, 5xDenhardt's, SDS 1% i ssDNA (8,5μl de DNA d'esperma de salmó a l'1%, 1,5ml HCl 9,5M deixat 5min a T.A. i desnaturalitzat amb 3,5μl NaOH 4M). La membrana es pre-hibrida a la temperatura d'hibridació (Th) adequada a cada oligosonda durant 1-4 hores en rotació suau contínua.

2/ Hibridació: s'afegeixen a la solució de pre-hibridació 10⁶cpm/ml de l'oligosonda marcada i la membrana es manté hibridant en agitació contínua i suau durant 4 hores a la mateixa temperatura.

3/ Rentats i quantificació: la sonda no incorporada s'elimina fent un rentat de 20min amb 2xSSC/1%SDS a T.A. en agitació enèrgica i un nombre variable de rentats de 20min des de la t^a d'hibridació (augmentant cada cop 2°C) amb 2xSSC /1%SDS fins que desapareix el senyal d'hibridació inespecífica del carril que conté el control negatiu. L'anàlisi de la membrana es fa per diferents mètodes: 1/ s'exposa a una pel·lícula radiogràfica Cronex x-ray film (DuPont) a -70°C durant un temps variable i l'autoradiografia s'analitza amb un escàner Scanjet II (Hewlett Packard) i el programa Scan Analysis (Biosoft, Cambridge, UK) o 2/ la membrana s'analitza directament en un Phosphorimager (Personal Molecular Image, BioRad) i el programa Quantity One.

Taula X. Seqüències dels encebadors i de les oligosondes usats, condicions d'amplificació per PCR de les diverses molècules d'estudi i mida de l'amplímer obtingut.

molècula	encebadors i oligosondes	PCR semiquantitativa	PCR a temps real	mida amplimer
GAPDH	sense 5'-TCTTCTTTTGGTCCGACAG-3' antisense 5'-AGCCCCAGCCTTCTCCA-3'	95°C 7' + 28 x (95°C 20''/ 68°C 15''/ 72°C 15'') + 72°C 10'	95°C 6'' + 35 x (94°C 15''/ 63°C 10''/ 72°C 15'') + 63-95°C	372bp
RAG1	sense 5'-ACTTTCCTTCATCCTGCTTA-3' antisense 5'-TTTTCTCCTCCTCTGGTTC-3' oligosonda 5'-CCCTTACTGTGAGACTGC-3'	95°C 7' + 35 x (94°C 30''/ 56°C 30''/ 72°C 40'') + 72°C 10'	ND	653bp
RAG2	sense 5'-GCCACAGTCATAGTGGCAGTCAG-3' antisense 5'-CAAAGGGAGTGAATCCCTGG-3' oligosonda 5'-GGACAAAAGGCTGGCCCAA-3'	95°C 7' + 30 x (94°C 30''/ 63°C 30''/ 72°C 40'') + 72°C 10'	ND	534bp
LTα	sense 5'-ACGGCGATGCGGCTGATG-3' antisense 5'-ACTGACCCACGGCTCCAC-3' oligosonda 5'-GGCGATGCGGCTGATG-3'	95°C 7' + 30 x (94°C 30''/ 70°C 15''/ 72°C 40'') + 72°C 7'	ND	534bp
LTβ	sense 5'-ATTACCCACCTCTCACCTCTCCCCT-3' antisense 5'-GCTGTTCTATCCCTTCCATTCTCT-3' oligosonda 5'-CCAGCCAGCCCCCA-3'	95°C 7' + 30 x (94°C 30''/ 68°C 15''/ 72°C 25'') + 72°C 7'	ND	306bp
LTβR	sense 5'-GGTGCCTCCGTGCGGTC-3' antisense 5'-GGGACGCGAGTGGTTGT-3' oligosonda 5'-TTTTCTGCTCCCTTGCA-3'	95°C 7' + 28 x (95°C 20''/ 68°C 15''/ 72°C 15'') + 72°C 10'	ND	412bp
IFNγ	sense 5'-GTTTGGGTTCTCTTGG-3' antisense 5'-ATTACTGGGATGCTCTT-3' oligosonda 5'-GGGAAGCGAAAAGGAGTCA-3'	95°C 7' + 30 x (94°C 30''/ 60°C 15''/ 72°C 20'') + 72°C 7'	ND	320bp
CXCL12	sense 5'-GTCGTGGTGTGCTGGTC-3' antisense 5'-CGGGCTACAATCTGCAGG-3' oligosonda 5'-TGCCTCAGCGACGGG-3'	95°C 7' + 30 x (95°C 20''/ 68°C 15''/ 72°C 15'') + 72°C 10'	95°C 6'' + 35 x (94°C 15''/ 60°C 7''/ 72°C 10'') + 65-95°C	155bp
CCL21	sense 5'-AAGGCAGTATGGAGGGG-3' antisense 5'-CTGGGCTGTTCTGTGG-3' oligosonda 5'-CTTGGTCTGCTTCCG-3'	95°C 7' + 35 x (95°C 20''/ 68°C 15''/ 72°C 15'') + 72°C 10'	95°C 6'' + 45 x (94°C 15''/ 63°C 10''/ 72°C 10'') + 68-95°C	238bp
CXCL13	sense 5'-CGACATCTGCTTCTC-3' antisense 5'-ACTCCATCATCTTTTG-3' oligosonda 5'-ACAACCATCCACGG-3'	95°C 7' + 35 x (95°C 20''/ 68°C 15''/ 72°C 15'') + 72°C 10'	95°C 6'' + 45 x (94°C 15''/ 52°C 7''/ 72°C 15'') + 60-95°C	255bp
CCL22	sense 5'-GAGACATACAGGACAGATGGAT-3' antisense 5'-ATGGAGATCAGGGAATGCAGAGAG-3'	95°C 7' + 30 x (95°C 20''/ 68°C 15''/ 72°C 15'') + 72°C 10'	95°C 6'' + 40 x (95°C 10''/ 68°C 5''/ 72°C 18'') + 63-95°C	238bp

3.20 PCR QUANTITATIVA EN TEMPS REAL

És una reacció d'amplificació convencional a la qual s'hi incorpora: a/ un agent intercal·lant que s'uneix inespecíficament al DNA de doble cadena, o b/ una oligosonda o sondes marcades amb fluorocroms. L'amplificació es monitoritza mentre té lloc la reacció mitjançant la detecció dels nivells de fluorescència incorporada en l'amplímer generat. L'agent intercal·lant que hem utilitzat en aquest treball és el SybrGreen 1, que té el seu espectre màxim d'absorció-emissió de fluorescència a 497nm i es llegeix al canal F1 de l'equip LightCycler™ (Roche, Mannheim, Germany). La monitorització contínua del procés fa que no només se n'observi el resultat final (quantitat total d'amplímer generat) sinó que també s'obté informació de la cinètica del procés. Aquesta cinètica descriu una corba sigmoïdal, que en funció de la quantitat inicial de motlle d'amplificació comença en cicles més primerencs o tardans. Així, per comparació amb un banc de dilucions d'estàndards de la mateixa molècula a concentracions conegudes, es pot conèixer el nombre de molècules en la mostra d'interès.

