

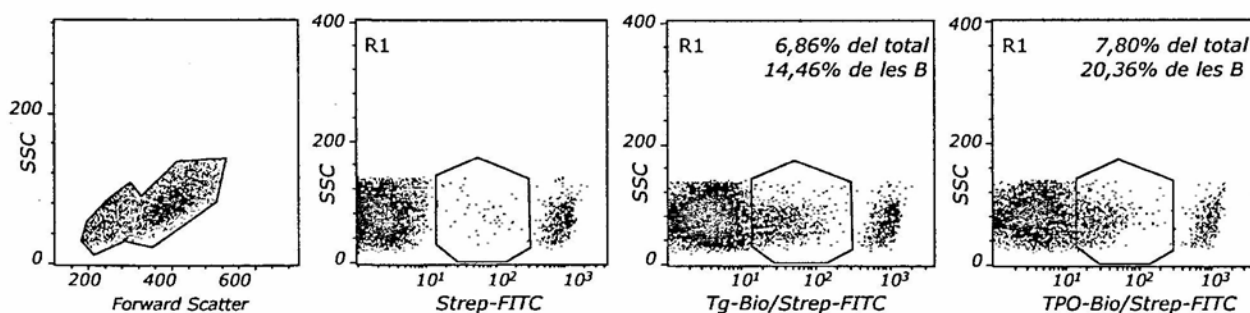
*ESTRUCTURACIÓ DE LA RESPOSTA B A LES  
MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES DE LA TIROIDE*

*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*

Donat que l'aproximació anterior és descriptiva, per tal de quantificar la proporció de cèl·lules B involucrades en el reconeixement d'antígens propis de la glàndula, s'ha dut a terme un abordatge paral·lel a l'anterior en cèl·lules en suspensió derivades de digestions enzimàtiques i mecàniques de tiroïdes. S'han utilitzat limfòcits intratiroidals (ITLs) de sis glàndules i línies de limfòcits intratiroidals immortalitzades amb virus d'Epstein barr (ITLs/EBV) de dues glàndules més. Els assajos d'unió a antigen fets en ITLs (figura 32) demostren que el percentatge de cèl·lules que reconeixen Tg-bio està entre el 5 i el 33,05% i el que reconeix TPO-bio entre el 7,02 i el 36,7%, en funció del nombre de cèl·lules B presents en el total de l'infiltrat. Els assajos de bloqueig, que s'han realitzat de forma similar als descrits en l'anterior apartat, han suprimit absolutament la capacitat del limfòcits B de reconèixer les hormones marcades, cosa que demostra l'especificitat de l'assaig. Amb les línies ITLs/EBV generades, encara que s'han utilitzat els mateixos protocols, no s'han pogut reproduir els resultats, donat que després d'incubació durant una hora amb antigen i posterior selecció magnètica, l'aspecte final és de cèl·lules apoptòtiques amb un patró de mida/granularitat típic d'aquest estat de mort cel·lular programada.

Fig. 32 Especificitat antigènica de les cèl·lules B intratiroidals. Citofluorimetria que mostra els percentatges de cèl·lules B intratiroidals capaces de reconèixer específicament dos dels autoantígens usats (Tg-Bio i TPO-Bio). Els percentatges que s'indiquen a la part superior estan calculats respecte el total de cèl·lules infiltrants mentre que els inferiors estan calculats sobre el percentatge de cèl·lules B.



#### 4.6.3 Les cèl·lules B intratiroidals són capaces de produir anticossos anti-Tg i anti-TPO in vitro

Els resultats anteriors s'han reconfirmat mitjançant la generació de línies i de clons de cèl·lules B intratiroidals immortalitzades de les quals es pugui estudiar la seva especificitat antigènica del seu receptor. Així, s'han seleccionat quatre tiroïdes en funció dels títols d'autoanticossos sèrics (amb un índex d'infiltració superior al 30%), s'han separat els limfòcits intratiroidals per gradient de densitat i s'han fusionat amb l'heterohíbrid humà F3B6 en presència de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica autòlogues irradiades. Aquest abordatge permet obtenir línies cel·lulars i clons en creixement continu generadors de receptors BCR humans amb la mateixa especificitat que les cèl·lules ITLs inicials. Les línies de tres (HT385, GD429 i GD431) de les quatre fusionades s'han criopreservat en "bulk" mentre que les del GD426 s'han mantingut en cultiu durant una setmana. De la fusió 426F3B6 s'han generat 140 línies cel·lulars (figura 33) de les quals, en un primer criatge, 93 (66%) són secretores d'immunoglobulines en cultiu (sense discriminació entre IgMs i IgGs) a unes concentracions entre 7,5-10ng/ml. La dosificació d'anticossos s'ha repetit amb sobrenedant obtingut una setmana després del primer criatge ja que la presència de cèl·lules plasmàtiques en el cultiu inicial podia fer sobrevalorar el nombre de línies productores i els resultats inicials s'han confirmat.

Amb els sobrenedants positius, i per tenir una visió del percentatge de cèl·lules B autoreactives a la glàndula, s'ha fet un cribatge per presència d'anticossos anti-Tg i anti-TPO. De les 93 línies secretores d'Igs algunes (25 de 93; 26,9%) s'han considerat clarament productores d'anti-Tg o anti-TPO i altres (50 de 93; 53,8%) secreten aquests anticossos a dosis baixes per la qual cosa no s'han seguit estudiant. De les productores s'han obtingut 8 línies positives per anti-Tg (8,6%) i 10 línies positives per anti-TPO (10,7%). Cal comentar que una d'elles secreta anticossos anti-Tg i anti-TPO alhora (anti-TgPO).

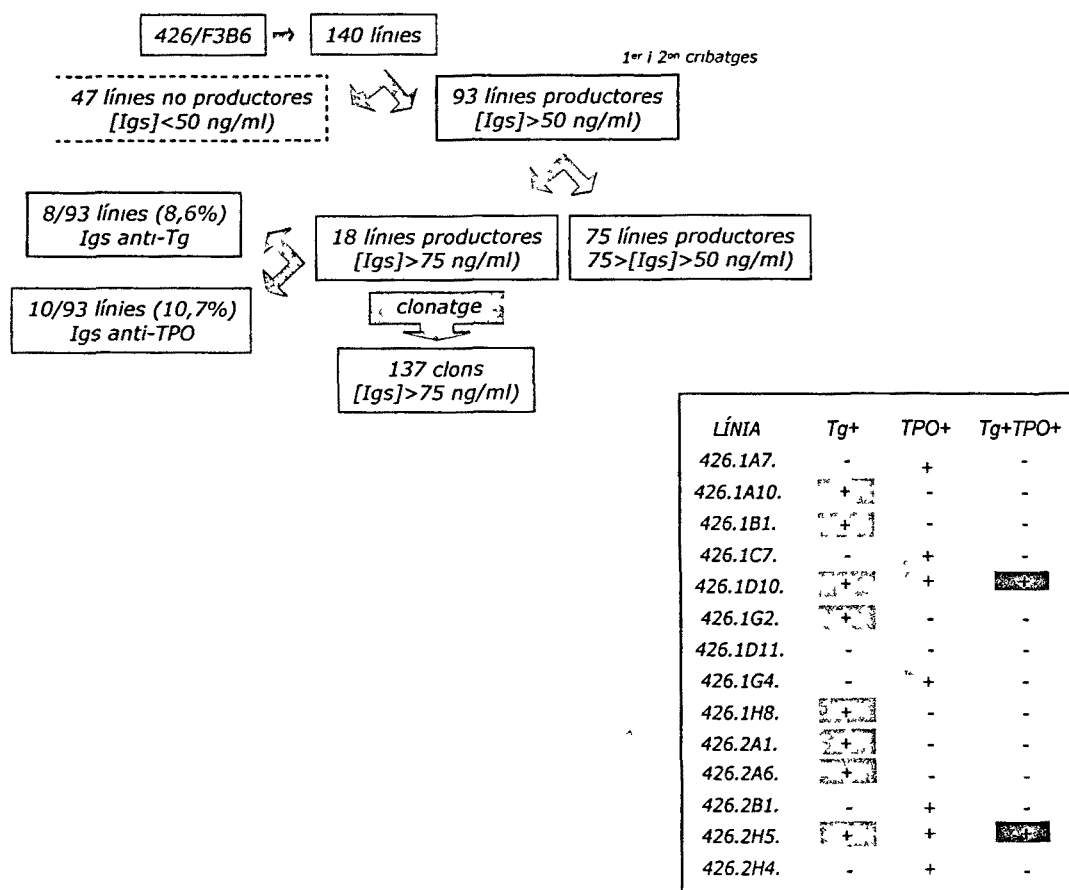


Fig. 33 Especificitat antigènica de les línies de cèl·lules B generades per fusió. a: Estratègia seguida i resultats del cribatge de les línies B híbrides mitjançant ELISA per detecció de secreció d'Igs totals, anti-Tg i anti-TPO. b: Taula de l'especificitat antigènica de cada línia. En color marró es marquen aquells clons en els que s'ha detectat una doble reactivitat.

El clonatge de les 18 línies autoreactives ha generat 137 clons, la meitat dels quals s'han re-testat i s'ha confirmat la secreció d'immunoglobulines totals *in vitro*. El 81,02% (111 clons dels 137 en creixement) han seguit secretant Igs en sobrenedant. En 41 clons s'ha reconfirmat la producció *in vitro* d'anticossos anti-Tg i anti-TPO per ELISA. Els resultat i percentatges finals es resumeixen a la figura 34. Cal comentar que el 9,7% s'han mantingut sintetitzant anticossos contra els dos antígens alhora.

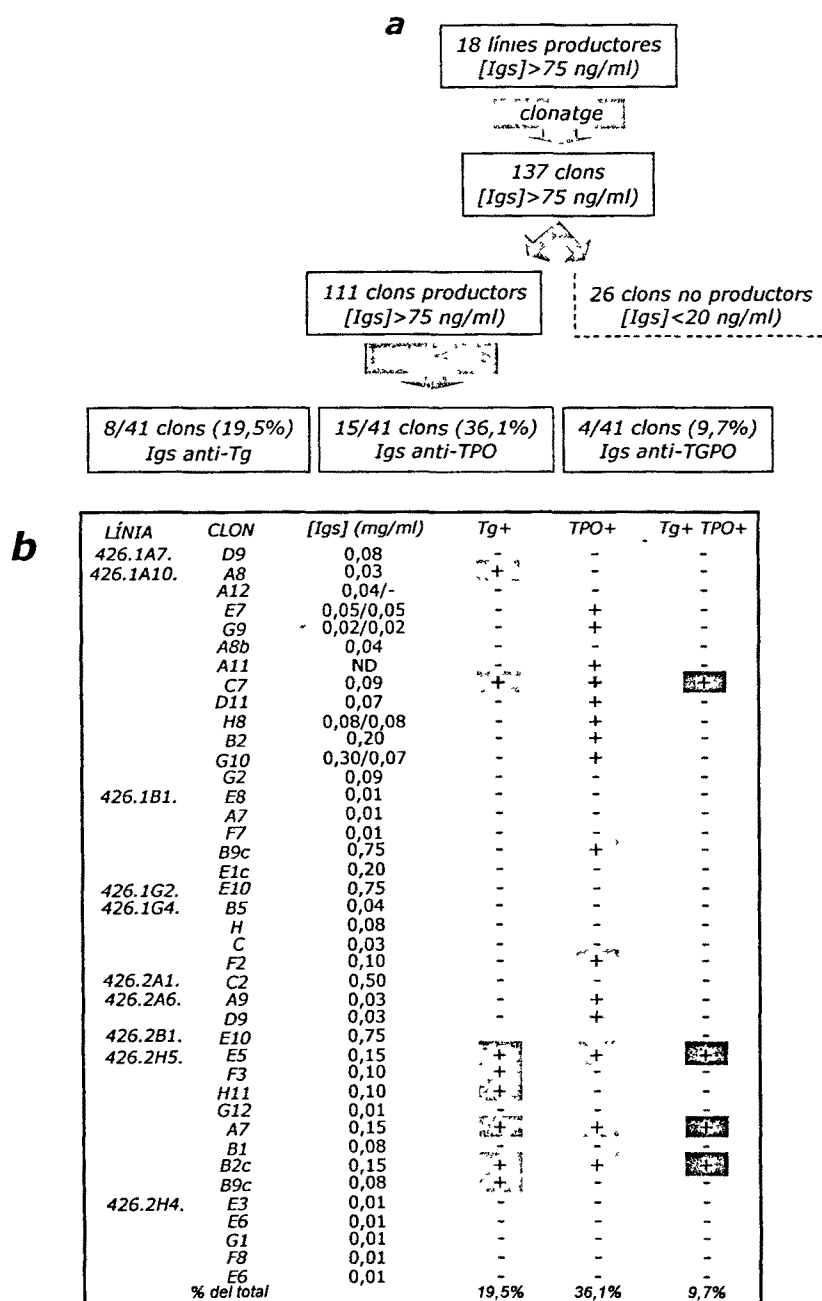


Fig. 34 Especificitat antigènica dels clons de cèl·lules B generades per fusió. a: Estratègia seguida i resultats del cribatge dels clons B híbrids mitjançant ELISA per detecció de secreció d'Igs totals, anticossos anti-Tg i anticossos anti-TPO. b: Taula en la que es mostra l'especificitat antigènica de cada clon. En color marró es marquen aquells clons en els que s'ha detectat una doble reactivitat.

