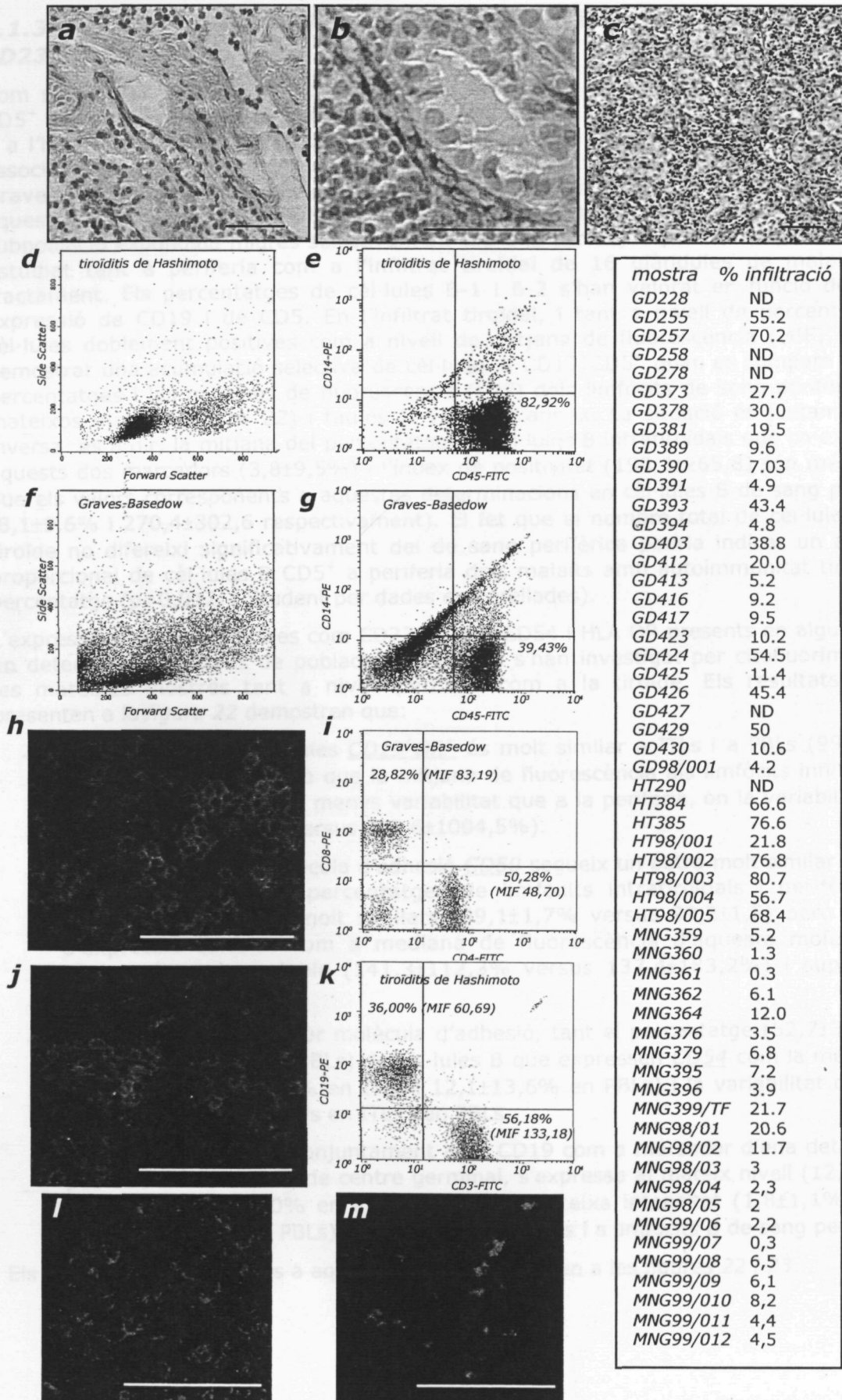


*ESTRUCTURACIÓ DE LA RESPOSTA B A LES  
MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES DE LA TIROIDE*

*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*





### 4.1.3 Les cèl·lules B infiltrants són majoritàriament B-2 i expressen CD23, CD50 i CD54

Com s'ha comentat a la introducció, es considera que la subpoblació de cèl·lules B-1 CD5<sup>+</sup> poden ser font d'autoanticossos contra estructures glucídiques amb motius repetits i, a l'home, l'augment percentual en perifèria d'aquesta subpoblació de limfòcits B s'ha associat amb la presència de certes malalties autoimmunitàries com l'hipertiroïdisme de Graves-Basedow en pacients que no han iniciat el tractament. Per tal de confirmar aquestes observacions publicades per altres grups i d'estudiar la possibilitat que aquesta subpoblació expandida migrés selectivament cap a la tiroide, la població CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> s'ha estudiat tant a perifèria com a l'infiltrat tiroïdal de 16 glàndules de malalts amb tractament. Els percentatges de cèl·lules B-1 i B-2 s'han valorat en funció de la co-expressió de CD19 i de CD5. En l'infiltrat tiroïdal, i tant a nivell de percentatge de cèl·lules doblement positives com a nivell de mitjana de fluorescència (MIF), no s'ha demostrat una acumulació selectiva de cèl·lules B CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> quan es compara amb els percentatges i les mitjanes de fluorescència (MIF) dels limfòcits de sang perifèrica dels mateixos malalts (*figura 22*) i taules Ia i Ib de l'annex. La situació és justament a la inversa, és a dir, la mitjana del percentatge de cèl·lules B intratiroïdals que co-expressen aquests dos marcadors (3,8±9,5%) i l'índex de positivitat (198,3±265,8) són més baixos que els valors corresponents a aquestes determinacions en cèl·lules B de sang perifèrica (8,1±9,6% i 270,4±302,6 respectivament). El fet que el nombre total de cèl·lules B a la tiroide no difereixi significativament del de sang perifèrica podria indicar un augment proporcional de cèl·lules B CD5<sup>+</sup> a perifèria dels malalts amb autoimmunitat tiroïdal en percentatge ( $p=0,012$ , t Student per dades emparellades).

L'expressió d'altres molècules com CD23, CD50, CD54 i HLA DR presents en alguns casos en determinats subtipus de poblacions B també s'han investigat per citofluorimetria en les mateixes mostres tant a nivell perifèric com a la tiroide. Els resultats que es presenten a la *figura 22* demostren que:

- el percentatge de cèl·lules CD19<sup>+</sup>DR<sup>+</sup> és molt similar a ITLs i a PBLs (99,8±0,6% versus 99,5±1,4%) però que la mitjana de fluorescència als limfòcits infiltrants és menor i presenta molta menys variabilitat que a la perifèria, on la variabilitat és el doble (569,7±417,0% versus 915,6±1004,5%).
- La presència de la molècula d'adhesió CD50 segueix un patró molt similar al de DR en el sentit que els percentatges de limfòcits intratiroïdals i perifèrics que expressen CD50 són molt similars (99,1±1,7% versus 99,2±1,5) però el nivell d'expressió calculat com a mediana de fluorescència d'aquesta molècula per cèl·lula és molt variable (141,3±112,3% versus 137,4±183,2%) i superior als limfòcits intratiroïdals.
- A diferència de l'anterior molècula d'adhesió, tant el percentatge (52,7±32,4% en ITLs i 53,1±13,6% en PBLs) de cèl·lules B que expressen CD54 com la mediana de fluorescència (9,4±8,4% en ITLs i 12,1±13,6% en PBLs) i la variabilitat d'aquesta darrera són molt similars en ITLs i en PBLs.
- CD23, que hem usat conjuntament amb CD19 com a marcador d'una determinada població de cèl·lules B de centre germinal, s'expressa al mateix nivell (12,1±12,2% en ITLs i 12,2±14,0% en PBLs) i amb la mateixa intensitat (1,8±1,1% en ITLs versus 2,4±1,9% en PBLs) a limfòcits B infiltrants i a limfòcits B de sang perifèrica.

Els resultats corresponents a aquest apartat es mostren a les *figures 22 i 23*.