Aquesta aproximació s'ha aplicat a la comparació de l'expressió de CXCL12, CXCL13, CCL21 i CCL22 en les tiroïdes autoimmunitàries amb i sense fol·licles limfoides i amb les tiroïdes sense autoimmunitat.

3.20.1 Disseny dels oligonucleòtids

Donat que una de les restriccions en la quantificació del producte amplificat mitjançant incorporació de SybrGreen 1 és la mida de l'amplímer, els encebadors 5' i 3' s'han dissenyat en dos exons consecutius i a una distància no superior als 350bp i són els que es troben llistats a la *taula X*.

3.20.2 Generació dels estàndards

S'han obtingut a partir de timus i amígdala palatina humans i de PBLs en cultiu estimulats amb PHA. Els productes d'amplificació s'han generat mitjançant una PCR convencional a partir de 2µl de cDNA i s'han usat els mateixos encebadors i condicions d'amplificació llistats a la *taula X*. La quantificació del nombre de molècules s'ha fet en gel d'agarosa per dilució seriada de l'amplímer (entre 10¹ i 10⁷) i comparació amb les bandes de concentració conegudes de mida similar dels marcadors de pes molecular φX174 (Hae III) i φλ (Hind III) (Biotools, Edmonton, Canadà).

3.20.3 Reacció d'amplificació

Les reaccions d'amplificació dels estàndards i de les mostres a quantificar s'han dut a terme en una LightCycler (Roche) en 10µl de volum final utilitzant una barreja (master mix) que conté 4mM MgCl₂, 0,5-0,3mM cada encebador, 1µl de LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche) i 1-3µl del cDNA a quantificar (o de l'estàndard). Genèricament l'amplificació consta de quatre fases que s'especifiquen per a cada molècula a la *taula X*. Breument consten de:

- 1/ desnaturalització hot start a 95°C durant 10min;
- 2/ ciclat, que consisteix en 35-55 cicles de (desnaturalització a 95°C 30 segons, annealing a 55-65°C 10 segons i extensió a 72°C 15-20 segons);
- 3/ corva de melting que inclou (desnaturalització a 95°C 30 segons, annealing a 50-60°C 30 segons, augment ràpid a 70°C durant 0 segons a una velocitat de transició de 20°C/segon i un augment lent de temperatura fins a 95°C a una velocitat de transició de 0,05°C/segon i en adquisició de fluorescència contínua);
- 4/ refredament lent a 35°C.

Les variacions de temperatura d'annealing responen a les característiques pròpies dels encebadors utilitzats i els temps d'extensió s'han triat en funció de la mida de l'amplímer.

3.20.4 Sensibilitat i reproducibilitat de l'amplificació

La *sensibilitat*, definida com el nombre mínim de còpies o de molècules detectables, s'ha calculat amb els valors dels estàndards, que s'han utilitzat en cada determinació en dilucions seriadades 1/10. La sensibilitat establerta per a cada molècula és la següent: CCL21, 249 molècules; CXCL12, 14 molècules; CXCL13, 150 molècules; CCL22, 3600 molècules. En funció d'aquests paràmetres, les quantificacions inferiors a la sensibilitat mínima establerta s'han conderat com: CCL21, 248 molècules; CXCL12, 13 molècules; CXCL13, 149 molècules; CCL22, 3599 molècules.

La *reproducibilitat* dels experiments s'ha establert tant amb els estàndards com amb les mostres. En els primers s'ha obtingut en cada experiment una recta de regressió entre el logaritme de la concentració de la mostra (nombre de molècules) i el cicle en què l'amplificació d'aquesta comença a ser exponencial (*crossing point*). S'han acceptat només les rectes de regressió iguals o superiors a -0,98 i només s'han comptabilitzat aquelles determinacions en què la desviació estàndard de la quantificació sigui inferior al 5% de la mitjana de les quantificacions.

A la *figura 18* es mostren les corbes d'amplificació i de melting dels estàndards per a cada molècula amplificada mitjançant aquest sistema de quantificació.

3.20.4 Quantificació del nombre de molècules i del nivell d'expressió de les quimiocines

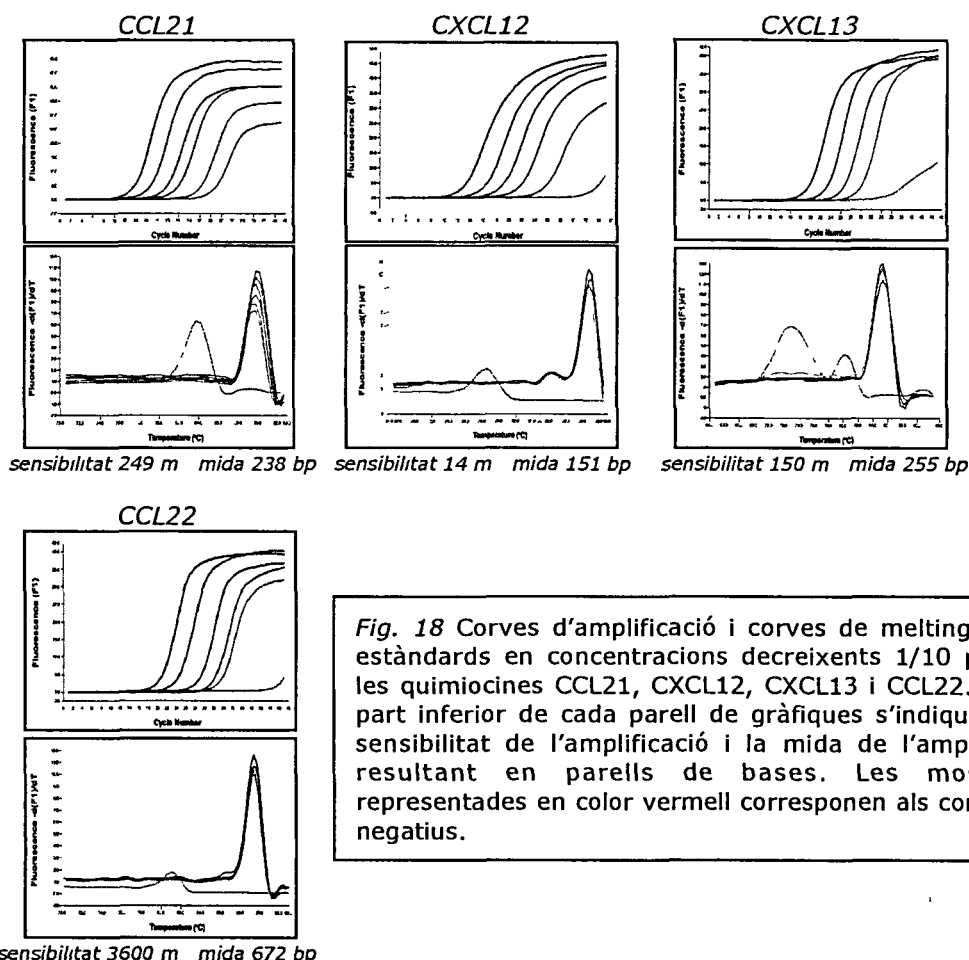
La quantitat de molècules d'interès s'ha calculat en la fase d'amplificació/quantificació amb una mesura puntual de fluorescència mitjançant el mètode de la segona derivada (dF/dT) després d'haver-se confirmat l'especificitat de l'amplificació pel perfil de la corva de melting. Les mostres i els estàndards per la determinació de l'expressió de les quimiocines s'han fet per quadruplicat en quatre assajos independents i per l'expressió de GAPDH s'han fet per sextuplicat en tres assajos independents. L'abundància relativa de cada quimiocina s'ha calculat normalitzant la mitjana dels valors del nombre de còpies de quimiocina en cada mostra (meanCHEM_{MOSTRA}) amb la mitjana dels valors de la GAPDH corresponent (meanGAPDH_{MOSTRA}) corregida per l'abundància del missatger de GAPDH a l'amígdala palatina (PT) presa com a teixit de referència i expressada en unitats arbitràries. La fórmula aplicada per a cada mostra és:

$$\text{expressió de quimiocina per mostra} = \frac{(\text{meanCHEM}_{\text{MOSTRA}}) \times (\text{meanGAPDH}_{\text{PT}})}{(\text{meanCHEM}_{\text{PT}}) \times (\text{meanGAPDH}_{\text{MOSTRA}})}$$

El nivell d'expressió de les quimiocines a cada mostra s'ha calculat definint una "unitat de quimiocina" interna com a:

$$1 \text{ unitat CHEM} = \frac{\text{nombre de molècules de CHEM}}{\text{nombre de molècules de GAPDH}}$$

Així, els resultats finals es mostren com a nombre d'unitats de quimiocines i s'expressen com a: 1 molècula de CCL21/ 2,86 molècules de GAPDH; 1 molècula de CXCL12/ 549,51 molècules de GAPDH; 1 molècula de CXCL13/ 2,41 molècules de GAPDH i 5,55 molècules de CCL22/ 1 molècula de GAPDH.



3.21 ANÀLISI DE LA LONGITUD DEL CDR3

És una tècnica basada en la variabilitat de la longitud del CDR3 (*hypervariable antigen-binding complementarity determining region*) degut al procés de reordenament dels diferents segments gènics que constitueixen les cadenes de les immunoglobulines. Aquesta aproximació s'ha utilitzat en l'estudi de la clonalitat de les línies de cèl·lules B intratiroidals híbrides amb la línia F3B6. Per aplicar-ho s'ha assumit que cada línia clonal expressarà un únic fragment CDR3 que, amplificat per PCR i analitzat a la LightCycler (utilitzant com a sistema de detecció la incorporació de SybrGreen) emetrà un únic pic de fluorescència en la corva de melting.

Els encebadors usats (InVivoScribe Technologies, San Diego, USA) són una barreja de 6 oligonucleòtids en l'extrem 5' que reconeixen zones conservades del fragment FR3 (*framework region 3*) de les regions variables i un oligonucleòtid 3' que reconeix específicament una zona consens de la regió JH.

3.21.1 Optimització, precisió i reproducibilitat de l'anàlisi de la corva de melting

Optimització. En primer lloc s'ha optimitzat la concentració de Mg^{2+} mínima necessària (testada entre 4mM i 1mM) per obtenir un únic pic d'amplificació i reduir la formació de

dímers d'encebadors i s'ha establert en 1mM Cl_2Mg (figura 19). La temperatura d'annealing s'ha testat entre 50 i 65°C i s'ha establert com a definitiva la més elevada. També s'ha testat el nombre de cicles necessaris per amplificar el fragment CDR3 utilitzant 100ng de DNAG de les línies cel·lulars humanes Namalwa i Daudi i 100ng de DNAG de PBLs i comparant després de la PCR l'alçada del pic de $-dF/dT$ entre mostres i amb el dels PBLs. S'han trobat diferències en l'eficiència d'amplificació quan s'ha treballat entre 30 i 40 cicles, però un increment del nombre de cicles a partir de 40 no millora l'eficiència de l'amplificació, és a dir, l'alçada del pic $-dF/dT$ deixa d'augmentar.

Precisió i reproducibilitat. S'ha estudiat utilitzant diferents motllos: a/ 200ng o 100ng de DNAG de Namalwa o de Daudi; b/ 100ng de DNAG de Namalwa mesclats amb 100ng de DNAG de Daudi; c/ 100ng de cDNA de Namalwa amb 100ng de cDNA de Daudi. S'ha repetit 5 cops la reacció d'amplificació en experiments independents i s'ha comprovat que per una mateixa mostra, la T_m de les reaccions se situa en $89,55 \pm 0,10$ (mitjana \pm SD) i que una quantitat de DNAG motllo superior a 100ng no augmenta la quantitat d'amplímer obtingut sinó que inhibeix parcialment la reacció de PCR.

Basant-nos en els anteriors criteris, s'ha considerat clonal aquella mostra que presenta un sol pic d'amplificació i que la T_m del 90% de l'àrea del pic $-dF/dT$ no presenta una variació superior a $\pm 1^\circ\text{C}$ (figura 19).

3.21.2 Condicions d'amplificació

Les reaccions de PCR es duen a terme en capil·lars en un volum final de 20 μl de reacció que conté 14 μl d'IgH FR3 Master Mixture, 1mM Cl_2Mg , 10% SybrGreen Master Mix, 100ng DNAG o cDNA. El programa de ciclat es divideix en els següents passos:

1/ desnaturalització hot start a 95°C durant 10min;

2/ ciclat, que consisteix en 40 cicles de (desnaturalització a 95°C 30 segons, annealing a 65°C 10 segons i extensió a 72°C 15 segons);

3/ corva de melting que inclou (desnaturalització a 95°C 30 segons, annealing a 60°C 30 segons, augment ràpid a 70°C durant 0 segons a una velocitat de transició de 20°C/segon i un augment lent de temperatura fins a 95°C a una velocitat de transició de 0,05°C/segon i en adquisició de fluorescència contínua;

4/ refredament lent a 35°C.