#### 4.7 LES CÈL·LULES B INTRATIROIÐALS SÓN OLIGOCLONALS

L'amplificació per PCR a temps real de la regió CDR3 de les cadenes pesades de les immunoglobulines, formada pel reordenament dels segments gènics V(D)J, permet identificar patrons de clonalitat quan s'estudien les Tm en funció de l'alliberament de fluorescència incorporada. Usant aquest abordatge amb gDNA de cèl·lules B intratiroiðals separades per "cell sorting" de digestions de glàndules i comparant els resultats amb el patró del gDNA de la sang perifèrica dels mateixos malalts, hem observat que en el perfil dels primers s'observen com a màxim 3 pics individualitzats de fluorescència (que es

perifèrica s'observa un patró representatiu de totes les combinacions possibles (figura 35).

Aquest mateix abordatge s'ha utilitzat en l'estudi dels reordenaments de les Igs dels híbrids generats a partir de les fusions de F3B6 amb els limfòcits B intratiroidals. Els resultats de la PCR a partir de cDNA demostren que es troben com a màxim 4 temperatures de melting diferents que es correspondrien amb 4 combinacions diferents dels segments V(D)J i que existeix una correlació absoluta entre la  $T_m$  de cada clon i la línia clonal de la qual prové, és a dir, tots els clons generats a partir de la línia 1A10 tenen una  $T_m$  de 89,39°C; els provinents de la 1B1 de 86,4°C; els generats a partir d'1C7 de 89,86°C i els derivats d'1G2 tenen una  $T_m$  de 84,14°C (figura 35). Els productes de PCR analitzats en gel mostren diferents mobilitats electroforètiques que oscil·len entre 69 i 169bp.

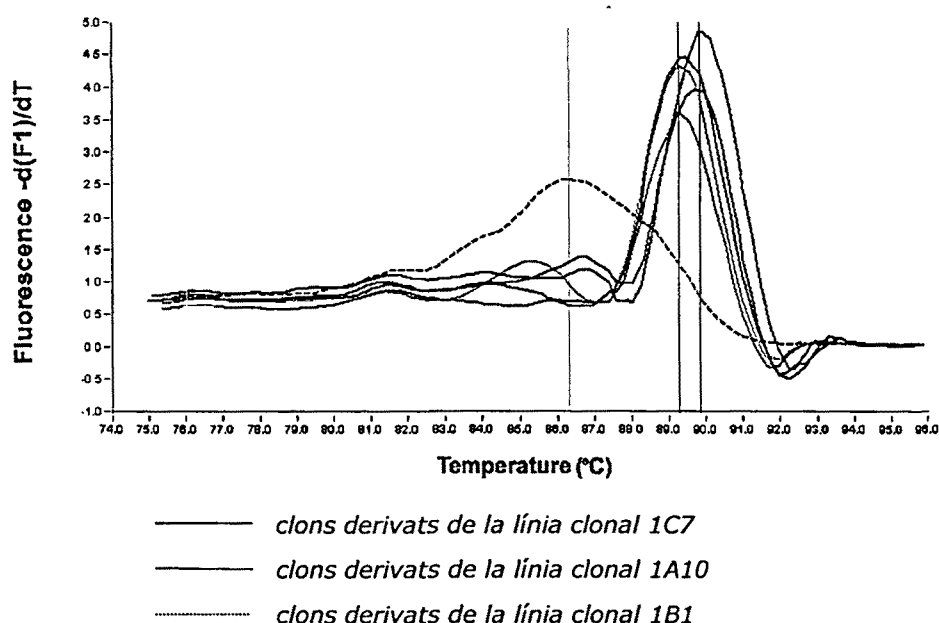


Fig. 35 Anàlisi de la clonalitat de les cèl·lules B infiltrants de la tiroide. Gràfic que mostra la corva de melting de l'amplificació del CDR3 de diversos clons. Els provinents de cada línia clonal estan representats en diferents tons d'un mateix color. Les línies verticals (blava, vermella i verda) indiquen respectivament les diferents temperatures de melting de les diferents línies clonals (1C7, 1A10 i 1B1).

#### 4.8 ELS REORDENAMENTS DELS GENS DE LES IGS DE LES CÈL·LULES B INTRATIROIÐALS PRESENTEN UNA SELECCIÓ DIRIGIDA PER ANTIGEN

La possible direcció per antigen dels receptors de les cèl·lules B s'ha estudiat per seqüenciació del CDR3 dels clons híbrids dels quals també s'ha determinat l'especificitat antigènica contra els antígens tiroïdals. Així hem observat que existeix una utilització molt restringida dels diversos segments gènics distribuïts de la següent forma: 1 clon dels 10 estudiats presenta el reordenament V3-D3-J4, 2 clons dels 10 són V3-D5-J4 i 7 clons dels 10 són V4-D3-J4. Per tal d'estudiar la possible direcció per antigen d'aquests receptors, s'han comparat les seqüències amb la de la línia germinal més similar i s'ha observat que presenten insercions entre els segments D i J que comporten modificacions aminoacídiques.

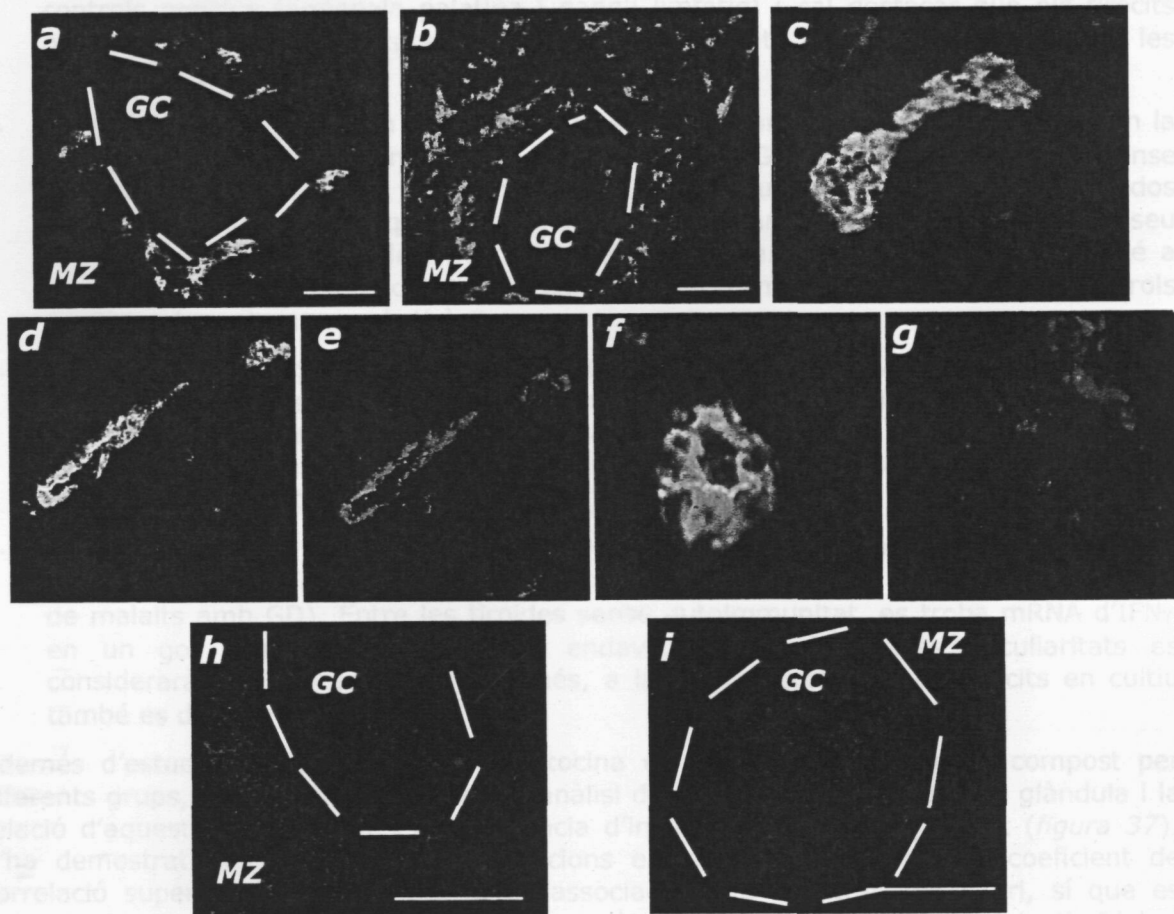
#### 4.9 ALS FOL·LICLES LIMFOIDES INTRATIROÏDALS S'EXPRESSEN MOLÈCULES D'ADHESIÓ I ENDOTELIALS INVOLUCRADES EN L'ESTRUCTURACIÓ DELS TEIXITS LIMFOIDES TERCIARIS

La transformació de les vènules post-capil·lars a vènules d'endoteli alt (HEVs) i l'expressió d'algunes molècules d'adhesió s'han involucrat en l'arribada dels leucòcits als teixits limfoides secundaris i en l'estructuració posterior de fol·licles amb centres germinals. Utilitzant anticossos contra CLA-1 (identificat com un carbohidrat lligand de l'L-selectina, CD62L) en tincions dobles amb anticòs anti-factor VIII de l'endoteli sobre seccions de criòstat de tiroïdes de malalts amb autoimmunitat tiroïdal, hem observat la presència de petites vènules d'endoteli alt en l'infiltrat difús i HEVs molt més desenvolupades envoltant els fol·licles limfoides secundaris. Les anàlisis morfològiques de l'àrea ocupada per aquestes estructures respecte el total de l'àrea de la tiroide indiquen que al voltant del 20% de capil·lars són alhora CLA-1<sup>+</sup>FVIII<sup>+</sup> (figura 36). Cal comentar que el patró de tinció d'ambdues molècules no és exacte: en les HEVs, CLA-1 es detecta a tota la cèl·lula, però la molècula s'acumula sobretot a la zona corresponent a la llum de l'endoteli, mentre que el factor VIII té una distribució cel·lular més uniforme, cosa que fa que la colocalització de colors en les imatges no sigui perfecta.

Al marge de les cèl·lules endotelials, s'han identificat també limfòcits T CD3<sup>+</sup>CLA-1<sup>+</sup> en àrees on la infiltració limfocítica és abundant. Les glàndules tiroïdals sense patologia autoimmunitària i les procedents de donants d'òrgans no presenten HEVs ni limfòcits CD3<sup>+</sup>CLA-1<sup>+</sup>.

A les tiroïdes amb fol·licles limfoides intratiroïdals hem estudiat també la distribució de les molècules d'adhesió de la superfamília de les immunoglobulines ICAM-3 (CD50) i d'ICAM1 (CD54). Aquests lligands d'integrines es troben distribuïts de forma similar al que s'havia descrit en amígdales palatines i en altres òrgans limfoide secundaris. Així, ICAM-3 es detecta com a una tinció de membrana principalment en les cèl·lules que formen part del mantell cel·lular dels fol·licles limfoides (tant a limfòcits T com B) i també en les àrees adjacents. Algunes cèl·lules que formen part del centre germinal, tant centroblastes com centròcits, són també positives per CD50. Al contrari del que s'ha descrit per ICAM-3, ICAM-1 es troba molt més restringit a l'interior del centre germinal i sobretot a la zona ocupada per les cèl·lules dendrítiques fol·liculars, cosa que explicaria la mida superior d'algunes cèl·lules CD54<sup>+</sup> en molts casos. La zona del mantell fol·licular expressa nivells baixos de CD54 o negatius.