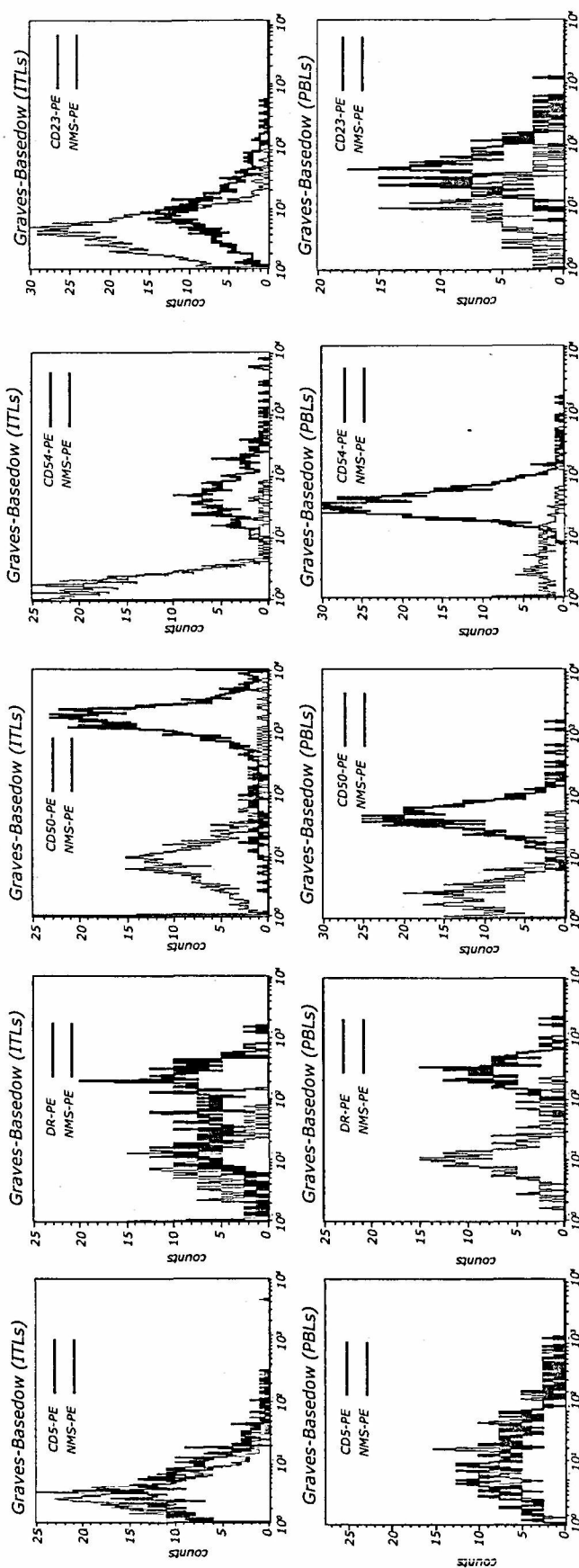
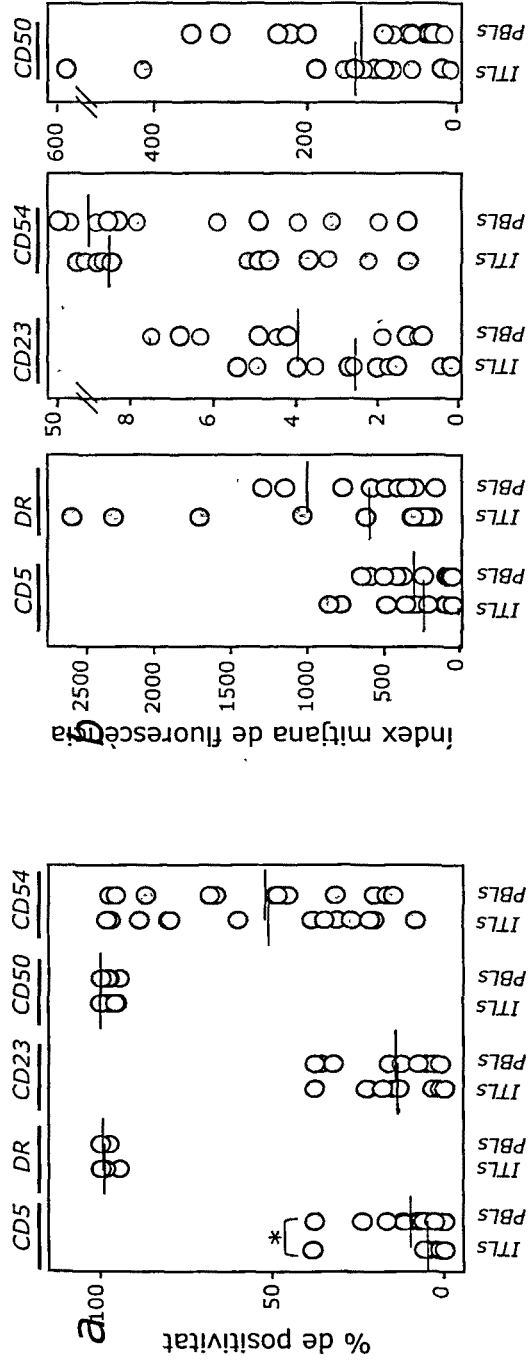


Fig. 23 Expressió de CD5, HLA DR, CD50, CD23 i CD54 a limfòcits B intratiroidals. Histogrames representatius corresponents a l'expressió de CD5, HLA DR, CD23, CD50 i CD54 en els limfòcits B intratiroidals (ITLs) i perifèrics (PBLs) d'un pacient amb malaltia de Graves-Basedow, analitzats amb una finestra d'anàlisi en la que només es consideren les cèl·lules CD19. Als ITLs, la tinció específica es mostra en color violeta mentre que la corresponent al control negatiu es mostra superposada en color gris. En els PBLs, la tinció específica es mostra en color taronja i el control negatiu en color verd fosc.





**ITLs**

	$\alpha$ Tg	$\alpha$ TPO	$\alpha$ TSHR	CD3	CD4	CD8	CD19	CD19+CD5+		CD19+HLA DR+		CD19+CD23+		CD19+CD50+		CD19+CD54+	
Mitjana	##	##	##	##	##	##	##	%	mitjana	%	mitjana	%	Index	%	Index	%	Index
Mitjana	7166,6	32,0	64,8	19,1	11,3	14,5	18,1	3,8	198,3	99,5	569,7	12,1	1,8	99,1	141,3	52,7	9,4
STDEV	27066,6	48,4	19,1	19,1	11,3	14,5	18,1	9,5	265,8	1,4	417,0	12,2	1,1	1,7	112,3	32,4	8,4

**PBLs**

	$\alpha$ Tg	$\alpha$ TPO	$\alpha$ TSHR	CD3	CD4	CD8	CD19	CD19+CD5+		CD19+HLA DR+		CD19+CD23+		CD19+CD50+		CD19+CD54+	
Mitjana	##	##	##	##	##	##	##	%	mitjana	%	mitjana	%	Index	%	Index	%	Index
Mitjana	7166,6	32,0	68,3	16,9	15,1	10,3	15,7	8,1	270,4	99,8	915,6	12,2	2,4	99,2	137,4	53,1	12,1
STDEV	27066,6	48,4	16,9	16,9	15,1	10,3	15,7	9,6	302,6	0,6	1004,5	14,0	1,9	1,5	183,2	28,7	13,6

t Student	0,589	0,002	###	0,561	0,012	0,349	0,392	0,412	0,984	0,246	0,846	0,926	0,971	0,381
-----------	-------	-------	-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Fig. 23 Representació gràfica de l'expressió de CD5, HLA DR, CD23, CD50 i CD54 en els limfòcits B intratiroidals (ITLs) i perifèrics (PBLs). Panell a: les dades s'expressen com a percentatges de positivat. Panell b: les dades s'expressen en funció de la distribució de la població que co-expressa ambdues molècules que hem considerat amb distribució normal (CD5, DR, CD23, CD50, CD54). Les poblacions amb distribució no normal es calculen i representen com a mitjana de fluorescència de les cèl·lules positives mentre que les contínues es calculen com a index (ratio entre la mitjana d'intensitat de fluorescència respecte la mitjana dels controls). Les barres horitzontals indiquen la mitjana dels valors que han estat comparats utilitzant una t Student per dades emparellades en la que (\*) indica significació estadística (p<0,05). A la taula, les columnes  $\alpha$ Tg,  $\alpha$ TPO i  $\alpha$ TSHR corresponen als títols d'autoanticossos sèrics. CD3, CD4, CD8 i CD19 estan expressats com a percentatge de cèl·lules positives respecte el total dels limfòcits.

## **4.2 PRESÈNCIA I ESTRUCTURA DELS FOL·LICLES LIMFOIDES ECTÒPICS A LA TIROIDE**

### **4.2.1 La presència de fol·licles limfoides secundaris és un fenomen extès a les tiroïdes amb autoimmunitat**

Com ja s'ha comentat, una característica gairebé constant de les glàndules que pateixen alguna malaltia autoimmunitària de la tiroide és la presència d'un infiltrat difús però, alhora, en moltes glàndules s'observa també una disposició cel·lular que és molt similar a les que s'observen als nòduls limfàtics. Aquest fet, que ja s'havia descrit sobretot en malalts amb tiroïditis de Hashimoto (i en moltes menys ocasions als malalts de Graves-Basedow), s'ha pogut constatar a les tiroïdes del nostre banc de teixit, en les que semblava que aquestes estructures "germinal center-like" eren més freqüents que el que inicialment s'havia pensat. Per tal de determinar la freqüència en què es desenvolupen a les tiroïdes estructures similars als fol·licles limfoides secundaris típics dels ganglis limfàtics, s'han utilitzat 56 glàndules per fer un criatge de la presència d'aquests mitjançant tincions de seccions amb hematoxilina/eosina en el que s'ha utilitzat aproximadament el 40% del pes total dels blocs de congelació obtinguts. S'ha considerat "presència de fol·licles limfoides ectòpics" quan es detecten infiltrats formats per una estructura externa en anell constituïda majoritàriament per cèl·lules petites basòfiles sense citoplasma evident (limfòcits) entre les quals s'intercal·len cèl·lules grans amb nucli lax i citoplasma eosinòfil (cèl·lules dendrítiques madures) que contenen al seu interior una zona formada per cèl·lules amb signes evidents d'activitat mitòtica (centroblastes), entre les que s'intercal·len macròfags i una xarxa polaritzada de cèl·lules grans amb citoplasma metabòlicament actiu similars a les dendrítiques fol·liculars (*figura 24*). A la tiroide, els fol·licles limfoides se situen majoritàriament en àrees fortament infiltrades per limfòcits, però també es troben relativament aïllats i propers a l'epiteli tiroïdal en seccions de teixit en les que la infiltració limfocitària és elevada però focal. En el nostre estudi, els LFs s'han trobat en el 100% de les glàndules dels malalts amb tiroïditis de Hashimoto (en 8 de les 8 tiroïdes estudiades) i en un 53,8% dels malalts amb Graves-Basedow (en 14 de les 26 glàndules estudiades). Per contra, només en una tiroide d'un malalt diagnosticat com a goll multinodular de les 22 que s'han criat (4,5%) s'han detectat fol·licles limfoides (*taula a figura 24*). El diagnòstic definitiu del malalt va ser de tiroïditis limfocitària.