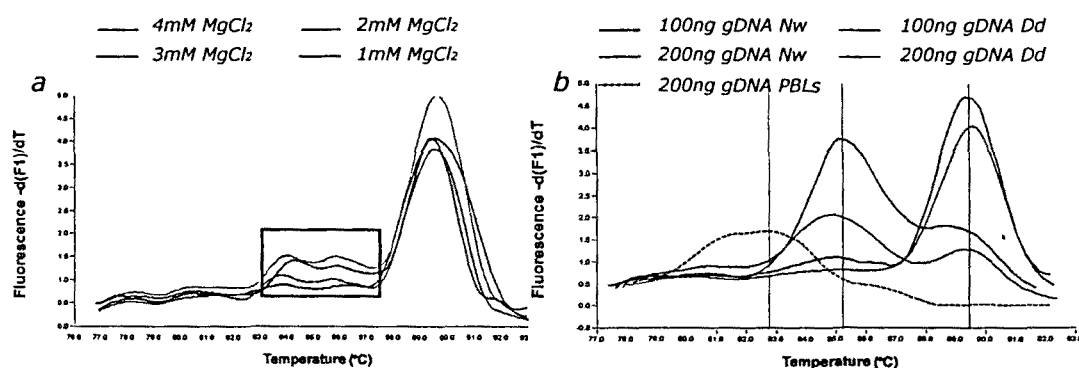


Fig. 19 Optimització de les condicions d'amplificació del CDR3 mitjançant anàlisi de les corves de melting. a: Test de la concentració òptima de Cl_2Mg en la que s'observen els pics d'amplificació inespecífics (interior del quadrat negre) formats per dímers de primers; b: Variacions en la proporció d'amplímer obtingut a partir de quantitats decreixents de dues mostres (Nw i Dd), cadascuna de les quals presenta una T_m diferent clarament identificable. Nw, Namalwa; Dd, Daudi.

3.22 SEQÜENCIACIÓ DELS AMPLÍMERS DEL CDR3

3.22.1 Purificació de la mostra

L'amplificació del CDR3 per a cada mostra s'ha dut a terme paral·lelament en un capil·lar en el que les condicions d'amplificació són equivalents (3.21.2), exceptuant l'addició de l'intercal·lant SybrGreen per tal que no interfereixi la lectura dels nucleòtids incorporats posteriorment en la reacció de seqüenciació. Els productes d'amplificació obtinguts se separen per electroforesi en un gel d'agarosa d'alta resolució al 2,5% en 1xTAE, es tallen les bandes i s'elueixen els amplímers amb columnes GFX (Pharmacia) seguint les instruccions d'ús. Aquestes breument consisteixen a: 1/ incubar el bloc d'agarosa amb la quantitat necessària de tampó de captura del DNA durant 10min a 60°C fins a fondre l'agarosa; 2/ aplicar-ho a la columna que es manté 1min a T.A. i centrifugar 30 segons a 3000g; 3/ rentar la columna amb tampó de rentat (Tris-EDTA 10:1, etanol al 80%); 4/ centrifugar 1min a 3000g i 5/ eluir la mostra amb 10µl d'H₂O centrifugant 3min a 3000g.

3.22.2 Seqüenciació de l'amplímer

S'ha fet seguint el mètode de BigDye terminator (PE Applied Biosystems), que consisteix en la incorporació de dinucleòtids conjugats amb diversos fluorocroms. Així, 5µl de DNA eluits, sense quantificar i coberts amb oli mineral, s'han sotmès a una PCR en un volum final de 10µl que conté 2µl de Terminator Ready Reaction Mix (TTRM, AmpliTaq DNA polimerasa, dinucleòsids, 'dye terminators', tampó x 1) i 1mM de l'encebador. La reacció se sotmet a 94°C 3min i 25-30 cicles de: 10 segons a 96°C, 10 segons a 55°C i 2min a 60°C i el producte de l'amplificació es precipita amb 0,1vol de KAc 3M, 10µg de glucogen i 2,5 volums d'etanol absolut. S'incuba 10min en gel i se centrifuga 30min a 10000g. El precipitat es renta amb etanol al 75% i es ressuspèn en 25µl de tampó de seqüenciació o TSR (PE Applied Biosystems). Es desnatura per incubació 3min a 95°C i s'analitza en un seqüenciador automàtic de sistema capil·lar (ABI PRISM™310, Applied Biosystems).

L'encebador utilitzat en la seqüenciació (5'-CTGAGGAGACGGTGACC-3') s'ha dissenyat en una zona altament conservada en tots els segments gènics de J_H.

Les seqüències s'han analitzat utilitzant el software MT Navigator PPC (PE Applied Biosystems) usant la base de dades ImMunoGeneTics database (IMGT, <http://imgt.cnusc.fr>).

3.23 OBTENCIÓ DE CÈL·LULES EUCARIOTES TRANSFECTANTS QUE EXPRESSIN LA PORCIÓ EXTRACEL·LULAR DEL TSHR HUMÀ

3.23.1 Obtenció de l'insert purificat

Hem disposat de la porció extracel·lular (ECD, *extracellular domain*) del receptor de la TSH humà clonada en el plasmidi pBlueScript II (SK+). L'ECD-TSHR s'ha obtingut per digestió amb la combinació dels enzims de restricció Kpn I/Xba I (Boehringer-Mannheim) a partir de 25µg de mostra en una reacció de digestió amb volum final de 50µl que conté 1% BSA, 40u Kpn I, 30u Xba I i tampó de digestió x 1. La reacció s'ha incubat durant 2 hores a 37°C i s'ha comprovat la digestió total del construct en un gel al 2% d'agarosa de baix punt de fusió (*low melting agarose*). La banda de 2,3Kb corresponent a l'ECD-TSHR s'ha tallat i eluit del gel amb columnes GFX i la quantificació del material recuperat s'ha fet en gel a l'1,5% d'agarosa amb dilucions successives de l'insert per comparació amb dilucions successives del marcador de pes molecular.

3.23.2 Obtenció del plasmidi pcDNA3

3.23.2.1 Digestió i purificació del plasmidi pcDNA3

Digestió i purificació. S'ha linealitzat amb els enzims de restricció Kpn I/Xba I pels quals aquest plasmidi té una diana de restricció única, que genera extrems cohesius. Aquesta s'ha realitzat a partir de 100µg de pcDNA3 en 50µl de volum final que contenen també de digestió 1x, 100u Kpn I, 60u Xba I i un 1% BSA. Després d'incubació durant 2 hores a 37°C, el producte de la digestió s'ha purificat utilitzant les columnes del kit GFX per tal d'eliminar els productes residuals (enzim, buffer...) i s'ha eluït en H₂O.

Defosforil·lació. Per tal d'evitar la recircularització del plasmidi cal eliminar els grups fosfat que hagin quedat als extrems 5' resultants de la digestió utilitzant 10u/µl de SAP (*shrimp alkaline phosphatase*). La reacció s'incuba durant una hora a 37°C seguida per una incubació a 70°C per inactivar l'enzim durant 20min i finalment es fa una precipitació per purificar el DNA i es ressuspèn en un volum petit d'H₂O.

Un cop fet això, s'ha quantificat el pcDNA3 en un gel d'agarosa a l'1%, utilitzant dilucions seriades de la pròpia mostra i del marcador de pes molecular λHindIII (Sigma).