*Fig. 36 Presència de vènules d'endoteli alt i expressió de molècules d'adhesió als fol·licles limfoides de les tiroïdes. a i b: distribució de les vènules d'endoteli alt (HEVs) identificades com a estructures CLA-1<sup>+</sup> (a) al voltant dels fol·licles limfoides tiroïdals (circumscriu a l'interior de les línies discontinües) i de la resta d'estructures endotelials factor VIII<sup>+</sup> (b); c: Microfotografia ampliada de les imatges superposades en les que demostra la colocalització en la mateixa cèl·lula d'ambdues molècules; d-g: Tincions simples amb anti-CLA-1 (verd) i anti-factor VIII (vermell) en seccions d'un malalt amb tiroïditis de Hashimoto; h: expressió d'ICAM-3 restringida al mantell fol·licular en els fol·licles limfoides intratiroïdals i a algunes cèl·lules a l'interior del GC; f: distribució, amb patró reticular, d'ICAM-1 en seccions de congelació de tiroïdes amb malaltia de Graves-Basedow. GC, centre germinal; MZ, zona del mantell fol·licular. Els augments utilitzats en cada microfotografia es mostren amb una línia horitzontal que en tots els casos equival a 100µm.*



#### 4.10 A LES TIROIDES ES PRODUUEIXEN LES CITOCINES $LT\alpha$ , $LT\beta$ , $IFN\gamma$ , EL RECEPTOR $LT\beta$ I LES QUIMIOCINES $CCL21$ , $CXCL12$ I $CXCL13$

##### 4.10.1 Expressió de citocines i receptors

Tal com s'ha descrit a la introducció, algunes citocines de la família del TNF i els seus receptors també estan involucrats en la formació de fol·licles limfoides encara que no es coneix la seqüència temporal en la que actuen. Ja que l'estructuració dels fol·licles limfoides és un fenomen dinàmic i que ademés disposem de tiroides en diferents estadis d'evolució de malaltia autoimmunitària, ens hem plantejat la detecció per RT-PCR i posterior hibridació del missatger de  $LT\alpha$ ,  $LT\beta$ ,  $IFN\gamma$  i del receptor  $LT\beta$  en 16 mostres de tiroides de les quals 2 pertanyen a malalts amb tiroïditis de Hashimoto, 9 de Graves-Basedow, 3 golls multinodulars i 2 de donants sans. (figura 37). L'anàlisi qualitativa mostra que:

- $LT\alpha$  és detectable en 9 de les 16 (56,2%) tiroides testades, de les quals 6 presenten autoimmunitat tiroïdal i només 2 pertanyen a un individu sà i a un goll multinodular. Tot i que els assajos fets per RT-PCR no tenen caràcter quantitatiu, el nivell d'expressió de  $LT\alpha$  sembla superior a les tiroides que als teixits utilitzats com a

controls positius (amígdala palatina i gangli limfàtic) i cal destacar que els tiròcits purificats en un 98% expressen nivells molt elevats de  $LT\alpha$  comparables a les tiroïdes autoimmunitàries.

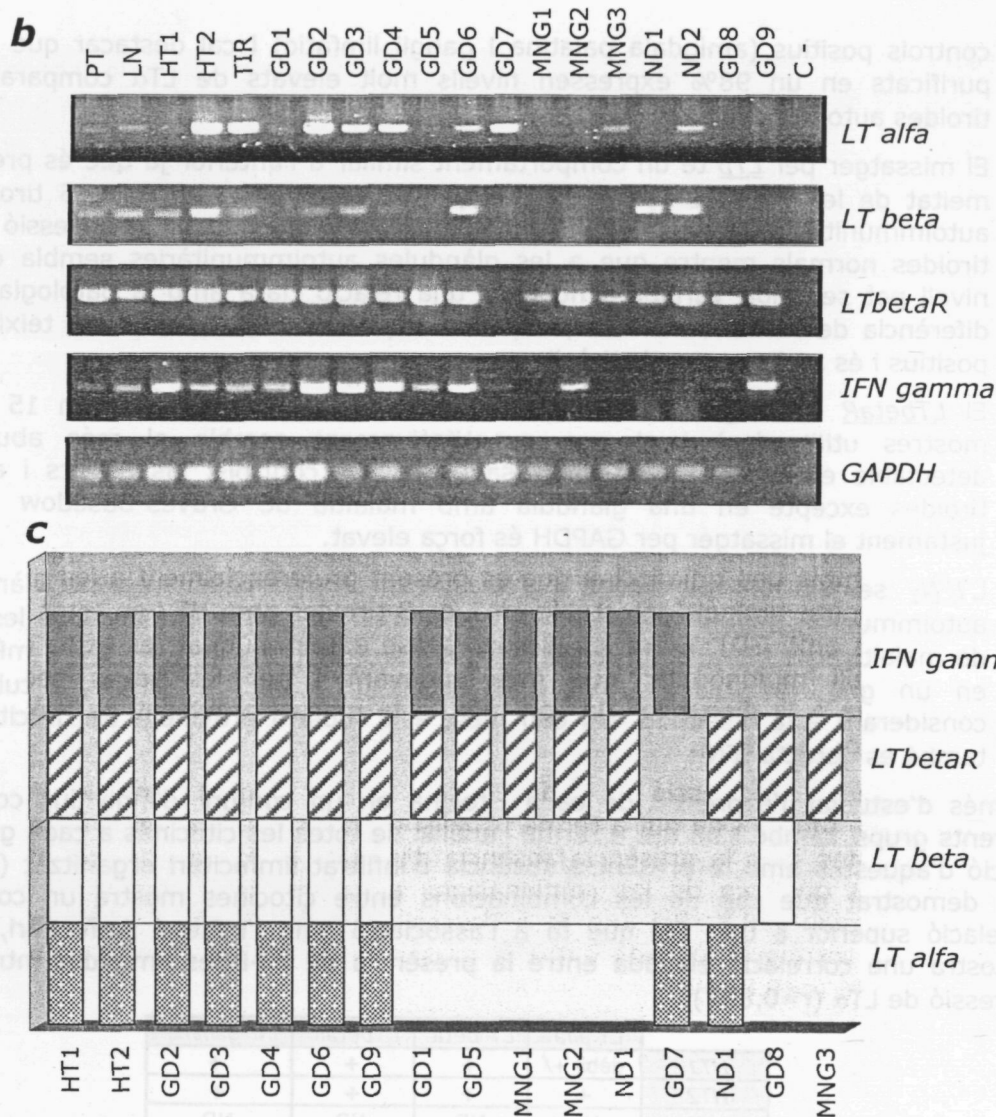
- El missatger per  $LT\beta$  té un comportament similar a l'anterior ja que és present en la meitat de les mostres (en 2 de 3 HT, en 4 de 9 GD i en 2 de 5 tiroïdes sense autoimmunitat tiroïdal). A diferència de la  $LT\alpha$ , té un nivell d'expressió alt en dos tiroïdes normals mentre que a les glàndules autoimmunitàries sembla que el seu nivell pot ser molt variable i no tenir una relació clara amb la patologia. També a diferència de l'anterior citocina,  $LT\beta$  és d'expressió més elevada als teixits controls positius i és molt menor als tiròcits.
- El  $LTbetaR$  és el gen més ubiquu de tots els testats (present en 15 de les 16 mostres utilitzades) i el que quantitativament sembla el més abundant. És detectable en totes les mostres usades com a controls, als tiròcits i a totes les tiroïdes excepte en una glàndula amb malaltia de Graves-Basedow en la que justament el missatger per GAPDH és força elevat.
- L' $IFN\gamma$  sembla una quimiocina que és present preferencialment a les glàndules amb autoimmunitat tiroïdal (detectable en 2 de 3 tiroïdes amb HT i en totes les glàndules de malalts amb GD). Entre les tiroïdes sense autoimmunitat, es troba mRNA d' $IFN\gamma$  en un goll multinodular que més endavant i per les seves peculiaritats es considerarà a la discussió. Un cop més, a la mostra provinent de tiròcits en cultiu també es detecta  $IFN\gamma$ .

Ademés d'estudiar l'expressió de cada citocina en un conjunt d'individus compost per diferents grups, també s'ha dut a terme l'anàlisi de totes les citocines a cada glàndula i la relació d'aquestes amb la presència/absència d'infiltrat limfocitari organitzat (figura 37). S'ha demostrat que cap de les combinacions entre citocines mostra un coeficient de correlació superior a 0,8. Pel que fa a l'associació amb l'infiltrat limfocitari, sí que es demostra una correlació elevada entre la presència de fol·licles limfoides intratiroïdals i expressió de  $LT\alpha$  ( $r=0,837$ ).

	$LT\alpha$	$LT\beta$	$LTbetaR$	$INF\gamma$
HT1	dèbil +/-	+	+	+
HT2	+	+	+	+
HT3	ND	ND	ND	ND
GD1	-	-	+	+
GD2	+	+	+	+
GD3	+	+	+	+
GD4	+	+	+	+
GD5	-	-	+	+
GD6	+	+	+	+
GD7	+	-	-	+
GD8	-	-	+	+
GD9	-	-	+	+
MNG1	-	-	+	-
MNG2	-	-	+	+
MNG3	+	-	+	-
ND1	-	+	+	-
ND2	+	+	+	-

Fig. 37 Expressió de citocines a les tiroïdes autoimmunitàries. a: A la taula es mostren els resultats qualitius de la semiquantificació de les citocines per RT-PCR i hibridació. ELF: fol·licles limfoides ectòpics. b: Expressió de les citocines que s'indiquen i del gen d'expressió constitutiva GAPDH en tiroïdes amb tiroïditis de Hashimoto (HT), Graves-Basedow (GD), goll multinodular (MNG) i controls sans (ND). PT, amígdala; LN, nòdul limfàtic; TIR, tiròcits cultivats 24 hores; C-, control negatiu. c: Gràfic que representa l'expressió de les citocines a nivell qualitatiu en cada glàndula en la que cada rectangle equival a una citocina. Les tiroïdes estan agrupades en funció de l'expressió de les citocines.