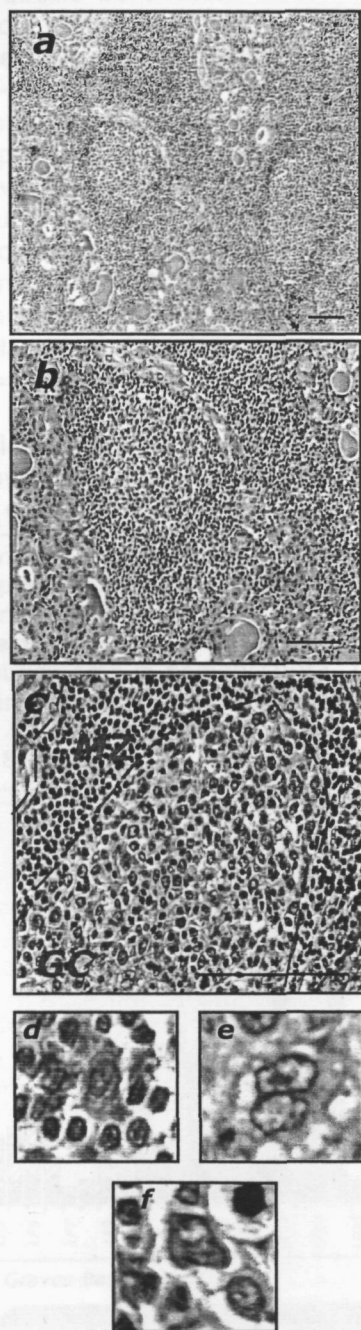
### **4.2.2 El desenvolupament de LFs intratiroïdals correlaciona amb el grau d'infiltració**

A la majoria dels malalts, els LFs només es detecten en glàndules amb forta infiltració limfocitària, definides com aquelles tiroïdes amb un contingut de limfòcits superior al 25% del total cel·lular. Per tal de confirmar aquesta observació, s'ha estudiat la correlació entre els dos fenòmens i s'ha demostrat una clara associació entre presència de LFs intratiroïdals i infiltració limfoide extensa (Mann-Whitney  $p < 0,000005$ ) (*taula figura 24*). Malgrat això cal comentar que, excepcionalment, en algunes glàndules en què el grau d'infiltració és elevat, no s'han detectat LFs amb GCs evidents, potser degut al mètode de criatge que es veu esbiaixat en funció del material a l'abast.

### **4.2.3 Els fol·licles limfoides ectòpics estan formats per un mantell fol·licular i un centre germinal**

Els LFs intratiroïdals estan formats per un mantell (MZ, mantle zone) de cèl·lules petites basòfiles en les que és difícil identificar el citoplasma, entre les quals s'hi troben intercal·lades cèl·lules més grans amb perllongacions citoplasmàtiques extenses. Aquesta estructura envolta un centre germinal (GC) interior ben desenvolupat. Les cèl·lules que el formen es veuen polaritzades en: a/ una zona fosca (DZ) formada majoritàriament per limfoblastes amb nucli gran que conté de dos a tres nuclèols amb signes evidents d'activitat (cèl·lules en mitosi) i per altres limfòcits i b/ una zona clara adjacent (LZ) amb limfòcits més petits amb característiques de centròcits entre el quals se situen cèl·lules

grans amb nucli evident i cromatina propera a la membrana nuclear, citoplasma gran amb extensions prominents eosinòfiles formant una xarxa, que recorden les cèl·lules dendrítiques fol·liculars (FDCs) (figura 24). Fora d'aquests fol·licles, en l'infiltrat, s'observen cèl·lules plasmàtiques amb el nucli en roda de carro característic. En ocasions excepcionals el fol·licle limfoide no s'estructura al voltant dels tiròcits sinó que sembla que l'hagi inclòs, de forma que és possible observar cèl·lules amb aspecte epitelial al centre germinal.



mostra	% infiltració	presència LFs
GD228	ND	1 (11)/2 (1)
GD255	55.2	1 (1)
GD257	70.2	1 (3)
GD258	ND	1 (1)
GD278	ND	1 (1)
GD373	27.7	1 (1)
GD378	30.0	1 (1)
GD381	19.5	NO
GD389	9.6	NO
GD390	7.0	NO
GD391	4.9	NO
GD393	43.4	1 (1)
GD394	4.8	NO
GD403	38.8	2 (3)
GD412	20.0	1 (4)
GD413	5.2	NO
GD416	9.2	NO
GD417	9.5	NO
GD423	10.2	NO
GD424	54.5	NO
GD425	11.4	NO
GD426	45.4	1 (2)
GD427	ND	1 (1)
GD429	50.0	3 (2)
GD430	10.6	1 (1)
GD98/001	4.2	NO
HT290	ND	2 (1)
HT384	66.6	1 (5)
HT385	76.6	1 (1)
HT98/001	21.8	5 (8)
HT98/002	76.8	4 (7)
HT98/003	80.7	3 (7)
HT98/004	56.7	2 (9)
HT98/005	68.4	1 (6)
MNG359	5.2	NO
MNG360	1.3	NO
MNG361	0.3	NO
MNG362	6.1	NO
MNG364	12.0	1 (1)
MNG376	3.5	NO
MNG379	6.8	NO
MNG395	7.2	NO
MNG396	3.9	NO
MNG399/TF	21.7	1 (1)
MNG98/01	20.6	NO
MNG98/02	11.7	NO
MNG98/03	3.0	NO
MNG98/04	2.3	NO
MNG98/05	2.0	NO
MNG99/06	2.2	NO
MNG99/07	0.3	NO
MNG99/08	6.5	NO
MNG99/09	6.1	NO
MNG99/010	8.2	NO
MNG99/011	4.4	NO
MNG99/012	4.5	NO

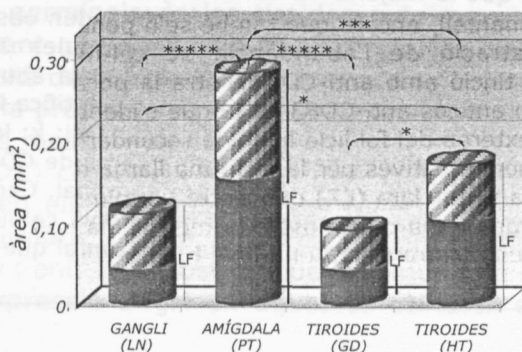
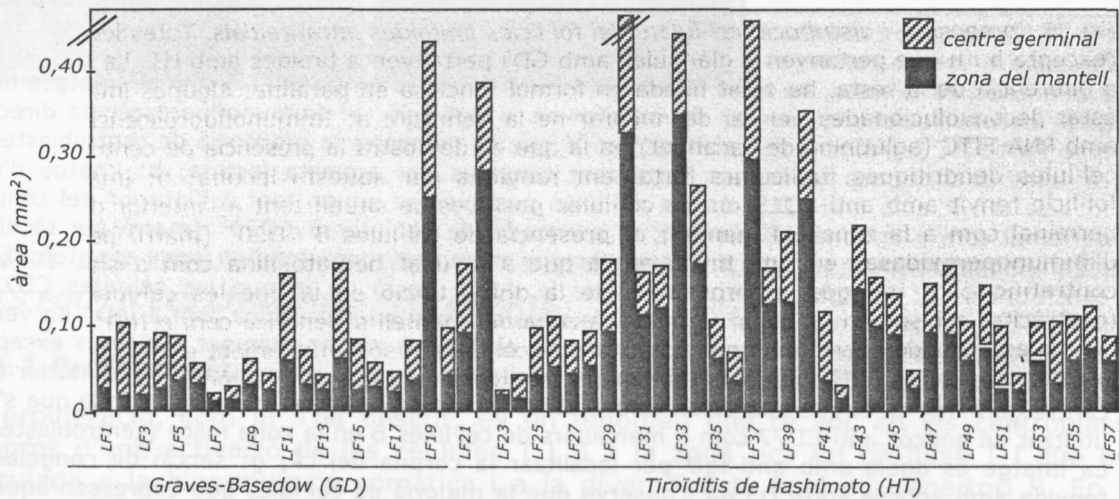
Fig. 24 Aspecte del teixit limfoide intratiroidal estructurat. a-c: Imatges d'H/E dels FLs amb GCs en l'infiltrat limfocitari difús en el que es conserven fol·licles tiroïdals característics; d-f: macròfag en l'interior d'un centre germinal envoltat de limfòcits, cèl·lules dendrítiques fol·liculars i cèl·lules dendrítiques a la zona del mantell fol·licular respectivament. Taula: relació entre el percentatge d'infiltració limfocitària en cada glàndula i la presència de fol·licles limfoides ectòpics. MZ: zona del mantell; GC: centre germinal. Els augments utilitzats en cada microfotografia es mostren amb una línia horitzontal que en tots els casos equival a 100µm.