3.23.3 Reacció de lligació

La reacció de lligació ha consistit a la incubació durant tota la nit a 16°C de: 100ng de pcDNA3 amb 125ng d'insert (ECD-TSHR) en presència de 400U de T4 DNA lligasa (New England Biolabs), també 1x (Tris-HCl 50mM pH 7.8, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, 50 mg/ml BSA) en H₂O en un volum total de 15µl. En el control d'autolligació s'han mantingut les condicions omitint l'insert i en el control de transformació s'ha utilitzat el vector sense linealitzar.

3.23.4 Transformació i obtenció de colònies

Per a la transformació es mesclen 100µl de cèl·lules competents One Shot™TOP10F' (Invitrogen) amb 3µl de producte de la lligació, es transfereixen a les cubetes d'electroporació i s'aplica un corrent elèctric de 1,8KV, 25µF 200-400 ohm. Tot seguit s'afegeixen 10ml de medi SOC atemperat (triptona 2%, extracte de llevat 0,5%, NaCl 10mM, KCl 25mM, MgSO₄ 10mM, MgCl₂ 10mM, glucosa 20mM) i s'incuba 1h a 37°C en agitació orbital a 100rpm (Gallenkamp Orbital Incubator). El producte de la reacció se sembla en una placa de Petri de medi LB/Agar (triptona 1%, extracte de llevat 0,5%, NaCl 1%, agar 1,5%), IPTG 0,24mg/ml i kanamicina 2mg/ml i es manté invertida 16-20h a 37°C.

3.23.4.1 Anàlisi de les colònies obtingudes

En funció del nombre de colònies crescudes, s'ha calculat que l'eficiència de transformació ha estat de 10⁷ colònies/µg construcció. S'han seleccionat 30 colònies a l'atzar per fer el cribatge mitjançant una disrupció ràpida de colònies. Breument, el procediment experimental és el següent: es cultiven en 10ml de LB + kanamicina (50 mg/ml) durant la nit a 37°C i a 225 rpm. Abans d'iniciar l'extracció, es congelen 2 tubs de cadascuna afegint 200µl de glicerol a 800µl de cultiu, es fa un vòrtex i es guarden al congelador de -70°C. La minipreparació del DNA plasmídic s'ha realitzat utilitzant el kit Concert™ High Purity Plasmid Purification Systems (GibcoBRL Products), que utilitza unes columnes amb una resina d'intercanvi aniònic que purifica el DNA plasmídic a un nivell teòricament equivalent a una doble purificació en gradient de clorur de cesi. Sota unes condicions salines moderades, el DNA plasmídic queda unit a la resina, mentre que l'RNA, les proteïnes, els carbohidrats i altres impureses són eliminades. El DNA plasmídic s'elueix amb altes concentracions salines. Posteriorment el DNA es precipita amb etanol i es ressuspèn en TE. Finalment es quantifica com s'ha descrit en apartats anteriors.

3.23.5 Transfeccions estables

S'han transfectat cèl·lules DAP-3 i cèl·lules 300.19 per electroporació. Per a això, les cèl·lules s'han mantingut en creixement exponencial durant dues setmanes fins arribar a un 50-80% de confluència. Les cèl·lules DAP3 s'han recuperat per "rascat" dels flascons de cultiu per evitar l'ús de tripsina. El protocol de transfecció estable ha consistit a mesclar 8×10^6 cèl·lules per condició ressuspeses en 800µl de medi de cultiu amb 40µg de la construcció ECD-TSHR/pcDNA3 linealitzada amb Pvu I, agitar-ho i incubar-ho durant 10min en gel. Les condicions d'electroporació usades han estat: 280V, 960mF, 22,3mseg. Després d'incubar-ho 10min més en gel, les transfectants s'han ressuspès en 15ml del medi de cultiu corresponent, s'ha fet un recompte ($1,7 \times 10^6$ cèl·lules vives) i s'ha calculat la viabilitat (20% respecte la de l'inici; taronja d'acridina/bromur d'etidi). Les cèl·lules s'han sembrat en plaques de 96 pouets a raó de 11000, 5500, 2900 i 1450 cèl·lules per pouet i s'han mantingut durant dos dies en creixement amb medi complet sense selecció. A les 48 hores s'ha enretirat la meitat del medi i se n'ha afegit de nou amb una concentració final de geneticina (G418) d'1mg/ml. Les cèl·lules s'han seleccionat en funció del seu creixement i en funció de l'expressió en superfície del ECD-TSHR.

3.24 ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els diferents tests estadístics s'han dut a terme amb els paquets estadístics Sigma Stat (Microsoft Corp. Seattle, US) i SPSS® 7.5 per Windows (Microsoft).

Anàlisis bivariants. Les dades amb distribució normal i no normal s'han analitzat respectivament amb els tests estadístics (Student T-test) per dades paramètriques i (Mann-Whitney) per no paramètriques. En algunes ocasions s'ha usat el coeficient de correlació de Pearson a les anàlisis bivariants. S'ha considerat estadísticament significatiu un nivell de significació del 5%.

Anàlisi multivariant. S'ha usat una anàlisi discriminant amb imputació de les dades "missing" per càlcul de la mitjana o per regressió en una matriu de covariàncies conjunta. Aquest tipus de test s'ha aplicat a l'anàlisi conjunta de les dades corresponents a l'expressió de citocines, quimiocines i títols d'anticossos en dues poblacions en les que la variant de segregació és la presència/absència de fol·licles limfoides a la tiroide. Això s'ha dut a terme per calcular la combinació de variables que siguin capaces de predir la probabilitat de desenvolupament de centres germinals intratiroïdals en un 90% dels casos.

4. RESULTATS

CONSIDERACIONS PRÈVIES

Prèviament a l'anàlisi dels resultats que es presentaran a continuació, és convenient tenir en compte algunes dades referents a les diferències entre la tiroïditis de Hashimoto (HT) i la malaltia de Graves-Basedow (GD) pel que fa als nivells hormonals perifèrics, els autoantígens involucrats en la resposta immunitària, el mecanisme de destrucció glandular, etc.

La *tiroïditis de Hashimoto* és una malaltia de la tiroide resultat de la infiltració i la destrucció de la glàndula degut probablement a la presència d'autoanticossos bloquejants contra el receptor de la TSH, d'anticossos citotòxics i a l'acció directa d'alguns limfòcits T, mentre que la *malaltia de Graves-Basedow* és la conseqüència d'una hiperfunció tiroïdal per l'acció patogènica directa dels autoanticossos estimuladors contra el receptor de l'hormona estimuladora de la tiroide. En ambdós casos s'ha demostrat una resposta tant cel·lular com humoral, però la diana principal de la resposta en la HT són la Tg i/o la TPO mentre que a la malaltia GD la molècula contra la que té lloc la resposta humoral és el TSHR.

Tot i amb això, les dues patologies comparteixen alguns trets comuns com una infiltració limfocitària glandular de limfòcits T i B, una incidència més elevada en les dones, una evolució perllongada en el temps, una localització més o menys restringida a la tiroide (amb excepció del greix retro-orbital en el cas dels malalts amb GD) i la presència de cèl·lules B intratiroïdals capaces de produir anticossos contra Tg i TPO *in vitro*. És per aquest motiu que s'han utilitzat paral·lelament com a models d'autoimmunitat organ-específica humana.