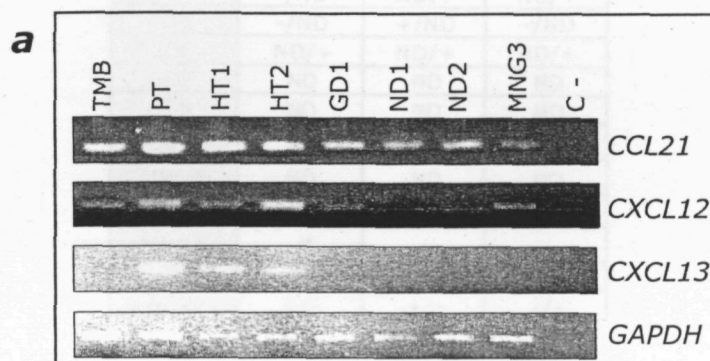
#### 4.10.2 Expressió de quimiocines

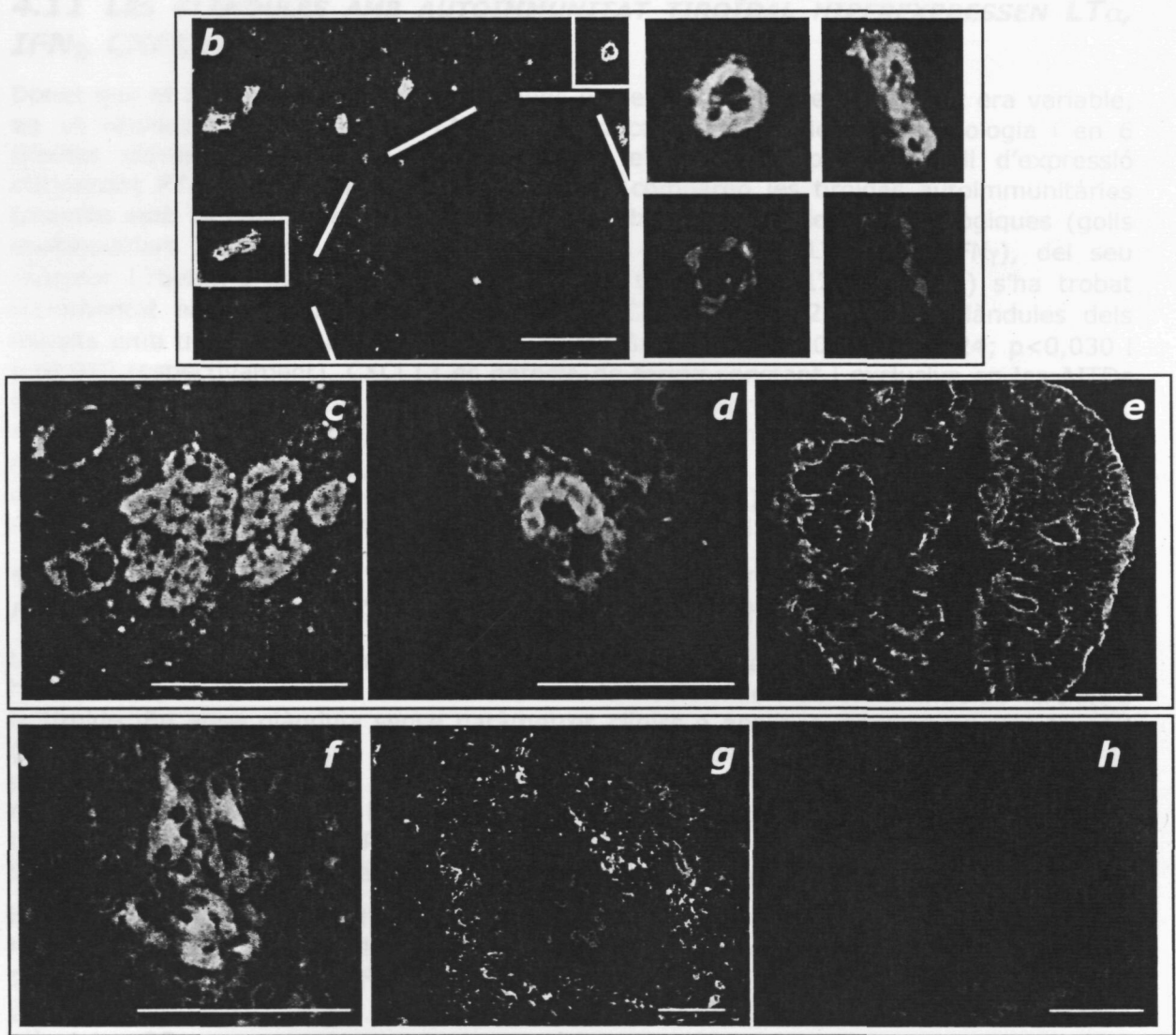
El patró de quimiocines relacionades amb l'estructuració dels centres germinals canònics i ectòpics involucra sobretot les quimiocines homeostàtiques CXCL12, CXCL13 i CCL21. La presència de les esmentades molècules s'ha estudiat tant a nivell de transcripció gènica per RT-PCR i hibridació amb oligosondes, com a nivell de producció de proteïna per immunofluorescència indirecta en 11 glàndules de les quals 2 es consideren no patològiques i la resta presenten autoimmunitat tiroïdal. En les darreres, els resultats es detallen en funció de la presència/absència de fol·licles limfoides ectòpics intratiroidals. Els resultats (figura 38) mostren que:

- *CCL21*, és d'expressió constitutiva a totes les glàndules sense distinció de patologies encara que quan s'estudia per PCR semiquantitativa sembla més abundant en les tiroïditis de Hashimoto. La proteïna es detecta en totes les tiroïdes amb autoimmunitat però no en els controls sans i s'observa distribuïda de forma similar a les vècules d'endoteli alt (CLA-1<sup>+</sup>) en estructures situades al voltant dels fol·licles limfoides ectòpics o en àrees d'abundant infiltració. L'anàlisi morfològica dels endotelis CLA-1<sup>+</sup> feta sobre seccions consecutives demostra que el 30% són CCL21<sup>+</sup>. La distribució intracel·lular de la quimiocina no sembla relacionada amb la polarització de l'endoteli a diferència del que té lloc amb la distribució de CLA-1.

- *CXCL12* a nivell d'mRNA és present a totes les glàndules amb autoimmunitat però també es detecta en menor nivell a les tiroïdes d'individus donants sans i de golls multinodulars. Per immunohistoquímica, *CXCL12* s'observa en les 3 glàndules amb tiroïditis de Hashimoto i en 3 de 6 Graves-Basedow i es detecta en grups de cèl·lules grans d'aspecte similar als fibroblastes situats en zones amb un grau d'infiltració elevat i també en cèl·lules epitelials que mantenen l'aspecte típic del fol·licle tiroïdal. La confirmació dels tiròcits com a cèl·lules productores de *CXCL12* es té a través de la colocalització de les cèl·lules positives per aquesta quimiocina amb les que sintetitzen TPO o citoqueratina, donat que en totes les glàndules amb tinció positiva per *CXCL12* s'han trobat cel·lules doblement positives TPO<sup>+</sup>*CXCL12*<sup>+</sup>.
- La quimiocina que presenta un comportament diferent, tant a nivell de transcripció com de proteïna, és *CXCL13*. Es veu restringida a les glàndules amb autoimmunitat tiroïdal en les que s'han desenvolupat fol·licles limfoides ectòpics. Les cèl·lules que la produeixen es detecten principalment en la zona del mantell fol·licular com a cèl·lules grans amb perllongacions que tenen una distribució similar a la de les cèl·lules dendrítiques madures que expressen CD83. A la vegada, en zones amb una densitat elevada d'infiltrat limfocitari es detecten grups de cèl·lules grans *CXCL13*<sup>+</sup> en les que la quimiocina presenta una localització subcel·lular determinada. Encara que no hem estat capaços de determinar el seu origen, la seva distribució recorda la de les cèl·lules dendrítiques fol·liculars en un estat inicial de formació de teixit limfoide terciari o en un procés d'invulsió d'aquest.

**Fig. 38 Síntesi de quimiocines als fol·licles intratiroïdals.** a: Expressió de les quimiocines que s'indiquen i del gen d'expressió constitutiva GAPDH en tiroïdes amb tiroïditis de Hashimoto (HT), Graves-Basedow (GD), goll multinodular (MNG) i controls sans (ND). TMB, timus; PT, amígdala; LN, nòdul limfàtic; C-, control negatiu. b: Imatge de les cèl·lules endotelials CCL21<sup>+</sup> al voltant del fol·licle limfoide indicat amb línies discontinües. Les zones encerclades es mostren amb més detall en seccions consecutives tenyides amb anti-CLA-1<sup>+</sup> (vermell) i anti-CCL21 (verd). c-d: Aspecte de les cèl·lules tenyides positivament per *CXCL12*-FITC en zones amb infiltració limfocitària moderada en les que s'observen com a cèl·lules grans amb una distribució similar a la que adopten els fol·licles tiroïdals presents a les glàndules amb autoimmunitat tiroïdal. e: Doble tinció amb anti-*CXCL12* (verd) i anti-citoqueratina (vermell) en la que s'observa la colocalització d'ambdues tincions a bona part de cèl·lules epitelials. f: Aspecte de les cèl·lules *CXCL13*<sup>+</sup> agrupades en zones externes als fol·licles limfoides. g: Microfotografies superposades de les imatges de tincions consecutives usant anti-*CXCL13* (verd) i anti-CD21L (vermell, marcador de cèl·lules dendrítiques fol·liculars) per identificar el tipus cel·lular productor de la quimiocina, que suggereix que les FDCs no són l'origen d'aquesta, mentre que el seu patró de tinció és molt similar al de les cèl·lules dendrítiques madures CD83<sup>+</sup> (h) (tinció en vermell). Els augmentos utilitzats en cada microfotografia es mostren amb una línia horitzontal que equival a 100µm. i: Taula resum en la que es mostren els resultats qualitatius tant de la semiquantificació de les quimiocines per RT-PCR i hibridació com els obtinguts per IFL sobre seccions de tiroïdes seguint la nomenclatura "RT-PCR/IFL".





i

	CXCL12	CCL21	CXCL13
HT1	+/+	+/+	+/+
HT2	+/+	+ /ND	+ /ND
HT3	ND/+	ND/+	ND/+
GD1	+ /ND	+ /ND	+ /ND
GD2	ND/+	ND/+	ND/+
GD3	ND/+	ND/+	ND/+
GD4	- /ND	ND/+	ND/+
GD5	- /ND	+ /ND	- /ND
GD6	ND/+	ND/+	ND/+
GD7	ND	ND	ND
GD8	ND	ND	ND
GD9	ND	ND	ND
MNG1	ND	ND	ND
MNG2	ND	ND	ND
MNG3	+	+	-
ND1	- /ND	+ /ND	- /ND
ND2	+ /-	+ /-	- /-

#### 4.11 LES GLÀNDULES AMB AUTOIMMUNITAT TIROÏDAL HIPEREXPRESSEN $LT\alpha$ , $IFN\gamma$ , $CXCL12$ , $CXCL13$ I $CCL22$

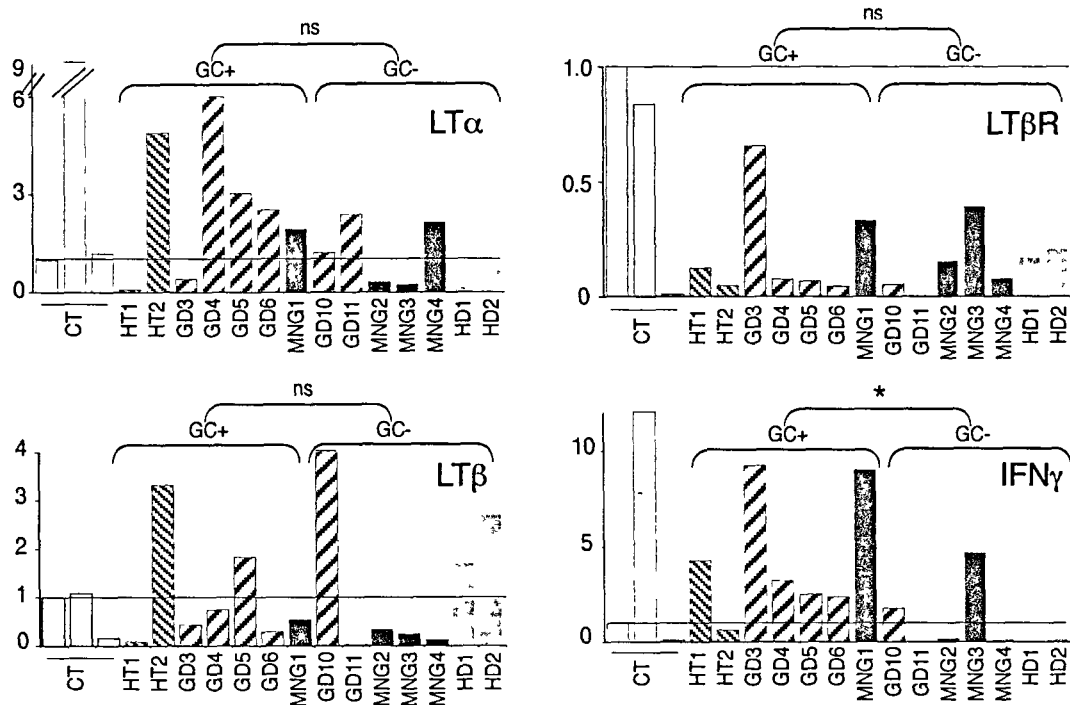
Donat que el nivell de transcripció dels gens esmentats en l'anterior apartat era variable, en 14 tiroïdes autoimmunitàries (AITDs) classificades en funció de la patologia i en 6 tiroïdes sense autoimmunitat s'ha quantificat el seu corresponent nivell d'expressió mitjançant RT-PCR a temps real. Així, quan es comparen les tiroïdes autoimmunitàries (malalts amb Graves-Basedow i tiroïditis de Hashimoto) amb les no patològiques (golls multinodulars i donants sans), de les citocines estudiades ( $LT\alpha$ ,  $LT\beta$ ,  $IFN\gamma$ ), del seu receptor  $LT\beta$  i de les quimiocines ( $CCL21$ ,  $CCL22$ ,  $CXCL12$  i  $CXCL13$ ) s'ha trobat incrementat el nivell d'mRNA de  $LT\alpha$ , d' $IFN\gamma$ ,  $CXCL12$  i  $CCL22$  en les glàndules dels malalts amb tiroïditis de Hashimoto i de Graves-Basedow ( $p < 0,022$ ;  $p < 0,024$ ;  $p < 0,030$  i  $p < 0,010$  respectivament).  $CXCL13$  es detecta de forma constant i exclusiva en les AITDs ( $p < 0,011$ ). A diferència de les anteriors molècules, l'expressió incrementada de  $CCL21$  en les AITDs mostra només una tendència no estadísticament significativa ( $p = 0,09$ ). Els nivells d'expressió de  $LT\beta$  i  $LT\beta$  no presenten una correlació amb el diagnòstic d'autoimmunitat tiroïdal ( $p = 0,6$  i  $p = 0,54$  respectivament). Els resultats distribuïts per molècula i per patologia es troben detallats a la *taula IV* de l'annex.