**4.2.4 Els fol·licles limfoides dels GD són similars als del ganglis limfàtics mentre que els de HT són semblants als de les amígdales**

Observacions inicials indicaven que els LFs de les diferents glàndules diferien en mida i en complexitat i que el grau de desenvolupament semblava relacionat amb el diagnòstic clínic. Així, els LFs presents en les tiroïditis de Hashimoto eren molt més abundants i més grans (en una secció de criòstat de 50mm<sup>2</sup> es poden observar 30 fol·licles limfoides) i tenien un aspecte global molt semblant al de les amígdales, mentre que els dels malalts de Graves-Basedow eren més petits, menys abundants (en una secció equivalent es poden trobar 1-6 LFs) i similars als que es troben en els ganglis limfàtics. A més, el grau de desenvolupament del mantell fol·licular era variable ja que en els Hashimoto semblava poc desenvolupat respecte la resta d'estructura fol·licular mentre que als malalts de Graves-Basedow ocupava una zona extensa de l'estructura. Per tal de demostrar aquest fet, s'han mesurat les àrees totals, les àrees del mantell i les àrees del centre germinal de 122 LFs escollits a l'atzar d'entre 26 amígdales (PT), 39 ganglis limfàtics (LN), 20 Graves-Basedow (GD) i 37 Hashimotos (HT). Els resultats obtinguts (*taula II annex i figura 25*) confirmen les observacions inicials. Les àrees dels LFs, tant pel que fa al mantell fol·licular com al centre germinal, als GD i als HT són significativament diferents ( $p=0,0020$  i  $p=0,0174$  respectivament, t Student). Els que es troben als Hashimoto són similars als de les amígdales palatines: més grans, amb un centre germinal interior ben desenvolupat i amb un mantell relativament petit. En canvi, els que es formen als Graves-Basedow són semblants als dels nòduls limfàtics: més petits i amb una proporció mantell/centre germinal més alta.

*Fig. 25 Morfometria dels fol·licles limfoides intratiroidals. Gràfica superior: proporció relativa de l'àrea ocupada pel centre germinal (part ratllada de les barres) i l'ocupada pel mantell fol·licular (part gris sòlid) en els 57 fol·licles limfoides estudiats. Aquests corresponen a 21 tiroïdes de pacients amb malaltia de Graves-Basedow i amb tiroïditis de Hashimoto. Cada fol·licle s'identifica amb la nomenclatura "LF" seguida del nombre corresponent. A la gràfica inferior esquerra es representen les mitjanes dels valors de morfometria obtinguts en relació al diagnòstic clínic. Taula: valors de les mitjanes i les desviacions estàndard i valors de significació (t Student). \*\*\*\*,  $p<0,001$ ; \*\*\*,  $p<0,005$ ; \*,  $p<0,01$ .*



	GC	MZ	LF
GANGLI (LN)	0,043±0,02	0,071±0,02	0,113±0,05
AMÍGDALA (PT)	0,148±0,02	0,128±0,08	0,275±0,08
TIROÏDES (GD)	0,042±0,05	0,054±0,04	0,096±0,09
TIROÏDES (HT)	0,102±0,09	0,065±0,06	0,166±0,12

	t Student
LN-PT	$p=0,000049$
GD-HT	$p=0,017$
HT-LN	$p=0,03$
PT-GD	$p=0,000025$
PT-HT	$p=0,0033$

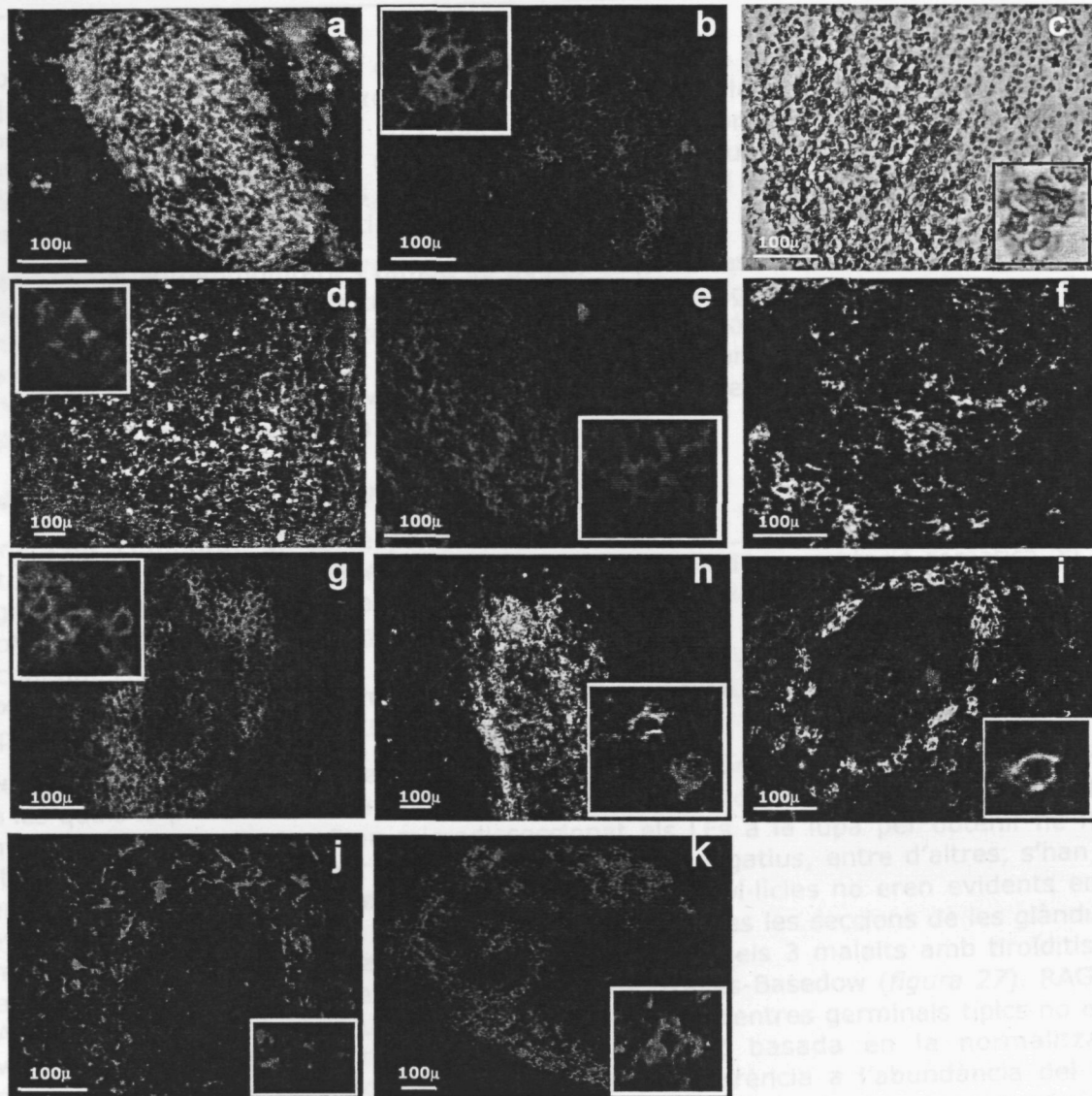
### 4.3 L'ESTRUCTURA I LA COMPOSICIÓ DELS FOL·LICLES LIMFOIDES TERCIARIS SÓN IDÈNTIQUES A LES DELS CANÒNICS

La presència de fol·licles limfoides secundaris s'ha confirmat per tinció amb PNA-FITC (figura 26) que és una lectina de cacahuet que s'uneix específicament a les cèl·lules dels centres germinals (tant centroblastes com dendrítiques fol·liculars) encara que també s'uneix inespecíficament a l'endoteli vascular, cosa que ha estat útil per identificar els centres germinals en seccions consecutives. La composició cel·lular i la seva distribució s'han estudiat i confirmat mitjançant IFL amb tincions amb una sèrie de marcadors fenotípics característics de cèl·lules B (CD19, CD20, CD77, CD79, IgM, IgD, IgG), cèl·lules B de centre germinal (CD23, CD38), cèl·lules T (CD3, CD4, CD8), cèl·lules dendrítiques madures (CD83), cèl·lules dendrítiques fol·liculars (CD21L), i macròfags (CD14, CD68).

#### 4.3.1 Les cèl·lules B, T, dendrítiques i dendrítiques fol·liculars formen majoritàriament els fol·licles limfoides tiroïdals

La composició cel·lular de la zona externa al fol·licle limfoide es correspondria amb la de les cèl·lules formadores de la zona rica en cèl·lules T (*T-cell rich zone*) que són predominantment CD5<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (però també CD5<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en menys proporció) en els fol·licles limfoides canònics. En una àrea més interna, les que formen part del mantell fol·licular s'han definit majoritàriament com *limfòcits B fol·liculars* CD19<sup>baix</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD23<sup>-/baix</sup>CD79<sup>baix</sup>CD5<sup>-</sup> entre les quals s'hi intercal·len cèl·lules T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> i cèl·lules dendrítiques amb fenotip madur CD83<sup>+</sup>. Aquestes darreres formen una xarxa important de cèl·lules grans que envolten els limfòcits T i B i que també poden estar distribuïdes aleatòriament per l'infiltrat limfocitari difús. El centre germinal està format per les dues poblacions de limfòcits B característiques: els centroblastes IgM<sup>-/baix</sup>IgD<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>CD77<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD19<sup>baix</sup>CD20<sup>+</sup> polaritzats en la zona fosca i els centròcits característics IgM<sup>-/baix</sup>IgD<sup>-</sup>CD77<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD19<sup>baix</sup>CD20<sup>+</sup> en la zona clara, intercal·lats en una xarxa de cèl·lules dendrítiques fol·liculars CD21L<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD77<sup>+</sup>.