És conegut que durant el desenvolupament inicial de les cèl·lules B al moll de l'os i després de la selecció que hi té lloc, hi ha cèl·lules B autoreactives que escapen a aquest procés i que són alliberades a circulació com a cèl·lules amb potencial autoreactiu. El paper que juguen el fol·licles limfoides secundaris en l'eliminació posterior d'aquestes cèl·lules sembla demostrat, però la generació ectòpica de fol·licles limfoides en teixits en els que té lloc un procés autoimmunitari (limfoneogènesi) no sembla que desempeñi la mateixa funció. Al contrari, i per analogia amb les infeccions, sembla que aquestes estructures contribueixin directament a la cronificació de malalties autoimmunitàries tant específiques com no específiques d'organ per generació constant de cèl·lules autoreactives en el lloc en el qual la concentració d'autoantigen sembla elevada.

Per tal d'estudiar quin paper podria tenir el teixit limfoide terciari que s'estructura en les malalties autoimmunitàries de la tiroide, la part inicial del present estudi s'ha enfocat cap a una anàlisi d'aquest en l'infiltrat de les glàndules i, en particular, dels tipus de limfòcits B que en formen part. Paral·lelament s'hi han estudiat directa o indirectament els fenòmens propis dels fol·licles limfoides secundaris (com proliferació, apoptosi, reordenament, etc), l'especificitat antigènica de les immunoglobulines de superfície dels limfòcits B presents i finalment s'ha analitzat el paper de quimiocines/citocines i dels seus receptors en l'organització d'aquestes estructures. Com a conseqüència dels resultats obtinguts en el teixit diana de l'atac autoimmunitari, s'han extès els estudis a nivell perifèric i s'ha demostrat l'associació que té una infiltració selectiva de la tiroide amb la reducció dels nivells de receptors de quimiocines als limfòcits de sang perifèrica.

En general, la intervenció quirúrgica que ha permès l'accés a les tiroïdes utilitzades en el present treball ha tingut lloc per fracàs terapèutic al que s'ha sotmès el pacient, per tant no hi ha una homogeneïtat absoluta pel que fa al temps d'evolució de la malaltia, al tractament rebut i a l'edat dels malalts. Per tal de minimitzar l'efecte que hagi pogut tenir això, el present treball s'ha dut a terme fonamentalment utilitzant un nombre elevat de glàndules humanes en diferents estadis d'evolució de la malaltia i s'han agrupat els resultats només quan el seu origen s'ha considerat comparable.

4.1. DESCRIPCIÓ DE LES TIROIDES ESTUDIADAES I DE LES GLÀNDULES CONTROLS

4.1.1 Estructura de l'epiteli i de l'endoteli glandulars

Una de les diferències ja comentades a la introducció entre la HT i la malaltia de GD és la conseqüència que produeix la infiltració limfocitària en l'estructura macro i microscòpica de les tiroïdes després d'un procés autoimmunitari.

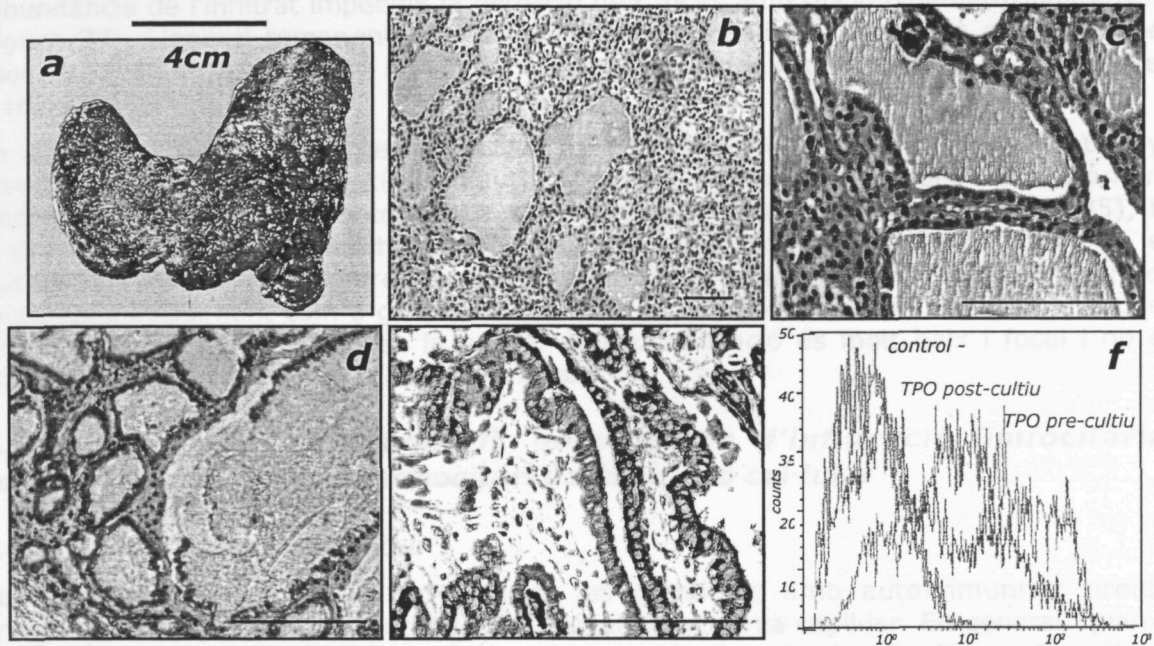
4.1.1.1 Malaltia de Graves-Basedow

L'afectació de l'epiteli a la malaltia de Graves-Basedow (GD) varia en funció del grau d'evolució. En general, a nivell macroscòpic, la glàndula es veu engrandida (*figura 20*), és més fibrosa i té més consistència que una tiroide no patològica. A nivell microscòpic i utilitzant una tinció d'hematoxilina/eosina s'observa una disminució general de la llum dels fol·licles tiroïdals que en ocasions condueix a un col·lapse total i a una disminució del volum del col·loid. Els tiròcits mantenen la forma cúbica característica però en molts casos incrementen la seva alçada (comparats amb els de l'epiteli d'una tiroide normal) i sovint s'observen les papil·les típiques de la malaltia. La desestructuració de la glàndula no és total, sinó que es tracta d'un fenomen molt focal que afecta determinades zones, de forma que una àrea amb infiltració limfocitària elevada pot coexistir amb zones lliures d'infiltració en les que l'epiteli no es veu afectat.