#### 4.12 LES TIROÏDES ON ES DESENVOLUPEN FOL·LICLES LIMFOIDES HIPEREXPRESSEN $IFN\gamma$ , $CXCL12$ , $CXCL13$ I $CCL22$

La presència de les esmentades citocines de la família del TNF i les quimiocines homeostàtiques es relaciona directament amb la neoformació de teixit limfoide terciari a la tiroide. En auna glàndula sense paràmetres clínics o analítics d'autoimmunitat tiroïdal (diagnosticada com a goll multinodular amb infiltració limfocítica) s'ha detectat la presència de tiroïditis focal amb desenvolupament de fol·licles limfoïdes, per tant els resultats s'han analitzat en base a la presència/absència de centres germinals ectòpics. L'assaig s'ha fet mitjançant RT-PCR a temps real utilitzant estàndards externs, dels quals s'ha determinat prèviament el límit de sensibilitat per dilucions successives.

Els resultats (*figura 39*) de l'agrupació indiquen que, pel que fa a les citocines i els seus receptors, l'estructuració de fol·licles limfoïdes intratiroïdals s'associa amb nivells significativament elevats d' $IFN\gamma$  ( $p < 0,024$ ), mentre que la resta de molècules estudiades ( $LT\alpha$ ,  $LT\beta$  i  $LT\beta$ ) encara que mostren una tendència a ser més elevades al grup de glàndules GC+, no presenten una correlació "expressió elevada de citocina-generació de centre germinal".

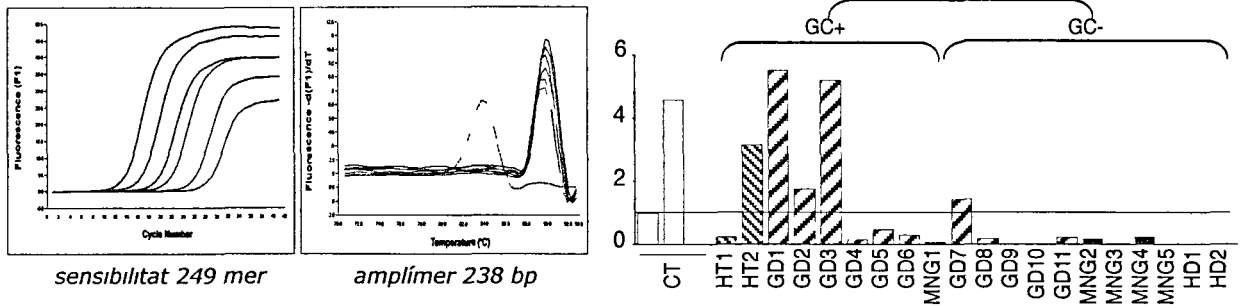
*Fig. 39 Quantificació de l'expressió de citocines i de receptors a les tiroïdes autoimmunitàries.* Els gràfics representen la semiquantificació del mRNA de les citocines  $LT\alpha$ ,  $LT\beta$  i  $IFN\gamma$  i del receptor  $LT\beta$  per RT-PCR, hibridació amb oligosondes i quantificació de l'amplímer. Els nivells d'expressió es representen a l'eix Y com a índex obtingut per divisió entre la mitjana dels valors de cada citocina en cada mostra en quatre experiments independents per la mitjana dels valors de GAPDH en sis experiments independents de la corresponent mostra. Per tal de referenciar el valor d'expressió de cada citocina a un teixit limfoide conegut, a les gràfiques s'inclou una línia horitzontal que indica el nivell d'expressió d'aquestes a les amígdales palatines preses com a teixit de referència i a les quals li hem atribuït el valor arbitrari 1. Les mostres utilitzades corresponen a tiroïdes de malalts amb autoimmunitat tiroïdal (tiroïditis de Hashimoto, HT; Graves-Basedow, GD) i a tiroïdes sense patologia autoimmunitària (goll multinodular, MNG; donants sans, HD). A la vegada les mostres estan segregades en funció de la presència de fol·licles limfoïdes ectòpics visibles en seccions i tinció amb H/E (identificades com a "GC+"). La resta de mostres, usades com a controls, i anotades com a "C" inclouen: amígdales palatines, nòduls limfàtics i esòfag. Hem considerat que: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, sense significació estadística.



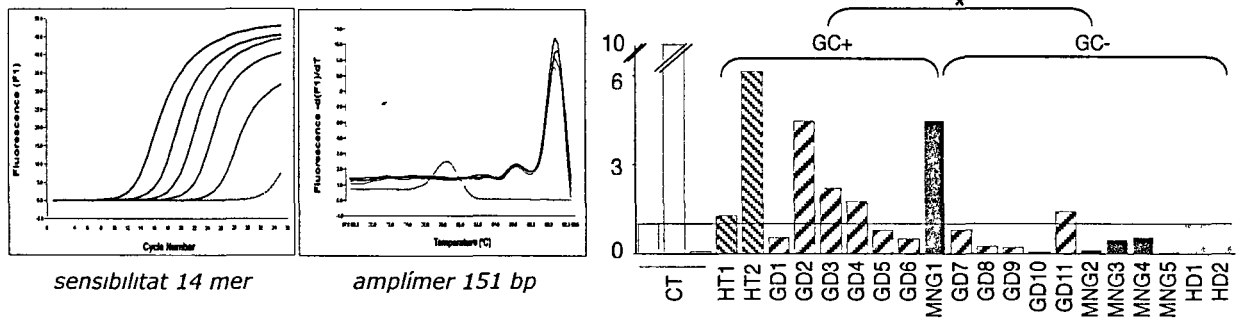
El comportament de les quimiocines és més uniforme donat que l'expressió de les quimiocines homeostàtiques CXCL12, CXCL13 i CCL22 sí que s'associa amb la limfogeneïsi a la tiroide ( $p < 0,022$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,007$ ; respectivament) (figura 40). El nivell d'expressió comparat amb el del gangli limfàtic (considerat com a teixit de referència) és variable per CXCL12, però no l'expressió de CCL21, encara que s'intueix una tendència a la hiperexpressió en les AITDs.

**Fig. 40** Quantificació de quimiocines a les tiroïdes autoimmunitàries. Els gràfics de l'esquerra representen la cinètica d'amplificació dels estàndards utilitzats com a control de quantitat de cDNA usat en funció del nombre de cicles d'amplificació i les corbes de desnaturalització del material amplificat en funció de l'increment de temperatura. Els estàndards s'identifiquen com a línies en colors diferents mentre que l'amplificació del control negatiu es mostra en color vermell. A la dreta la quantificació del mRNA de les quimiocines CCL21, CXCL12, CXCL13 i CCL22 mitjançant RT-PCR a temps real. Els nivells d'expressió es representen a l'eix Y com a índex obtingut per divisió entre la mitjana dels valors de cada quimiocina/citocina en cada mostra en quatre experiments independents per la mitjana dels valors de GAPDH en sis experiments independents de la corresponent mostra. Per tal de referenciar el valor d'expressió de cada quimiocina a un teixit limfoide conegut, a les gràfiques s'inclou una línia horitzontal que indica el nivell d'expressió d'aquestes a les amígdales palatines a les quals li hem atribuït el valor arbitrari 1. Les mostres utilitzades corresponen a tiroïdes de malalts amb autoimmunitat tiroïdal (tiroïditis de Hashimoto, HT; Graves-Basedow, GD) i a tiroïdes sense patologia autoimmunitària (goll multinodular, MNG; donants sans, HD). A la vegada les mostres estan segregades en funció de la presència de fol·licles limfoides ectòpics visibles (GC+). La resta de mostres, usades com a controls, i anotades com a "C" inclouen: amígdales palatines, nòduls limfàtics i esòfag. Hem considerat que: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, sense significació estadística.

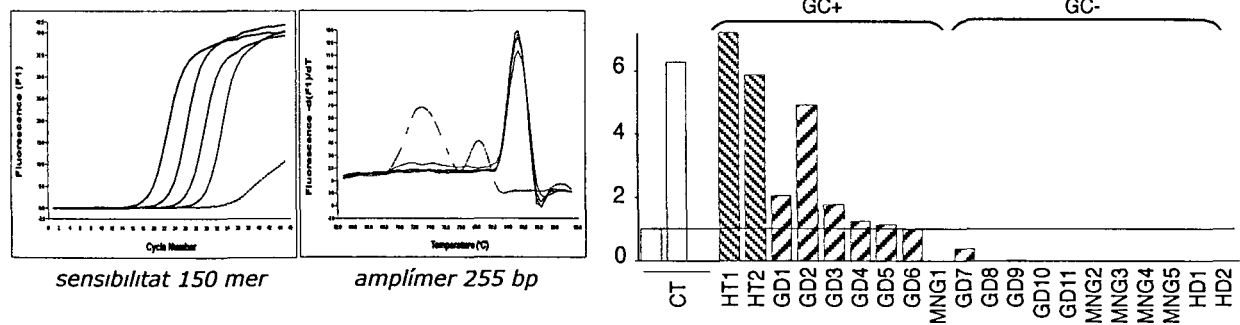
**CCL21**



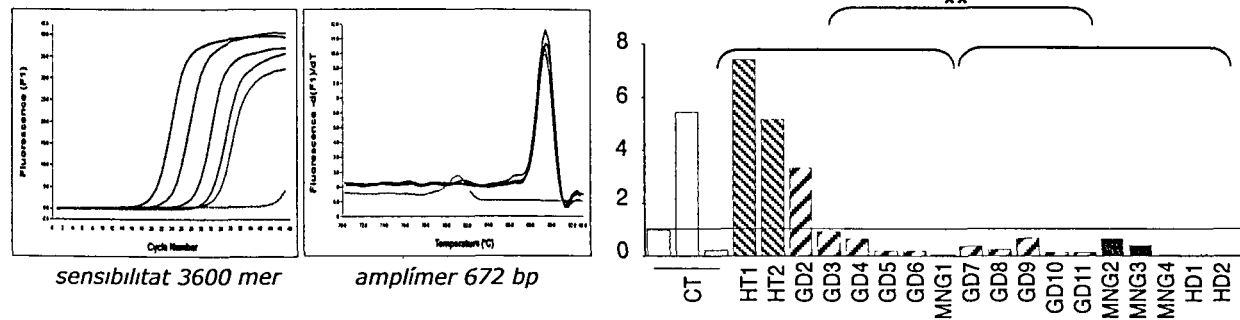
**CXCL12**



**CXCL13**



**CCL22**



#### 4.12.1 La hiperexpressió de les quimiocines CXCL13 i CCL22 es correlaciona amb el grau d'infiltració limfocitària

Per tal de corroborar les dades que indiquen associació entre presència d'infiltrat limfocitari i desenvolupament de LFs intratiroidals, s'ha determinat el grau de correlació entre aquest paràmetre i el nivell d'expressió de quimiocines/citocines. Els resultats que es presenten a la figura 41 demostren una correlació del nivell d'infiltrat amb CXCL13 i CCL22 ( $r=0,972$ ,  $p=0,0009$  per CXCL13 i  $r=0,983$ ,  $p=0,0009$  per CCL22).

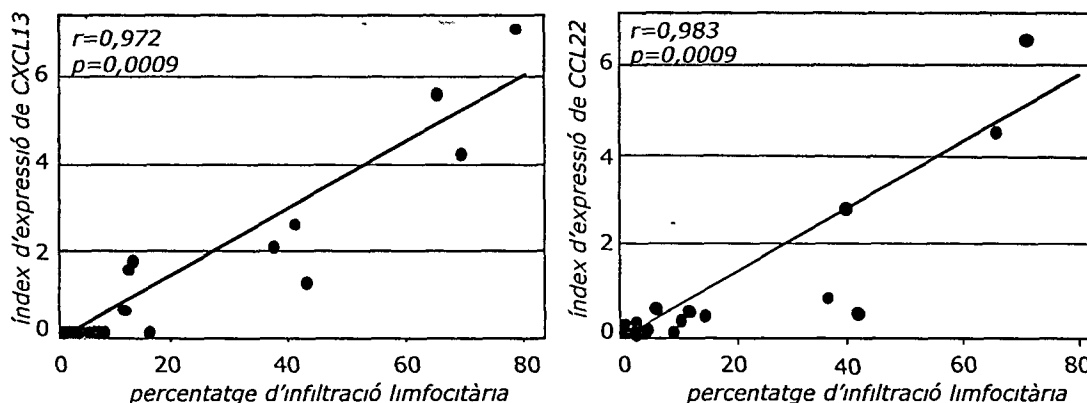


Fig. 41 Relació entre el percentatge d'infiltració limfocitària i la transcripció de les quimiocines CXCL13 i CCL22. Gràfics que representen la correlació i el seu grau de significació entre el nivell d'expressió de dues quimiocines i el tant per cent d'infiltrat limfoide. En el càlcul s'han considerat les mostres amb i sense centres germinals ectòpics.