*Fig 26 Composició i distribució cel·lulars del fol·licles limfoides intratiroidals.* Totes les seccions (excepte b i n que pertanyen a glàndules amb GD) pertanyen a tiroïdes amb HT. La secció c/, a diferència de la resta, ha estat fixada en formol i inclosa en parafina. Algunes imatges han estat deconvolucionades per tal de millorar-ne la definició. a: Immunofluorescència directa amb PNA-FITC (aglutinina de cacahuet) en la que es demostra la presència de centroblastes i cèl·lules dendrítiques fol·liculars fortament tenyides per aquesta lectina; b: imatge d'un fol·licle tenyit amb anti-CD19 on les cèl·lules positives se situen tant a l'interior del centre germinal com a la zona del mantell; c: presència de cèl·lules B CD20<sup>+</sup> (marró per tècnica d'immunoperoxidasa) en una tinció en la que s'ha usat hematoxilina com a sistema de contratinció; d: imatges superposades de la doble tinció en la que les cèl·lules CD23<sup>+</sup> (centròcits) s'observen de color vermell i la zona del mantell s'identifica com a IgD<sup>+</sup> en verd. Les àrees ocupades per ambdues poblacions de cèl·lules B són mútuament excloents excepte les que ocupen les FDCs que són doblement positives; e: tinció de centròcits en l'interior del centre germinal en el que apareixen com a CD38<sup>+</sup>; f: imatge similar a l'anterior en la que s'ha utilitzat un anticòs anti-CD77 com a marcadors de cèl·lules B en la zona fosca (centroblastes). La imatge és doble amb anti-IgD per localitzar la corona del LF; g: secció de congelació tenyida amb anticòs anti-CD3 on s'observa que la majoria de cèl·lules que expressen aquest co-receptor se situen a la zona externa del mantell, encara que també se'n poden observar a l'interior del centre germinal; h: demostració de l'abundància de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> principalment en el mantell fol·licular; i: la tinció amb anti-CD8 mostra la poca abundància relativa d'aquesta subpoblació; j: Tinció amb anticòs anti-CD83 en la que s'identifica la xarxa de cèl·lules dendrítiques madures a la zona externa del fol·licle limfoide secundari; k: les FDCs s'identifiquen com a cèl·lules grans intensament positives per la isoforma llarga de CD21, que s'estructuren com a xarxes polaritzades en la zona clara (LZ) del centre germinal. Cadascuna de les imatges inclou una amplificació d'alguna zona que mostra la morfologia cel·lular. Els augments utilitzats en cada microfotografia es mostren amb una línia horitzontal que en tots els casos equival a 100µm.



#### 4.4 A LES TIROIDES AUTOIMMUNITÀRIES TENEN LLOC ELS PROCESSOS TÍPICS DELS FOL·LICLES LIMFOIDES SECUNDARIS

##### 4.4.1 Proliferació

La proliferació, com ja s'ha descrit, és un fenomen que té lloc en els centroblastes després d'una activació de les cèl·lules T i B a la zona rica en cèl·lules T i que està vinculada a la hipermutació somàtica i a la diversificació final del repertori B. En els centres germinals de les tiroides autoimmunitàries s'observen cèl·lules que proliferen activament quan s'utilitza anticòs anti-Ki67 com a marcador de divisió cel·lular tant en els malalts de Graves-Basedow com en les tiroiditis de Hashimoto, encara que en aquests darrers la proporció de cèl·lules en proliferació és més elevada. En tots casos les cèl·lules positives mostren un marcatge nuclear i el seu patró de distribució orientat cap a la zona fosca (DZ) coincideix amb el dels centroblastes, amb una disposició igual que la que presenten els centroblastes del fol·licle linfòide secundari de l'amígdala palatina i del gangli limfàtic (figura 27). Les tincions d'immunofluorescència dobles amb anticòs anti-IgD i anti-IgM mostren que la majoria de cèl·lules Ki-67 positives no expressen IgD i que l'expressió d'IgM en aquestes cèl·lules és nul·la o molt poc intensa. En mostres



escollides en funció del tant per cent d'infiltració limfocitària de la tiroide, s'ha quantificat mitjançant citometria de fluxe el percentatge de cèl·lules B en proliferació per incorporació de iodur de propidi (IP) sobre cèl·lules seleccionades per expressió de CD19 en membrana cel·lular. El valor mitjà de proliferació obtingut se situa al voltant del 15% de les cèl·lules CD19<sup>+</sup> amb uns marges que van del 7% al 30% en funció del nombre i mida de fol·licles limfoides intratiroidals que s'hagin format a la glàndula.

A les tiroides autoimmunitàries també es poden observar estructures similars als nòduls primaris dels ganglis limfàtics com a grups de cèl·lules B IgM<sup>+</sup> que no contenen centres germinals a l'interior. En aquestes formacions, la proliferació és pràcticament inexistent i, quan és detectable, es localitza en cèl·lules situades a la zona més externa del fol·licle. A la resta de la glàndula, s'observa un nombre molt reduït de cèl·lules infiltrants i tiroïdals disperses que són positives amb anti-Ki67.

#### 4.4.2 Reordenaments secundaris

Com s'ha comentat al corresponent apartat, RAG1 i RAG2 formen un complex heterodimèric que juga un paper fonamental en el procés d'hipermutació somàtica en els òrgans limfoides secundaris en una resposta immunitària activa. La presència de la proteïna nuclear no s'ha pogut determinar per manca dels reactius apropiats que reconeguessin RAG1 i RAG2 humans, per això en aquest estudi hem determinat l'expressió d'ambdós enzims mitjançant RT-PCR i hibridació posterior amb oligosondes específiques i mitjançant RT-PCR *in situ*.

Per a RT-PCR convencional s'han obtingut de 4 a 10 seccions de congelació consecutives, de les quals la primera s'ha utilitzat en una tinció H/E per detectar els fol·licles limfoides. En les seccions següents s'han microdisseccionat els LFs a la lupa per obtenir-ne RNA total i cDNA com a motllo per la PCR. Com a controls negatius, entre d'altres, s'han fet servir seccions de les mateixes tiroïdes en les que els fol·licles no eren evidents en la seva estructura característica. Pel que fa als resultats, totes les seccions de les glàndules amb GCs evidents han resultat RAG1<sup>+</sup> i RAG2<sup>+</sup>, tant en els 3 malalts amb tiroïditis de Hashimoto estudiats com en els 4 amb malaltia de Graves-Basedow (*figura 27*). RAG1 o RAG2 s'ha trobat positius en una glàndula en la que els centres germinals típics no eren evidents. La quantificació relativa de RAG1 i RAG2 basada en la normalització densitomètrica de la hibridació dels amplífers en referència a l'abundància del gen GAPDH en cada mostra, demostra que l'expressió d'ambdós enzims supera en més d'un 50% la mateixa en l'amígdala palatina i en el gangli limfàtic. La proporció relativa del mRNA de RAG1 i RAG2 no és constant, de forma que en algunes glàndules hem trobat més missatge pel primer mentre que a d'altres tiroïdes el mRNA de RAG2 és més abundant.

La segona aproximació pretenia no només detectar el mRNA sobre les seccions de tiroïdes sinó també estudiar la seva distribució en l'interior del fol·licle i identificar les cèl·lules responsables de la seva expressió. Per això s'ha retrotranscrit el mRNA de RAG1 i s'ha dut a terme una PCR sobre el teixit de congelació prèviament fixat i sotmès a digestió amb DNAsa. El senyal detectat s'ha trobat restringit al citoplasma de poques cèl·lules polaritzades en una de les àrees del centre germinal mentre que no hem detectat senyal positiu ni als limfòcits que formen part del mantell fol·licular, ni als presents a l'infiltrat limfocitari difús ni als tiròcits (*figura 27*).

És conegut que en els reordenaments secundaris la participació de l'enzim Tdt contribueix a la inserció de N-nucleòtids en el fragment CDR3 per tal d'augmentar la diversitat. La seva expressió s'ha estudiat a nivell de seccions de criostat de tiroïdes que contenen centres germinals en els que s'ha observat la presència de l'enzim en un nombre reduït de cèl·lules en l'interior del fol·licle limfoide que es troben en àrees restringides. En les glàndules infiltrades però sense centres germinals ectòpics i en aquelles en que la infiltració limfocitària no supera el 10% del total cel·lular, no s'ha arribat a detectar mai la presència de TdT.

### 4.4.3 Apoptosi

La mort cel·lular programada a les cèl·lules B dels fol·licles limfoides és el resultat del trencament del balanç entre els senyals pro-apoptòtics i anti-apoptòtics. En aquest sentit s'ha estudiat mitjançant immunofluorescència l'expressió de CD95/CD195 i de Bcl-2 com a molècules involucrades en l'establiment d'aquest balanç. En l'interior dels centres germinals i d'acord amb els resultats esperats, una bona part dels centroblastes són CD95<sup>+</sup>Bcl2<sup>-</sup> mentre que els centròcits, les cèl·lules B IgD<sup>+</sup> verges i les cèl·lules B memòria que formen part de la zona del mantell fol·licular són CD95<sup>-</sup>Bcl2<sup>+</sup> (figura 28). L'expressió de CD195 s'ha trobat restringida a algunes cèl·lules T CD3<sup>+</sup> de l'interior dels centres germinals i a algunes cèl·lules dendrítiques CD83<sup>+</sup> distribuïdes a l'exterior.

Després de l'estudi per immunofluorescència sobre les seccions s'ha observat que, encara que la distribució d'aquestes molècules a les tiroïdes és l'esperada, el nivell i la quantitat de cèl·lules B que expressen Bcl2, encara que era variable, sembla superior al trobat en altres òrgans limfoides secundaris utilitzats com a referència. Ja que aquest fet podia tenir conseqüències a nivell de selecció negativa en els centres germinals intratiroidals s'ha dut a terme la detecció i quantificació de l'apoptosi als fol·licles limfoides de les tiroïdes per la reacció de TUNEL i contrateixió amb hematoxilina. Com era d'esperar, la majoria de cèl·lules que formen part dels fol·licles limfoides són TUNEL<sup>-</sup>. Els nuclis apoptòtics TUNEL<sup>+</sup> (identificats com aquells amb condensació de cromatina) s'han detectat majoritàriament distribuïts en la zona clara (LZ) dels centres germinals (figura 28). A la resta del fol·licle (zona fosca i mantell fol·licular) s'han observat algunes cèl·lules TUNEL<sup>+</sup> disperses i en cap cas s'han detectat cèl·lules epitelials apoptòtiques.