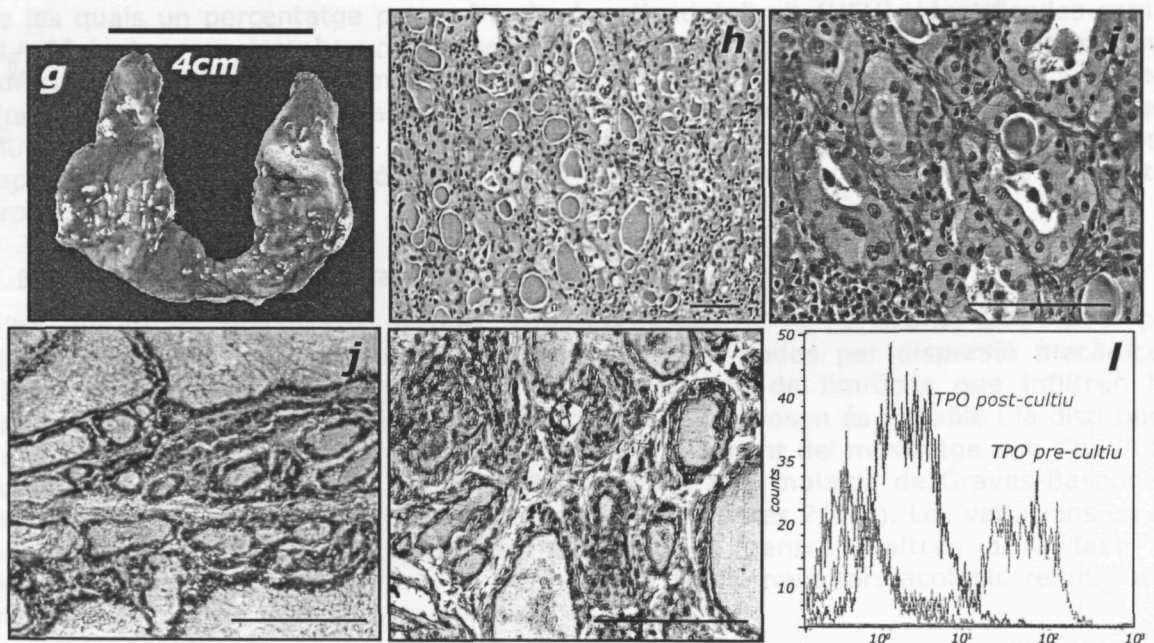
En seccions de teixit i utilitzant tincions específiques per reconèixer epiteli (citoqueratina 8-18) o epiteli tiroïdal (tiroglobulina o peroxidasa tiroïdal), s'observa que els tiròcits són homogèniament positius per Tg (que a la vegada es detecta al col·loid) mentre que són heterogèniament productors de TPO, en funció de l'activitat glandular del moment. Usant preparacions citològiques obtingudes per digestió mecànica i enzimàtica de la tiroide sense cultiu previ, tenyides per tinció citoplasmàtica amb anticossos contra citoqueratina o contra TPO, es confirma aquest darrer punt (heterogeneïtat en la producció de TPO) i el conjunt de cèl·lules epitelials s'observa com dues poblacions en les que hi ha tiròcits positius i negatius per TPO. Després de cultiu durant 12-24 hores, les cèl·lules productores de peroxidasa tiroïdal deixen de sintetitzar-ne de forma que els tiròcits passen a ser una població única molt més homogènia amb una síntesi mitjana molt inferior a la fisiològica.

Fig. 20 Estructura cel·lular tiroïdal de les glàndules amb tiroïdopaties autoimmunitàries. Les imatges d'a-f corresponen a glàndules amb malaltia de Graves-Basedow, i les imatges de g-l corresponen a tiroïdes amb tiroïditis de Hashimoto. a: Visió macroscòpica d'una tiroide en la que s'observa un augment de mida respecte una tiroide normal; b: secció de congelació tenyida amb H/E on es mostren fol·licles tiroïdals que contenen col·loid; c: estructura microscòpica ampliada per observar l'engruiximent de l'epiteli i la formació de les papil·les típiques; d: distribució de l'epiteli tiroïdal identificat com a conjunt de cèl·lules tenyides positivament per citoqueratina (vermell) en una tinció contratenyida amb hematoxilina; e: ídem per a la identificació de tiròcits com a cèl·lules productores de tiroglobulina (marró); f: histogrames superposats en els que es mostra que l'expressió de peroxidasa tiroïdal (detectat amb un sèrum humà amb títols alts d'anticossos anti-TPO) en preparacions de tiròcits directament tenyits després de la digestió és màxim (TPO pre-cultiu, en vermell) i va minvant en preparacions post-cultiu (TPO post-cultiu, en verd). Als histogrames també es mostra la tinció amb sèrum humà normal (control -). Les microfotografies de g-l corresponen a malalts amb tiroïditis de Hashimoto per identificar les mateixes molècules i estructures. Les diferències entre ambdues malalties se situen bàsicament a nivell de mida de la glàndula (molt inferior a la malaltia de Hashimoto) i a nivell de mida de fol·licle tiroïdal que es veu molt reduït per la presència de l'infiltrat limfocitari. I: als histogrames, el contingut TPO pre-cultiu es mostra en verd i el post-cultiu en blau. Els augments utilitzats en cada microfotografia es mostren amb una línia horitzontal que en tots els casos equival a 100µm. Les imatges a) i g) corresponen al capítol 21 sobre malalties de la tiroide publicat per la University of Kansas Medical Center.

malaltia de Graves-Basedow



tiroiditis de Hashimoto



4.1.1.2 Tiroiditis de Hashimoto

Macroscòpicament l'estructura de la glàndula es veu modificada molt més homogèniament que la dels Graves-Basedow donat que la destrucció tiroïdal no és un fenomen tan focal. En general, la consistència global de la glàndula és més fibrosa i de vegades s'observen àrees de necrosi.

Microscòpicament, i en funció del grau d'evolució de la malaltia, en el Hashimoto (HT) hi ha una destrucció generalitzada de l'epiteli que, malgrat la infiltració massiva de limfòcits, dóna lloc a una disminució de la mida global de la glàndula. En alguns casos

l'abundància de l'infiltrat impedeix la detecció de tiròcits amb tinció d'hematoxilina/eosina (*figura 20*). L'epiteli remanent, però, manté la funcionalitat i també la positivitat per citoqueratina i la síntesi de Tg i de TPO i s'observa una variació en la mida de l'epiteli i en la mida del fol·licle tiroïdal.

En aquest treball es presenten dades de 10 tiroïdes amb HT: a/ un cas amb 6 anys d'evolució de malaltia amb títols d'autoanticossos sèrics molt elevats i una glàndula totalment infiltrada, amb un contingut remanent de tiròcits molt baix (HT1 o HT385); b/ 8 casos més en que la infiltració és moderada i es troben abundants zones on es distingeix sense dificultat l'arquitectura pròpia d'una tiroide (HT3-HT9); c/ una tiroide catalogada inicialment com a goll nodular (MNG) i posteriorment com a MNG amb signes de tiroïditis (HT2 o HT384), en la que el grau d'infiltració és molt baix i focal i no es detecten autoanticossos circulants en el malalt.