#### 4.12.2 La combinació "grau d'infiltració limfocitària-expressió de CXCL13 i de CCL22" prediu el desenvolupament de LFs intratiroidals

L'anàlisi uni- o bivariant referent a l'expressió de citocines, quimiocines, títols d'autoanticossos, percentatge d'infiltrat limfocitari, etc, s'ha dut a terme també mitjançant una anàlisi multivariant discriminant. Així, s'han considerat els grups d'estudi: 1, tiroïdes amb fol·licles limfoides; 0, tiroïdes sense fol·licles limfoides i s'ha calculat el pes de cada variant com a coeficient d'una funció global que inclou totes les variables. Els resultats (taula XII), que són lleugerament diferents en funció del tipus d'imputació dels resultats "missing" (imputació per regressió i imputació pel càlcul de la mitjana) coincideixen a considerar que l'expressió de CXCL13, conjuntament amb altres com expressió de CCL22, grau d'infiltració i en amb menor pes l'expressió d'LTbetaR o LTalfa, poden predir en un 98% la probabilitat de desenvolupament de fol·licles limfoides intratiroidals.

	funció
CXCL12	-0,267
CCL21	0,301
CXCL13	<b>3,668</b>
CCL22	<b>-4,926</b>
LTalfa	-0,157
LTbeta	-0,173
LTbetaR	<b>0,780</b>
IFNgamma	-0,222
%LI	<b>1,942</b>

	<i>funció</i>
<i>CXCL12</i>	<b>-1,113</b>
<i>CCL21</i>	0,890
<i>CXCL13</i>	<b>4,014</b>
<i>CCL22</i>	-0,344
<i>LTalfa</i>	<b>1,027</b>
<i>LTbeta</i>	0,167
<i>LTbetaR</i>	<b>3,338</b>
<i>IFNgamma</i>	0,227
<i>%LI</i>	-0,268

*Taula XII.* Superior: resultats de l'anàlisi discriminant en que s'ha usat la imputació per regressió de les dades "missing". Inferior: resultats de l'anàlisi discriminant en que s'ha usat la imputació per càlcul de la mitjana de les dades "missing".

#### **4.13 ELS TIRÒCITS SÓN LES PRINCIPALS CÈL·LULES PRODUCTORES DE CXCL12**

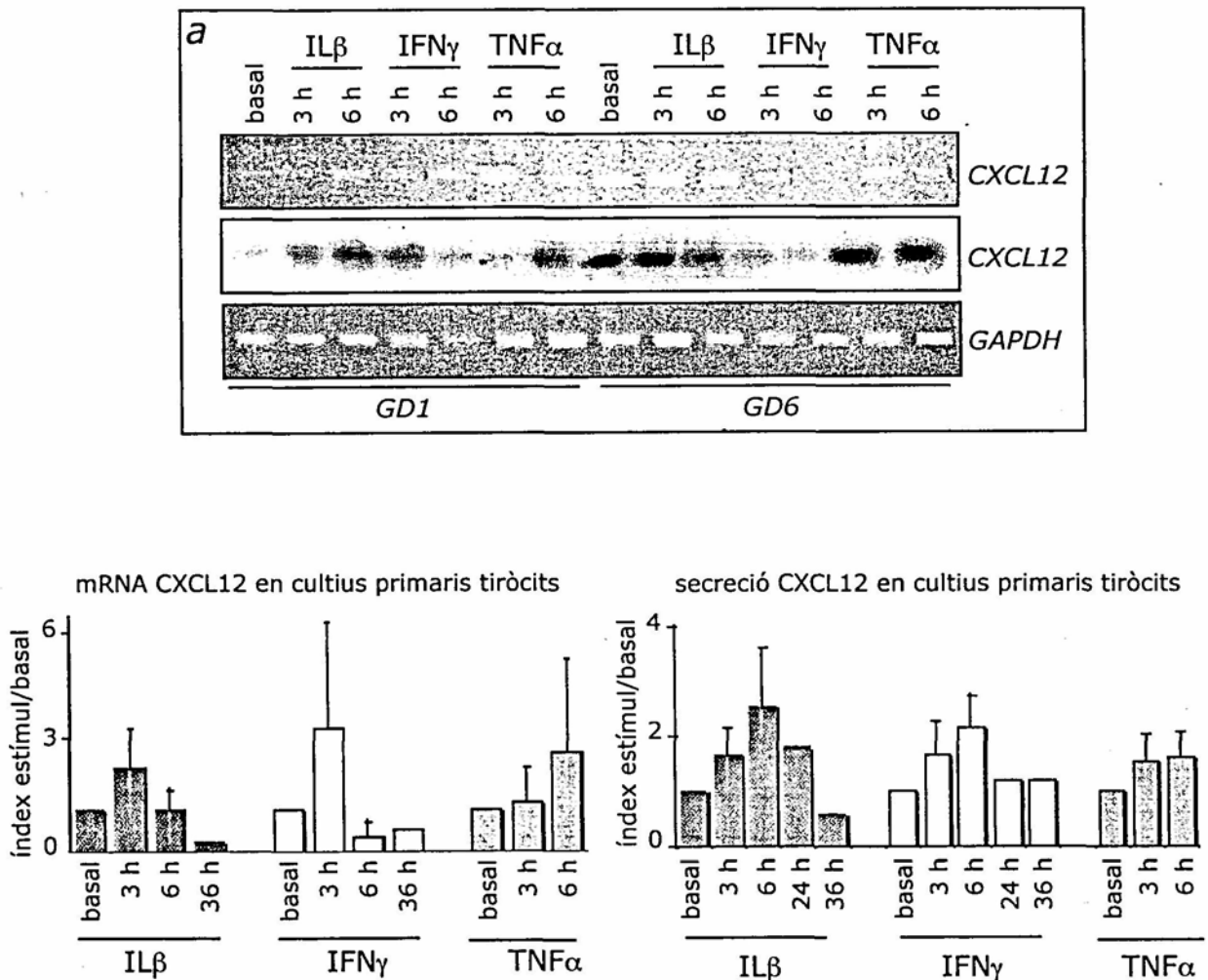
El nivell d'expressió de CXCL12, tot i que és detectable als tiròcits de les glàndules sense autoimmunitat tiroïdal, quantitativament és menor que el que es detecta a les tiroïdes amb AITD. Ja que la síntesi d'aquesta quimiocina per part de l'epiteli tiroïdal podria tenir implicacions patogèniques i que és conegut que les AITDs s'alliberen *in situ* citocines inflammatòries, tot i que CXCL12 és una quimiocina considerada homeostàtica, ens hem plantejat la relació que podia existir entre expressió de CXCL12 i l'activació dels tiròcits per determinades citocines proinflammatòries. Per a determinar-ho hem estudiat l'efecte estimulador/inhibidor que la IL1 $\beta$ , l'IFN $\gamma$  i el TNF $\alpha$  poden tenir sobre cultius primaris de tiròcits purificats.

Els resultats obtinguts, utilitzant tant tiròcits de malalts com d'individus sans, han demostrat que les tres citocines pro-inflamatòries indueixen un increment en la transcripció de CXCL12 (mesurat mitjançant RT-PCR semiquantitativa i hibridació) que assoleix un pic màxim en referència a l'expressió de CXCL12 basal a les 3 hores després de l'inici de l'estímul i que minva progressivament fins als nivells previs a l'estímul (*figura 42*). Encara que el patró de transcripció de CXCL12 estimulat per citocines és similar, la cinètica sota els diferents estímuls no és exactament igual, donat que la IL1 $\beta$  indueix uns nivells superiors a les 3 hores i que el TNF $\alpha$  manté la seva capacitat d'estimulació de CXCL12 durant un període més perllongat (superior a les 36 hores post-estimulació).

A nivell proteic, i com era d'esperar dels anteriors resultats, les tres citocines indueixen una secreció de CXCL12 $\alpha$  al medi (mesurat per ELISA) seguint un perfil que es correspon amb el del patró d'estimulació de mRNA, en el que el màxim de producció s'assoleix a les 6 hores post estímul. La secreció és màxima quan la citocina emprada és IFN $\gamma$ , que incrementa la producció de CXCL12 $\alpha$  des de 3,72 $\pm$ 1,4 ng/ml fins a 7,56 $\pm$ 0,75 ng/ml.

Aquesta mateixa aproximació s'ha utilitzat per induir l'expressió de les altres quimiocines per part dels tiròcits. Els resultats indiquen que en cas s'observa una correlació entre temps de cultiu amb citocina i increment o disminució del mRNA de CCL21 ni de CXCL13. La manca de regulació de la resta de quimiocines per les mateixes citocines inflammatòries confirma l'especificitat de la inducció de CXCL12 als tiròcits humans.



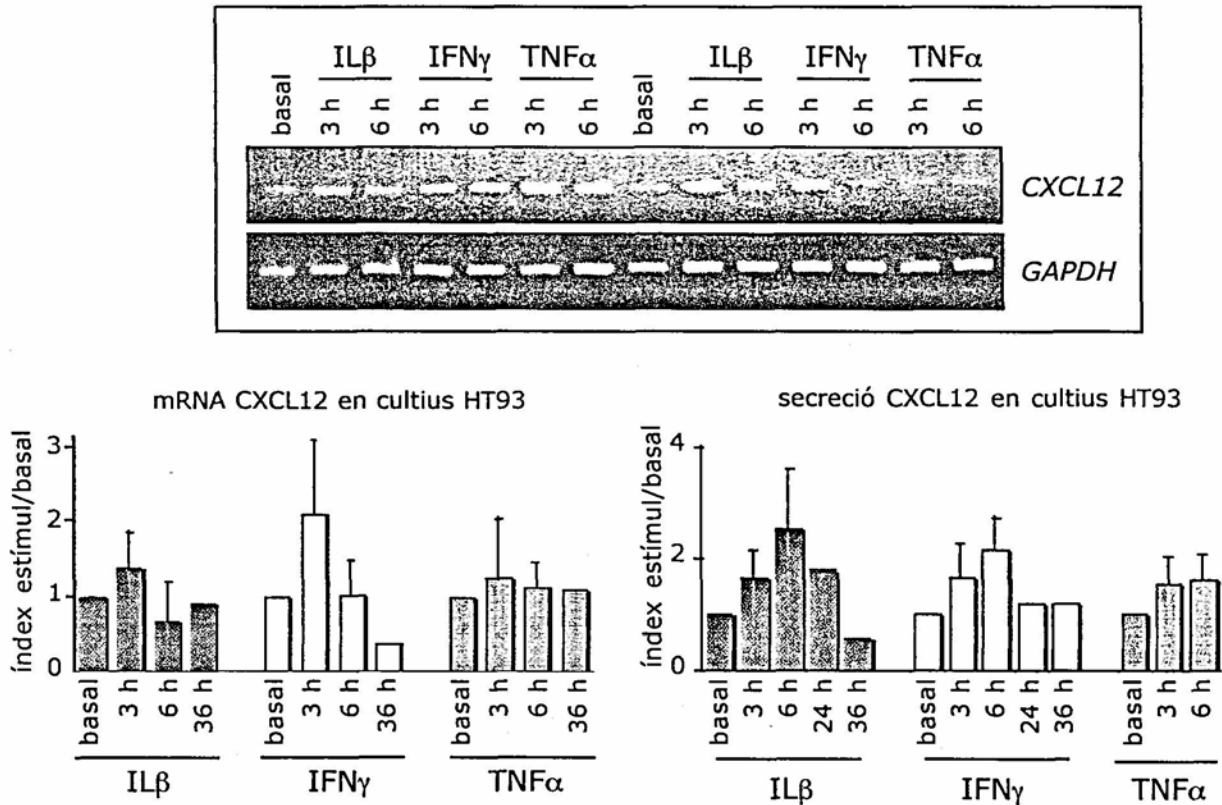


*Fig. 42 Regulació de l'expressió i secreció de CXCL12 en cultius primaris de tiròcits. Imatges de les amplificacions de CXCL12 i de GAPDH a partir de cultius primaris de tiròcits estimulats amb IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$  o TNF $\alpha$  durant els períodes de temps indicats a cada gràfic. Els gràfics indiquen la quantificació del mRNA de CXCL12 i la mesura de la secreció de CXCL12 $\alpha$  mitjançant ELISA tant a nivells basals com post estimulació amb citocines pro-inflamatòries. Els resultats s'expressen com a índex $\pm$ desviació estàndard de CXCL12 respecte el nivell basal i són el resultat de la mitjana obtinguda en quatre experiments independents.*