Donat que es feia evident una relació entre el percentatge de limfòcits B apoptòtics i la patologia tiroïdal, s'han quantificat el nombre de nuclis apoptòtics per mm<sup>2</sup> en tiroïdes de pacients amb HT, amb GD i d'amígdala palatina (PT) utilitzada com a teixit de referència (taula III annex). D'acord amb l'observació al microscopi, el nivell d'apoptosi als HT és molt similar al de l'amígdala, tant a nivell d'apoptosi en l'interior del centre germinal (370,2±186 als HT i 328,10±99,4 a les PT; p sense significació estadística) com a nivell de fol·licle limfoide total (277,5±141,11 als HT i 179,68±63,32 a les PT; p=0,034). A diferència dels anteriors, als fol·licles limfoides dels malalts amb GD, el nivell d'apoptosi és molt inferior (126,39±57,6 al GCs i 70,40±27,41 als LFs; p<10<sup>3</sup> en ambdós t Student).

### 4.4.4 Canvi d'isotip

Un altre fenomen que té lloc durant la reacció centre germinal és el canvi d'isotip, en el que la col·laboració B-T que es dona principalment a través de l'expressió de CD40 a la superfície de la cèl·lula B i de CD154 a la del limfòcit T és fonamental. Els fol·licles limfoides de les tiroïdes amb autoimmunitat contenen en el centre germinal una població petita en nombre de cèl·lules B CD40<sup>+</sup> i una subpoblació de cèl·lules B amb fenotip IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD154<sup>+</sup> a la zona rica en cèl·lules T. A la vegada, CD40 també s'observa en una població de cèl·lules dendrítiques interdigitants a la zona equivalent a l'àrea paracortical dels nòduls limfàtics en àrees d'infiltració difusa on predominen les cèl·lules T CD3<sup>+</sup>.

*Fig. 27 Proliferació i reordenaments en els fol·licles limfoides de les tiroïdes. a: immunofluorescència indirecta amb anticòs contra Ki67 en la que es mostra la proliferació dels centroblastes polaritzada a la zona fosca del fol·licle limfoide d'una glàndula amb tiroïditis de Hashimoto; b: demostració mitjançant doble immunofluorescència de l'existència de cèl·lules en proliferació (vermell, anti-Ki67) polaritzades en una zona del centre germinal en la que es mostra en verd la localització de les cèl·lules B de la zona del mantell fol·licular identificades com a IgD<sup>+</sup> i en les que no s'observen cèl·lules en divisió activa; c: mostra representativa de la quantificació del nombre de cèl·lules en proliferació (G2/M) en les tiroïdes que contenen fol·licles limfoides mitjançant incorporació de iodur de propidi (IP) en suspensions de limfòcits intratiroidals i posterior anàlisi per citometria de flux de les cèl·lules seleccionades en funció de l'expressió de CD19; d: identificació de cèl·lules en proliferació (vermell amb anti Ki-67) en estructures similars als fol·licles limfoides primaris formats per cèl·lules IgM<sup>+</sup> (verd);*

e: expressió de RAG1 i RAG2 en glàndules de malalts amb tiroïditis de Hashimoto i de Graves-Basedow, mesurades mitjançant RT-PCR i posterior hibridació amb oligosondes específiques. A la zona inferior es mostra la normalització parcial del cDNA usant GAPDH com a gen constitutiu d'expressió mitjana de referència; f: representació gràfica de la quantificació de l'expressió de RAG1 (verd) i de RAG2 (taronja) per densitometria corregida per GAPDH. Els asteriscs indiquen les tiroïdes en que eren visibles els fol·licles limfoides amb centres germinals i les línies horitzontals indiquen el nivell d'expressió de cada gen en les amígdales preses com a teixit de referència. g: imatge de la RT-PCR *in situ* per RAG1 sobre una secció de tiroïditis de Hashimoto i en la que es mostra una microfotografia d'un detall a més augment. TMB: timus humà; PT: amígdala palatina; LN: gangli limfàtic; CT: esòfag (control de teixit). Els augments utilitzats en cada microfotografia es mostren amb una línia horitzontal que en tots els casos equival a 100µm.

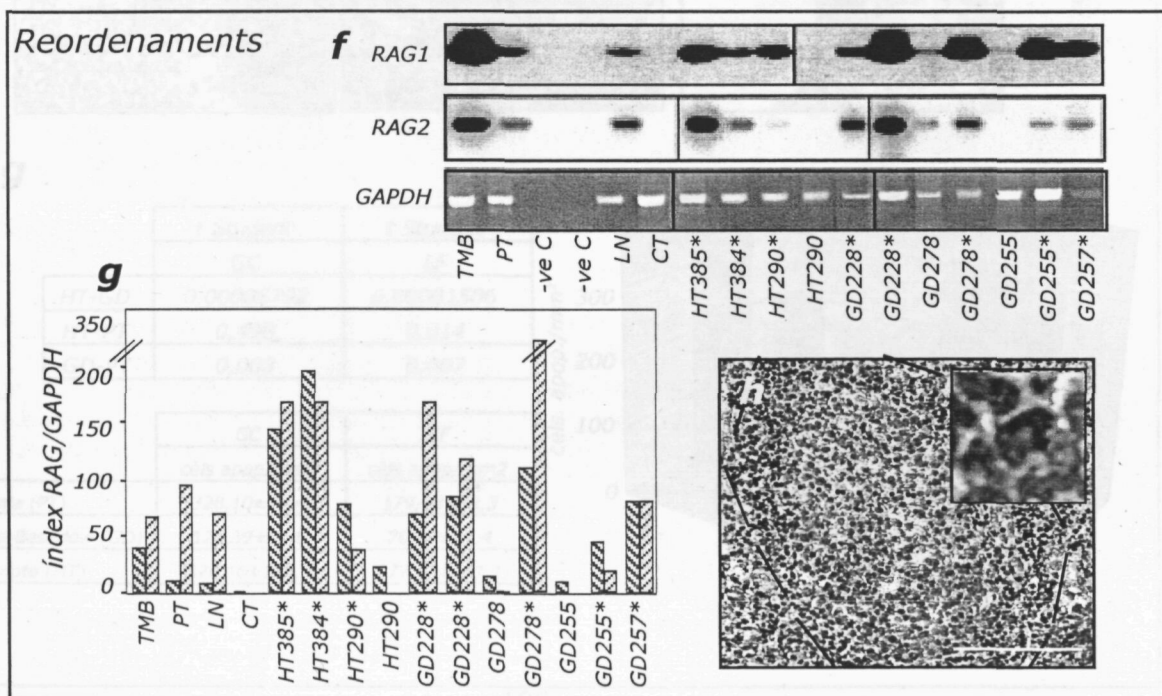
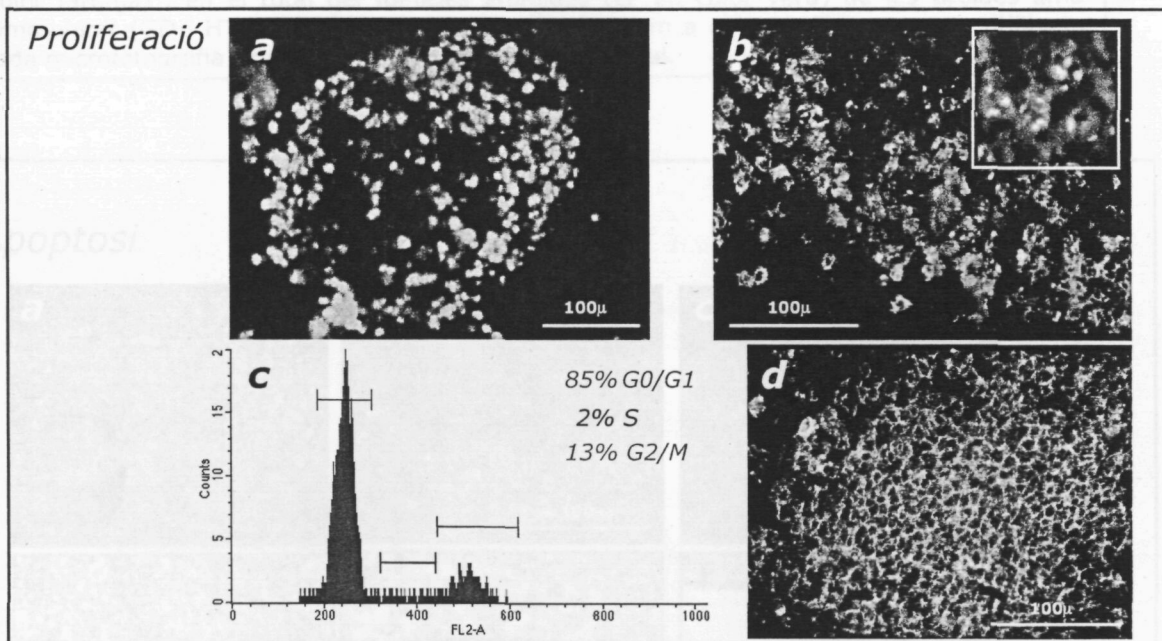
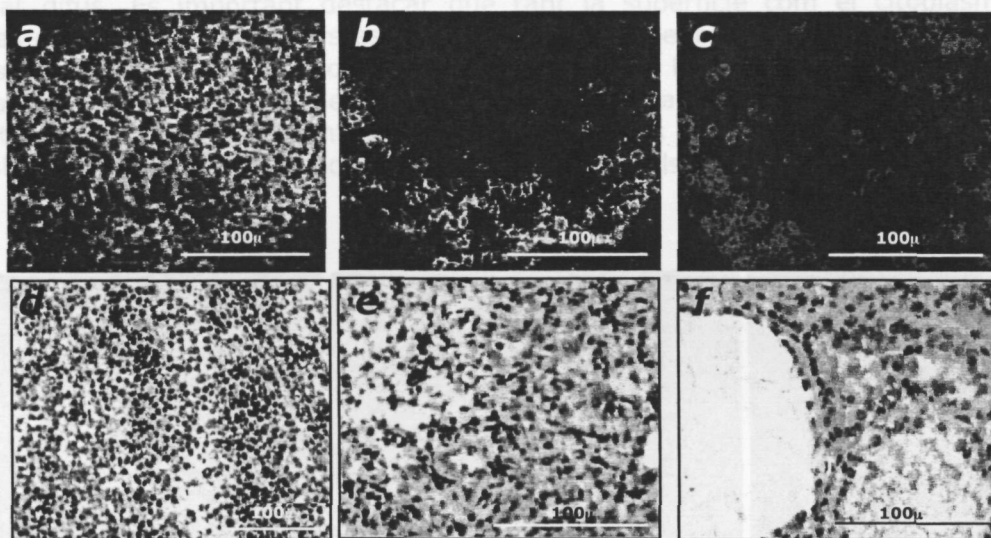