4.1.2 Descripció de l'endoteli, percentatge d'infiltració limfocitària, composició de l'infiltrat leucocitari i distribució cel·lular

4.1.2.1 Descripció de l'endoteli

Com a conseqüència de la hiperfunció, les glàndules amb autoimmunitat tiroïdal presenten un augment quantitatiu de la densitat de la xarxa capil·lar. En general, quan la tiroide està intensament infiltrada té una densitat elevada de vènules post-capil·lars (estructures endotelials positives per factor VIII, *figura 21*) distribuïdes uniformement, de les quals un percentatge petit són vènules d'endoteli alt (HEV), identificades com a CLA-1⁺ (*cutaneous-lymphocyte antigen-1*) que es troben sobretot en les zones amb infiltració elevada i que permeten l'arribada dels limfòcits al seu través. En les àrees lliures d'infiltració limfocitària i en els teixits de les tiroïdes diagnosticades com a goll multinodular (MNG) o sense patologia tiroïdal coneguda, la densitat de vènules post-capil·lars sol ser elevada però no es detecten HEVs, de forma que l'endoteli d'aquestes tiroïdes és factor VIII⁺CLA-1⁻.

4.1.2.2 Percentatge d'infiltració limfocitària i distribució

S'ha estudiat mitjançant dobles tincions (anti-CD45-FITC/anti-CD14-PE) per citofluorimetria en suspensions cel·lulars totals obtingudes per dispersió mecànica i digestió enzimàtica de les glàndules. El percentatge de limfòcits que infiltren les glàndules respecte la resta de tipus cel·lulars que la componen és variable i la distribució de l'infiltrat no és homogènia. Per aquest motiu, i depenent del mostratge que s'ha dut a terme, l'infiltrat pot oscil·lar entre el 5% i el 60% a la malaltia de Graves-Basedow i entre un 20% i un 85% a la tiroïditis de Hashimoto (*figures 21d-g*). Les variacions en els percentatges de cèl·lules infiltrants són degudes entre d'altres a la fase de desenvolupament de la malaltia, al període i el tractament farmacològic rebut i a la mostra tisular presa per a la determinació.

La distribució de l'infiltrat leucocitari també s'ha estudiat en seccions de congelació i en seccions fixades i incloses en parafina. En els Graves-Basedow, els leucòcits que formen part de l'infiltrat tiroïdal tant difús com organitzat, es distribueixen zonalment, de forma que en les seccions es poden observar àrees lliures d'infiltració properes a fol·licles tiroïdals amb aspecte normal que conviuen amb àrees d'infiltració elevada on els fol·licles tiroïdals poden quedar col·lapsats i reduïts respecte la seva forma habitual. A les glàndules dels malalts de Hashimoto la infiltració és massiva i distribuïda més uniformement, tant pel que fa a l'infiltrat difús com a l'estructurat (*figura 21c*).

4.1.2.3 La composició de l'infiltrat tiroïdal leucocitari

Quantitativament, els tipus cel·lulars presents en l'infiltrat tiroïdal s'han estudiat després de purificació per gradient de densitat del limfòcits intratiroïdals o per adherència selectiva al plàstic en cultius de curta durada. Amb aquesta darrera aproximació se segreguen dels fibroblastes, macròfags, cèl·lules epitelials, endotelials, dendrítiques i

dendrítiques fol·liculars. Els limfòcits obtinguts s'han tenyit i analitzat en un citofluorímetre de fluxe (*figura 21h-m*). La composició de l'infiltrat és majoritàriament de cèl·lules T (entre el 40% i el 90% del total de l'infiltrat) i B (entre el 10% i el 60% del total de l'infiltrat) amb variacions quantitatives en funció de la patologia considerada. Així en els pacients amb malaltia de Graves-Basedow segueix la jerarquia: cèl·lules T CD4⁺ > cèl·lules T CD8⁺ > cèl·lules B > cèl·lules dendrítiques madures > macròfags, mentre que a les tiroïditis de Hashimoto està composta per cèl·lules T CD8⁺ > cèl·lules T CD4⁺ = cèl·lules B > cèl·lules dendrítiques madures > macròfags. El percentatge de cèl·lules dendrítiques madures (CD83⁺) i macròfags (CD14⁺), que és el que presenta més variabilitat, oscil·la entre el 10 i el 20% segons la patologia considerada.

La quantificació de cada subpoblació de limfòcits infiltrants es veu dificultada per una disminució en la mediana de fluorescència per a molècules com CD4, CD8, CD19 i d'altres respecte els seus equivalents en sang perifèrica.

4.1.2.4 Distribució dels diferents tipus cel·lulars

La distribució dels diferents tipus cel·lulars és molt similar a les dues malalties i, en general, les cèl·lules T CD3⁺ i T CD4⁺ es poden trobar tant agrupades en zones d'elevada infiltració com disperses en el teixit entre els fol·licles tiroïdals, mentre que les T CD8⁺, B CD19⁺, DC CD83⁺ i CD14⁺ solen ser més escasses i estar majoritàriament disseminades. És interessant comentar que els macròfags poden trobar-se a l'interior del col·loïd de les zones amb infiltració limfocitària important.

Fig. 21 Estructura endotelial, infiltració limfocitària i descripció de les poblacions leucocitàries a les tiroides autoimmunitàries. a, b: vècules d'endoteli alt (HEVs) a diferents augments identificades com a estructures positivament tenyides per CLA-1 (cutaneous-associated lymphocyte antigen-1) en una tinció amb un anticòs secundari conjugat amb peroxidasa. Les HEVs es troben properes tant a zones d'elevada infiltració leucocitària com a fol·licles tiroïdals. c/ imatge de la destrucció del teixit tiroïdal i substitució per infiltrat difús en un malalt amb tiroïditis de Hashimoto; d-g: imatges de citofluorimetria representatives del percentatge d'infiltració limfocitària intratiroïdal, identificada com la població CD45⁺CD14⁻, en dos digestions totals de tiroides en els que el grau d'infiltració és diferent i en els que s'observa la presència de cèl·lules grans autofluorescents corresponents als tiròcits; h-i: distribució de cèl·lules T CD3⁺ a l'infiltrat difús en una tinció amb anti-CD3-FITC sobre una tiroides d'un malalt amb Hashimoto i dot plot representatiu de la proporció del diferents tipus de cèl·lules T (CD4⁺/CD8⁺) en una finestra d'anàlisi en la que només es consideren les cèl·lules CD45⁺; j-k: cèl·lules B CD19⁺ en un malalt amb Graves-Basedow i dot blot representatiu de la proporció CD3⁺/CD19⁺ en una finestra d'anàlisi en la que només es consideren les cèl·lules CD45⁺; l: cèl·lules dendrítiques madures CD83⁺ distribuïdes aleatòriament en un infiltrat; m: macròfags CD14⁺ en l'infiltrat desestructurat no agrupats. Els augments utilitzats en cada microfotografia es mostren amb una línia horitzontal que en tots els casos equival a 100µm.