#### 4.13 LA PRODUCCIÓ DE CXCL12 PER LA LÍNIA CEL·LULAR HT93 SEGUEIX EL MATEIX COMPORTEMENT QUE ELS TIRÒCITS

El sistema de purificació de cèl·lules epitelials a partir de digestions mecàniques/enzimàtiques de tiroïdes és una tècnica establerta que permet una purificació elevada de tiròcits però, donat que la detecció de mRNA de CXCL12 s'ha fet mitjançant una tècnica sensible, existeix la possibilitat de que cèl·lules diferents de tiròcits (com fibroblastes, cèl·lules dendrítiques, macròfags, etc) que poden contaminar el cultiu, puguin ser la font de CXCL12. Per eliminar aquesta possibilitat hem estimulat cultius de la línia cel·lular tiroïdal HT93 amb les mateixes quantitats i condicions que els tiròcits i s'ha mesurat l'expressió de mRNA de CXCL12 i la secreció de CXCL12 $\alpha$  al

sobrenedant dels cultius. Els resultats obtinguts (*figura 43*) confirmen els procedents dels cultius primaris de tiròcits, ja que les tres citocines indueixen una secreció de la quimiocina al medi seguint el mateix perfil que als tiròcits. Així, els pics d'increment de missatge per la quimiocina són màxims a les tres hores i la citocina que indueix un increment de l'expressió més elevat de CXCL12 $\alpha$  és IL1 $\beta$ . A temps d'incubació més perllongats el missatge va minvant fins a arribar a nivells similars als basals a les 24 hores d'estimulació. La regulació de la secreció al medi de cultiu també és semblant a la dels tiròcits, que d'un nivell basal d'alliberament de  $3,8 \pm 0,14$  ng/ml augmenta fins als  $13,8 \pm 1,6$  ng/ml post-estimulació a les 24 hores amb cultiu amb IFN $\gamma$ .



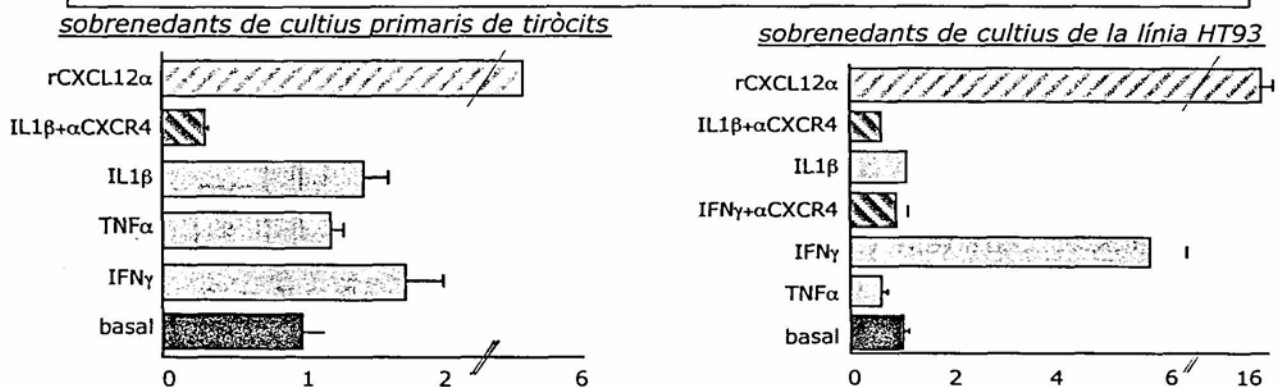
*Fig. 43 Regulació de l'expressió i secreció de CXCL12 a la línia cel·lular tiroïdal HT93. Imatges de les amplificacions de CXCL12 i de GAPDH a partir de cultius de la línia cel·lular tiroïdal HT93 estimulats amb IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$  o TNF $\alpha$  durant els períodes de temps indicats a cada gràfic. Els gràfics indiquen la quantificació del mRNA de CXCL12 i la mesura de la secreció de CXCL12 $\alpha$  mitjançant ELISA tant a nivells basals com post-estimulació amb citocines pro-inflamatòries. Els resultats s'expressen com a índex $\pm$ desviació estàndard de CXCL12 respecte el nivell basal i són el resultat de la mitjana obtinguda en quatre experiments independents.*

#### 4.14 EL CXCL12 SECRETAT PELS TIRÒCITS I PER LES HT93 TÉ ACTIVITAT QUIMIOTÀCTICA PELS LIMFÒCITS

La capacitat de transcriure gens corresponents a altres quimiocines (sobretot quimiocines pro-inflamatòries) o de secretar-les al medi de cultiu per part de cèl·lules epitelials havia estat reportada per alguns autors<sup>463</sup> però el nivell de producció dels tiròcits i sobretot la funcionalitat de la quimiocina produïda no s'havien demostrat. Per fer-ho hem utilitzat els sobrenedants dels cultius de cèl·lules epitelials tiroïdals estimulades amb citocines en assajos de transmissió fets per duplicat utilitzant limfòcits de sang perifèrica de dos individus sans.

Així, s'ha observat que la migració espontània dels PBMCs després d'incubació en medi complet amb un 5% de sèrum boví fetal durant 30min és de  $120,8 \pm 16,5$  cèl·lules/ $\mu$ l (figura 44). La capacitat migratòria augmenta amb l'addició dels sobrenedants de cèl·lules estimulades durant 6 hores amb citocines i assoleix un màxim índex de migració amb el sobrenedant de cèl·lules tiroïdals estimulades amb  $IFN\gamma$  fins a valors de  $210,8 \pm 49,4$  cèl·lules/ $\mu$ l. La migració màxima assolida pels mateixos PBMCs enfront una concentració de 100ng/ml de CXCL12 $\alpha$  recombinant humà és de  $654,9 \pm 15,2$  cèl·lules/ $\mu$ l i la incubació prèvia de les cèl·lules amb anticòs bloquejant anti-CXCR4 inhibeix específicament la migració fins a valors de  $40,4 \pm 2,2$  cèl·lules/ $\mu$ l.

**Fig. 44 Funcionalitat del CXCL12 $\alpha$  produït pels tiròcits i per la línia tiroïdal HT93.** Quimiotaxi de limfòcits de sang perifèrica en assajos de transmigració en els que la font de quimiocina és el sobrenedant dels cultius primaris de cèl·lules epitelials tiroïdals o d'HT93 estimulades durant 6 hores amb citocines inflamatòries. Els resultats s'expressen a l'eix "x" com a índex i estan calculats com a relació entre el nombre de cèl·lules que migren específicament i les derivades de la migració espontània (a la que se li ha atribuït el valor arbitrari 1). A l'eix "y" s'indiquen els estímuls (rCXCL12 $\alpha$ , 100ng/ml CXCL12 $\alpha$  recombinant humà; IL1 $\beta$ + $\alpha$ CXCR4, limfòcits bloquejats amb anticòs anti-CXCR4 i incubats amb sobrenedant de tiròcits estimulats amb IL1 $\beta$ ; IL1 $\beta$  sobrenedant de tiròcits estimulats amb IL1 $\beta$ ; TNF $\alpha$  sobrenedant de tiròcits estimulats amb TNF $\alpha$ ; IFN $\gamma$ + $\alpha$ CXCR4, limfòcits bloquejats amb anticòs anti-CXCR4 i incubats amb sobrenedant de tiròcits estimulats amb IFN $\gamma$ ; IFN $\gamma$ , sobrenedant de tiròcits estimulats amb IFN $\gamma$ ; basal, sobrenedant de tiròcits sense estímulo).



Els assajos de quimiotaxi també s'han realitzat amb els sobrenedants dels cultius de la línia HT93 estimulats amb citocines. El perfil de resposta migratòria és similar, incrementa lleugerament amb el sobrenedant dels estímuls amb IL1 $\beta$  i es bloqueja específicament amb l'addició prèvia de l'anticòs bloquejant. En els sobrenedants dels estímuls amb IFN $\gamma$  el nombre total de limfòcits que migren és màxim ( $391,7 \pm 112,3$  cèl·lules/ $\mu$ l) en comparació al trobat a nivell basal ( $68,4 \pm 8,4$  cèl·lules/ $\mu$ l). El control positiu de migració quan s'utilitzen com estímulo 100ng/ml de CXCL12 $\alpha$  recombinant humà arriba a  $1106,9 \pm 47,2$  cèl·lules/ $\mu$ l.

#### 4.15 ELS LEUCÒCITS QUE INFILTREN LES TIROIDES EXPRESSEN ELS RECEPTORS DE QUIMIOCINES CORRESPONENTS

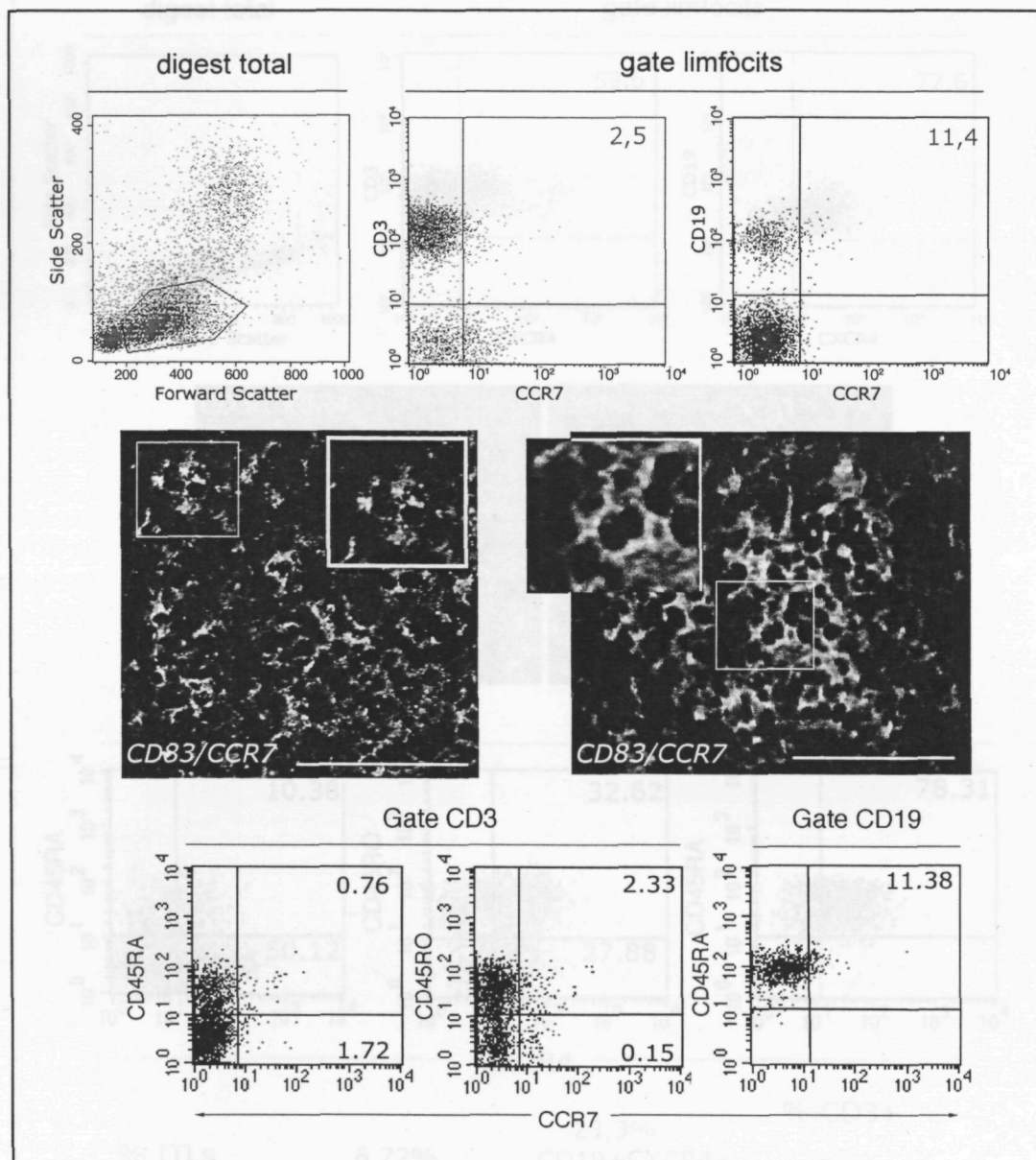
El desenvolupament d'estructures complexes com els fol·licles limfoides, a més d'estar dirigit per un patró de quimiocines i de citocines propi, requereix la presència en la superfície dels leucòcits dels receptors de quimiocines corresponents. El reconeixement quimiocina/receptor (a part d'altres molècules involucrades ja descrites) contribuirà a dirigir els diferents tipus cel·lulars a un microambient concret. És conegut que el sistema de quimiocines/receptors és pleiotròpic, però fins a l'actualitat per cada quimiocina