Fig. 28 Expressió de molècules involucrades en l'apoptosi i demostració de cèl·lules TUNEL<sup>+</sup> en els fol·licles limfoides de les tiroïdes. a: doble exposició d'una immunofluorescència doble en la que CD95 s'observa en vermell en cèl·lules de l'interior del centre germinal i anti-IgD (en verd) s'utilitza com a marcador de la zona del mantell fol·licular on se situen les cèl·lules B madures. La colocalització d'ambdues molècules només es dona en un petit percentatge de cèl·lules a l'interior del centre germinal; b-c: detecció de bcl2 (vermell) i d'IgD (verd) en un fol·licle d'un pacient amb tiroïditis de Hashimoto en el que s'observa una expressió de bcl-2 força restringida al mantell fol·licular encara que també es troben cèl·lules positives al centre germinal; d: imatge de la detecció de cèl·lules en una fase apoptòtica avançada (TUNEL<sup>+</sup> en color vermell) en la que la majoria se situen al centre germinal en una disposició molt similar a la de les cèl·lules CD95<sup>+</sup> (probablement centroblastes). A l'exterior del fol·licle limfoide la quantitat de cèl·lules TUNEL<sup>+</sup> es veu molt reduïda; e: nivell d'apoptosi a l'infiltrat sense estructurar d'una criosecció de tiroïdes d'un malalt amb hipotiroïdisme; f: imatge ampliada de dos fol·licles tiroïdals en els que a la zona superior s'identifica una zona d'infiltració limfocitària i en la que en cap cas s'han trobat tiròcits TUNEL<sup>+</sup>; g: gràfica i taules que representen la mediana del nombre de cèl·lules apoptòtiques per mm<sup>2</sup> en l'interior del centres germinals (GC en color taronja) i en el total del fol·licles limfoides (LF en color verd) de les tiroïdes amb autoimmunitat (GD i HT) i de les amígdales utilitzades com a control. Els augments utilitzats en cada microfotografia es mostren amb una línia horitzontal.

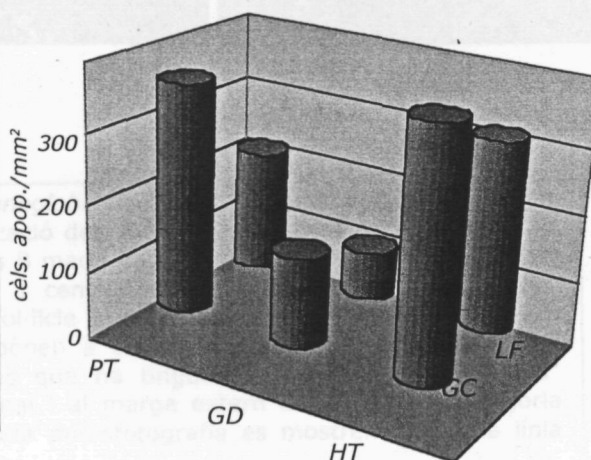
## Apoptosi



**g**

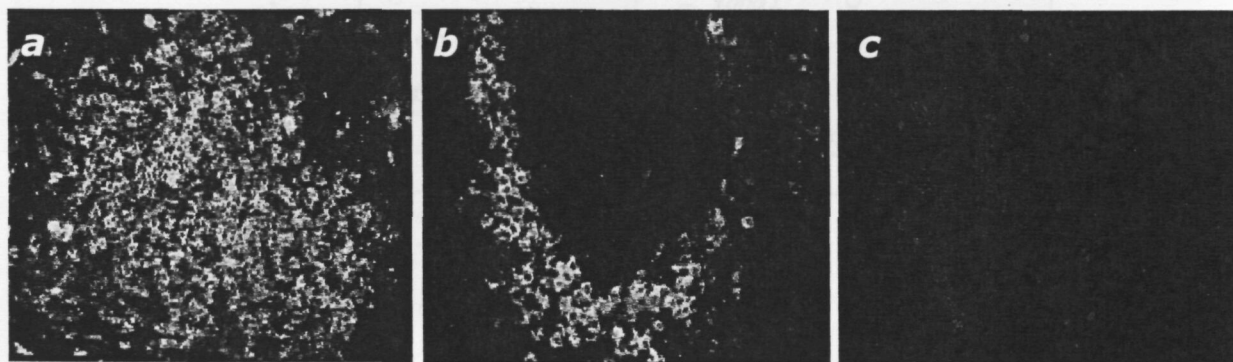
	<i>t Student</i>	<i>t Student</i>
	GC	LF
HT-GD	0,00005792	0,00001506
HT-PT	0,498	0,014
GD-PT	0,003	0,007

	GC	LF
	cèls apop./mm <sup>2</sup>	cèls apop./mm <sup>2</sup>
amígdala (PT)	328,10±99,4	179,68±63,3
Graves-Basedow (GD)	126,39±57,6	70,40±27,4
Hashimoto (HT)	370,16±186,3	277,53±141,1



#### 4.5 A LES TIROIDES AMB CENTRES GERMINALS ECTÒPICS ES DETECTEN IGGs I IGMs

La reacció de centre germinal permet la generació de cèl·lules B madures sIgG<sup>+</sup> d'alta afinitat precursors de les cèl·lules plasmàtiques productores d'IgGs a partir de cèl·lules B amb fenotip IgM<sup>-baix</sup>IgD<sup>-</sup> fundadores del centre germinal. Pel que fa a les immunoglobulines que es detecten a les cèl·lules B de les tiroides autoimmunitàries amb fol·licles limfoides ectòpics, es poden observar diferents fenotips, alguns dels quals coincideixen amb els descrits al nòduls limfàtics i d'altres lleugerament diferents (*figura 29*). Així, es troben: una població de cèl·lules B fundadores IgD<sup>+</sup> presents al mantell fol·licular (que es correspondrien amb les poblacions també anomenades Bm1 i Bm2) i que presenten majoritàriament un marcatge de membrana (encara que no es descarta la tinció citoplasmàtica). Aquestes, en determinades zones al mantell fol·licular es desdoblarien en dues subpoblacions en funció de l'expressió d'IgM en Bm2' (IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) i Bm3δ (IgD<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>). Ja en el centre germinal apareixeria la població Bm3 en funció de la pèrdua total d'IgD i el manteniment d'IgM. Aquesta població és, en algunes glàndules, numèricament molt important i pot arribar a fer el 50% de les cèl·lules B dels fol·licles. La darrera població que s'observa és la formada per les cèl·lules IgG<sup>+</sup>, que en tots els fol·licles limfoides té una distribució més perifèrica però que en alguns centres germinals s'observa també al seu interior. El percentatge de cadascuna d'aquestes subpoblacions varia en cada glàndula i amb la patologia considerada, ja que, en general, a les glàndules amb malaltia de Hashimoto, les cèl·lules IgG<sup>+</sup> semblen més restringides als fol·licles limfoides, mentre que a les dels Graves-Basedow es detecten tant als fol·licles com a l'infiltrat difús. És important destacar que tant la superfície com el citoplasma de les cèl·lules dendrítiques fol·liculars es tenyeixen positivament en seccions de tiroides en les que es detecten Igs amb anticossos contra IgMs i IgGs humanes. Tal com s'ha comentat a l'apartat en el que es considerava la proliferació, en algunes tiroides també s'observen estructures formades únicament per cèl·lules agrupades IgM<sup>+</sup> que recordarien per la seva disposició l'estructura dels fol·licles limfoides primaris dels nòduls limfàtics.



*Fig. 29 Presència de cèl·lules B amb immunoglobulines dels diferents isotips. Imatges d'immunofluorescència que permeten la identificació dels diferents subgrups de cèl·lules B. a: cèl·lules B IgD<sup>+</sup> al mantell fol·licular; b: cèl·lules B madures que han adquirit l'expressió d'IgM en diferents quantitats (centroblastes IgM<sup>baix</sup> i centròcits IgM<sup>+</sup>) després d'haver perdut l'expressió d'IgD en una zona més interna del fol·licle limfoide. Les cèl·lules més intensament tenyides i localitzades a la zona clara corresponen a cèl·lules dendrítiques fol·liculars que expressen receptors de Fc; c: cèl·lules en les que ha tingut lloc el canvi d'isotip, IgG<sup>+</sup> restringides a un pol concret del centre germinal i al marge extern del fol·licle. La majoria d'FDC són IgG<sup>alt</sup>. Els augments utilitzats en cada microfotografia es mostren amb una línia horitzontal que en tots els casos equival a 100µm.*

## 4.6 LES CÈL·LULES B I LES CÈL·LULES PLASMÀTIQUES INTRATIROIÐALS ESTAN PRE-DESTINADES A RECONÈIXER AUTOANTÍGENS TIROIÐALS

### 4.6.1 El desenvolupament de LFs intratiroiðals s'associa amb el títol sèric d'autoanticossos específics d'antígens tiroïdals

Una de les conseqüències de la reacció centre germinal és la generació de cèl·lules B capaces de produir anticossos amb alta afinitat per l'antigen que reconeixen. En el sèrum de malalts amb autoimmunitat tiroïdal, la presència d'autoanticossos tipus IgG específics de tiroide és un fet comú (que varia en funció de la patologia considerada), però la procedència d'aquests o la contribució relativa dels centres germinals ectòpics a la seva producció resta per aclarir. Donat que s'ha descrit una disminució en el títol dels autoanticossos després d'una tiroïdectomia total o subtotal, sembla plausible considerar que part d'aquests anticossos s'estiguin produint al propi teixit diana, per la qual cosa hem investigat la relació entre presència de fol·licles limfoides secundaris intratiroiðals i nivells d'autoanticossos sèrics. Considerant totes les mostres globalment com afectes d'autoimmunitat tiroïdal (ja que tant als malalts amb tiroïditis de Hashimoto com als malalts amb malaltia de Graves-Basedow es troben anticossos contra TPO i contra Tg), hem observat una clara associació entre la presència de LFs intratiroiðals i els nivells d'anti-TPO ( $p < 0,00860$ , test Mann-Whitney) però no d'anti-Tg, encara que sí que es demostra una tendència ( $p = 0,053$ ) (figura 30). Pel que fa al TSHR, quan es consideren totes les mostres, no es troba una correlació entre títols sèrics d'anti-TSHR i presència de centres germinals intratiroiðals, però sí quan només es consideren les del grup de Graves-Basedow ( $p = 0,0146$ , test Mann-Whitney) en les que es coneix que els autoanticossos contra aquest receptor constitueixen el mecanisme patològic de la malaltia.

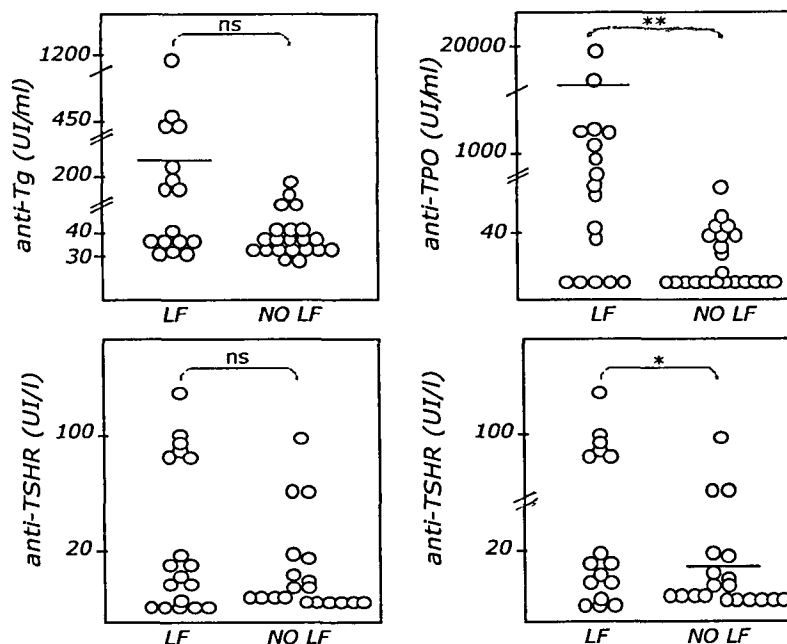


Fig. 30 Relació entre la formació de fol·licles limfoides ectòpics i títols sèrics d'autoanticossos tiroïdals. En tots gràfics s'han representat les dades de tots els malalts considerats globalment com amb "autoimmunitat tiroïdal", excepte a l'inferior dret en el que només s'han considerat els malalts de Graves-Basedow. anti-Tg, anticossos anti-tiroglobulina; TPO, peroxidasa tiroïdal; TSHR, receptor de la tirotròpina; LF, tiroides amb fol·licles limfoides; NO LF, tiroides sense fol·licles limfoides; (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, sense significació estadística; test de Mann-Whitney).



#### 4.6.2 Les cèl·lules B intratiroidals són capaces de reconèixer Tg i TPO

És conegut que el desenvolupament d'un fol·licle limfoide té lloc per proliferació d'un nombre reduït de cèl·lules B específiques d'antigen. Segons això, els centres germinals intratiroidals s'haurien de generar a partir d'una expansió oligoclonal de cèl·lules B específiques d'un antigen determinat. L'especificitat dels BCRs de les cèl·lules B intratiroidals (tant les que formen part dels fol·licles limfoides com les que es troben en l'infiltrat difús) s'ha investigat mitjançant diversos abordatges, un dels quals, l'ús d'antígens conjugats amb biotina sobre una secció de teixit que contingui cèl·lules B amb el receptor específic (anti-Tg o anti-TPO). En funció dels títols d'autoanticossos sèrics, s'han triat set glàndules: una glàndula amb tiroïditis de Hashimoto que conté 28 fol·licles limfoides i sis glàndules de Graves-Basedow amb un total de 21 fol·licles, utilitzant tiroglobulina-Bio (Tg-Bio) i peroxidasa tiroïdal-Bio (TPO-Bio).

Els resultats d'unió demostren que 16 dels 28 fol·licles del pacient amb tiroïditis de Hashimoto (57%) són positius pel reconeixement de Tg i 17 dels 28 (63%) reconeixen específicament TPO (taula XI). El percentatge de fol·licles limfoides que reconeixen tant Tg com TPO alhora és del 20%.

Entre les tiroïdes dels 6 pacients amb Graves-Basedow, 7 dels 16 fol·licles (43,7%) són positius per Tg i 8 de 21 són TPO<sup>+</sup> (38%). El percentatge de fol·licles limfoides que reconeixen ambdós antígens alhora (18,7%) és molt similar al trobat en els HT.

A nivell de cada fol·licle limfoide cal comentar que el percentatge de cèl·lules B (considerades com IgM<sup>+</sup> o IgG<sup>+</sup>) que reconeixen algun dels dos antígens oscil·la entre el 30-60%, cosa que dóna idea d'una oligoclonalitat dels receptors de les cèl·lules B *in situ*. A la vegada, en una mateixa glàndula poden coexistir amb fol·licles absolutament negatius pels dos antígens. La incubació prèvia amb antigen sense conjuguar bloqueja totalment la unió de Tg-bio i de TPO-bio, cosa que demostra l'especificitat de la unió.

*Taula XI.* Especificitat antigènica de les cèl·lules B presents en algunes glàndules utilitzades per al criatge, en les que s'indiquen els títols d'autoanticossos sèrics i el percentatge de fol·licles limfoides que reconeixen específicament dos dels autoantígens relacionats amb l'autoimmunitat tiroïdal.

identificació tiroide	$\alpha$ Tg (UI/ml)	$\alpha$ TPO (UI/ml)	$\alpha$ TSHR (UI/l)	% LFs Tg +	% LFs TPO+	% LFs Tg+TPO+
HT385	7740	105000	0,9	57 (16/28)	63 (17/27)	17,9 (5/28)
GD373	172,3	39,2	178	50 (1/2)	50 (1/2)	0/2=0
GD386	ND	ND	ND	100 (2/2)	0 (0/2)	0/2=0
GD413	37,3	39,5	20,6	50 (1/2)	50 (1/2)	0/2=0
GD257	887	24	67,8	ND	60 (3/5)	ND
GD423	70	53	15,5	25 (1/4)	25 (1/4)	50 (2/4)
GD426	1265	1001	85,9	33,3 (2/6)	33,3 (2/6)	1/6=16,6
mitjana				43,7 (7/16)	38 (8/21)	18,7 (3/16)

El **patró de distribució** cel·lular mostra l'existència de dos tipus de limfòcits que reconeixen Tg i TPO: un grup nombrós compost per cèl·lules petites amb una distribució similar a la de les centroblastes i centròcits amb una tinció localitzada preferentment a la membrana cel·lular (figura 31) i un altre amb cèl·lules grans, menys nombroses, intensament positives per tinció de citoplasma i distribuïdes tant en els centres germinals com a l'infiltrat difús. Les dobles immunofluorescències utilitzant anti-Ig, anti-IgG i anti IgM revelen tres combinacions per cada antigen, de les quals les cèl·lules Tg<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>, TPO<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>, Tg<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> i TPO<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> són les subpoblacions majoritàries (aprox 70%), mentre que les Tg<sup>-</sup>IgG<sup>+</sup> i TPO<sup>-</sup>IgG<sup>+</sup> no es troben tant representades encara que existeixen.

*Fig. 31 Distribució de les cèl·lules B i plasmàtiques que reconeixen específicament tiroglobulina i peroxidasa tiroïdal detectades utilitzant hormona conjugada amb biotina; en les dobles tincions es demostra la colocalització de les cèl·lules IgM<sup>+</sup> anti-Tg<sup>+</sup> i IgG<sup>+</sup> TPO<sup>+</sup> en l'interior d'un fol·licle limfoide (fletxes); detalls de la presència de tinció tant de membrana cel·lular com de citoplasma que correspondria a la de cèl·lules B i plasmàtiques respectivament. MZ, zona del mantell fol·licular.*