homeostàtica involucrada en la formació de centres germinals (CCL21, CXCL12 i CXCL13) s'ha descrit només un receptor: CCR7, CXCR4 i CXCR5. L'expressió, el patró de distribució i el percentatge de cèl·lules positives dels esmentats receptors s'ha determinat mitjançant dobles immunofluorescències indirectes sobre seccions de tiroïdes de malalts amb autoimmunitat tiroïdal i en seccions de tiroïdes d'individus sans i també per citofluorimetria dels limfòcits intratiroïdals obtinguts de digestions enzimàtiques/mecàniques de les glàndules. Donat que l'acció quimiotàctica de determinades quimiocines s'exerceix sobre subpoblacions concretes de cèl·lules T o B, l'expressió dels receptors s'ha quantificat en triples tincions en les que s'assumeix el fenotip CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> com a propi de cèl·lules T preimmunes. En experiments preliminars propis en els que se sotmetia una població de limfòcits de sang perifèrica a digestió amb quantitats equivalents de tripsina/col·lagenasa, es va excloure la possibilitat que els receptors de quimiocines fossin afectats per la digestió enzimàtica, però es va determinar que la molècula CD45 (tant CD45RA com CD45RO) es veia reduïda en un 30%, per tant la distribució relativa d'ambdues poblacions roman comparable.

Els resultats (que es detallen per receptor i glàndula mostrats a l'*annex taula V*) es comenten a continuació per cada tipus cel·lular i per cada receptor concret:

- *CCR7*, expressat a cèl·lules T preimmunes, B preimmunes i a cèl·lules dendrítiques, permet l'arribada als òrgans limfoides secundaris via reconeixement del seu lligand CCL21 secretat per les vècules d'endoteli alt. En els infiltrats tiroïdals (*figura 45*), aquest receptor es troba quantitativament poc present ja que es detecta en el 4,7±2,8% dels limfòcits infiltrants. Quan es consideren per separat les cèl·lules CD3<sup>+</sup> i CD19<sup>+</sup>, el 2,5±1,4% de les cèl·lules T i el 11,4±7,1% de les cèl·lules B expressen aquest receptor en membrana. La baixa proporció de limfòcits que expressen CCR7 a la tiroide (i que es comentarà a la discussió) pot ser deguda, entre d'altres factors, a la regulació negativa d'aquest receptor com a conseqüència de l'arribada de les cèl·lules a l'òrgan. Els estudis d'immunohistoquímica han confirmat els resultats de citometria de fluxe i demostren que les cèl·lules T i B CCR7<sup>+</sup> no presenten una distribució concreta mentre que les cèl·lules dendrítiques són abundants i es localitzen a la zona més externa del fol·licle limfoide. Un fenomen observat comú a tots els receptors estudiats és que la densitat de receptors en les cèl·lules B és més elevada que en els limfòcits T, cosa que es reflexa en la mediana de fluorescència, que en les CD19<sup>+</sup> és de 27,8 i en les CD3<sup>+</sup> és de 20,7.
- En la classificació de les cèl·lules CD3<sup>+</sup> en funció de l'expressió de CD45RA/CD45RO, s'observa que majoritàriament els limfòcits CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> són els més abundants. Al marge dels limfòcits, s'ha detectat també una població de cèl·lules dendrítiques madures CD83<sup>+</sup>, que poden arribar a representar el 40% del total de les dendrítiques, que expressen CCR7. Ni a l'infiltrat difús de les tiroïdes sense fol·licles limfoides ectòpics ni a les tiroïdes sense patologia immunitària no hem detectat limfòcits ni cèl·lules dendrítiques CCR7<sup>+</sup>.

*Fig. 45 Expressió de CCR7 als limfòcits intratiroïdals.* Els dot plots de la part superior de la figura mostren la complexitat de la població cel·lular obtinguda després de la digestió de les tiroïdes (dots negres) i la finestra d'anàlisi (gate limfòcits, dots vermells) usada per analitzar l'expressió de CCR7 a les cèl·lules T CD3<sup>+</sup> i a les cèl·lules B CD19<sup>+</sup>. Al centre es mostren dobles immunofluorescències on s'observen zones amb acúmuls de cèl·lules dendrítiques CD83<sup>+</sup> (verd), algunes de les quals són CCR7<sup>+</sup> (vermell) en les que la majoria de cèl·lules CCR7<sup>+</sup> són dendrítiques. Al requadres interiors es mostren dues zones ampliades. Els augments utilitzats es mostren amb una línia horitzontal que equival a 100µm. Les citometries de la part inferior corresponen a les anàlisis de l'expressió de CCR7 en les cèl·lules CD3<sup>+</sup> i CD19<sup>+</sup> en funció de CD45RA o CD45RO. Els percentatges que s'indiquen corresponen a les mitjanes de set experiments independents.



- CXCR4, únic lligand de CXCL12, és present a totes les glàndules en les que la infiltració limfocitària és important i el nombre de limfòcits que expressen CXCR4 a la seva superfície és significativament superior als que expressen CCR7 (figura 46). Els resultats de citometria de fluxe mostren que l'infiltrat limfoide CXCR4<sup>+</sup> és quantitativament important i representa el 61,7±15,4% del total. La distribució per tipus cel·lulars indica que el 59,6±15,0% de les cèl·lules T i el 77,6±10,2% de les B són CXCR4 positives. Com s'ha comentat per CCR7, la densitat de CXCR4 a la superfície de les cèl·lules B també és superior que a les T, com ho demostren les mitjanes de fluorescència que són de 109,9 i 38,2 respectivament. Les tincions sobre tiroïdes autoimmunitàries mostren que la majoria de cèl·lules positives per a aquest receptor són petites, es mostren agrupades i presenten una tinció de membrana distribuïda uniformement per tota la cèl·lula. En alguns casos es poden observar cèl·lules amb un contingut de CXCR4 en petites vesícules properes a la membrana plasmàtica (fenomen ja descrit en alguns treballs). A les tiroïdes amb centres germinals, les cèl·lules CXCR4<sup>+</sup> són més abundants en la zona externa dels fol·licles limfoides encara que a l'interior d'aquests també se'n poden trobar de disperses. Les immunofluorescències dobles amb anticossos anti-CD3 i anti-CD19 mostren que tant els limfòcits T com B, localitzats a la corona del fol·licle limfoide, són CXCR4<sup>+</sup> i que en la majoria de cèl·lules ambdues tincions colocalitzen.

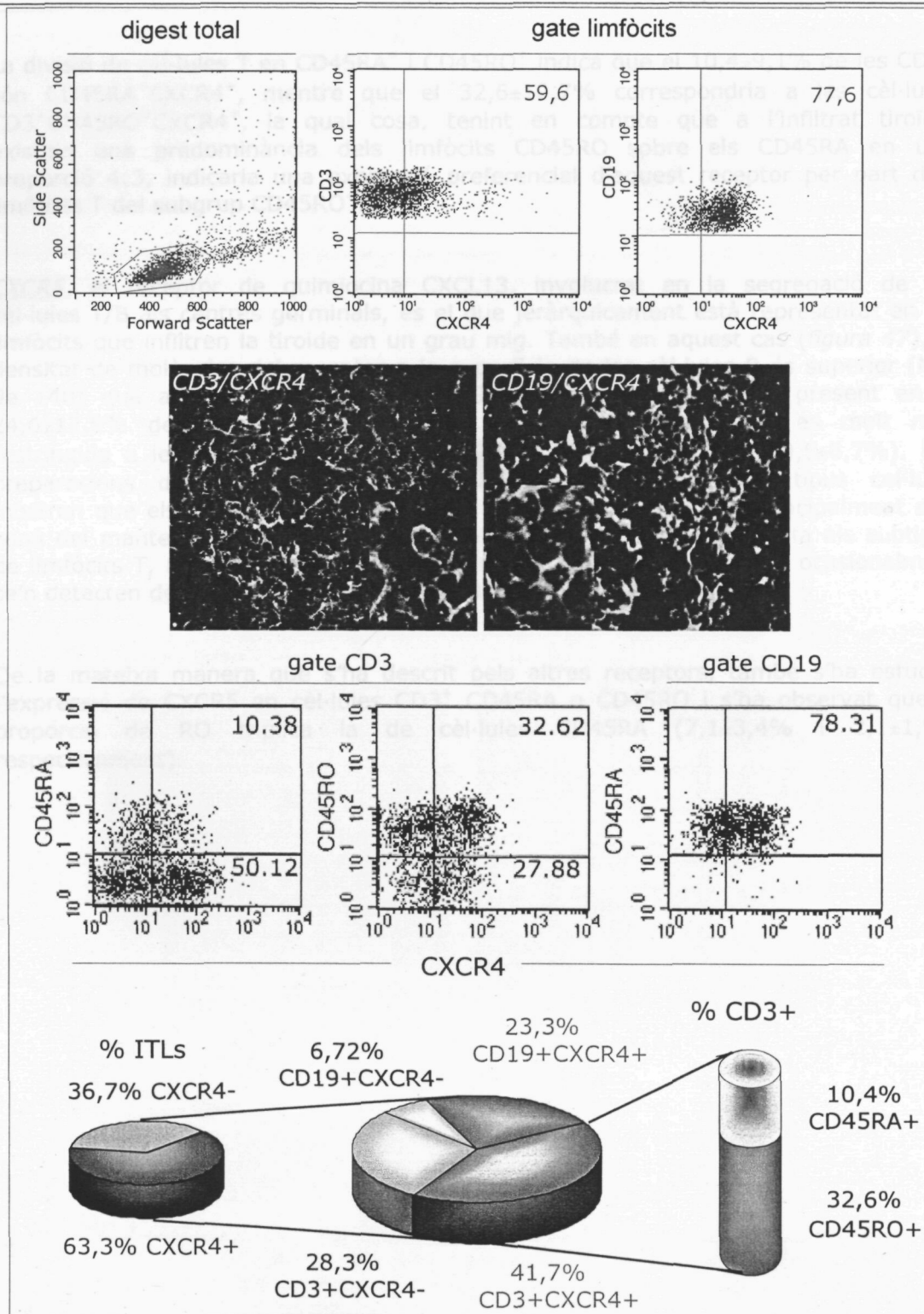


Fig. 46 Expressió de CXCR4 als limfòcits T i B intratiroidals. Part superior: població de cèl·lules obtingudes post-digestió d'una tiroide d'un Hashimoto (dots negres) i finestra d'anàlisi (gate limfòcits, dots vermells) usada per analitzar l'expressió de CXCR4 a les cèl·lules CD3<sup>+</sup> i CD19<sup>+</sup>. Centre: imatges representatives de dobles immunofluorescències on s'observa en vermell el senyal del receptor i en verd CD3 (a la imatge de l'esquerra) i CD19 (a la dreta). Al requadres interiors es mostren dues zones ampliades. Els augments utilitzats es mostren amb una línia horitzontal que equival a 100µm. Part inferior: anàlisi de l'expressió de CXCR4 a cèl·lules CD3<sup>+</sup> i CD19<sup>+</sup> en funció de l'expressió de CD45RA o CD45RO. Els % indicats corresponen a les mitjanes de 7 experiments independents. Gràfic inferior: % de cèl·lules CXCR4<sup>+</sup> en l'infiltrat limfocitari que són respectivament CD19<sup>+</sup> o CD3<sup>+</sup> i alhora expressen CD45RA o CD45RO.

- La divisió de cèl·lules T en CD45RA<sup>+</sup> i CD45RO<sup>+</sup> indica que el 10,4±9,1% de les CD3<sup>+</sup> són CD45RA<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>, mentre que el 32,6±10,7% correspondria a les cèl·lules CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>, la qual cosa, tenint en compte que a l'infiltrat tiroïdal existeix una predominància dels limfòcits CD45RO sobre els CD45RA en una proporció 4:3, indicaria una expressió preferencial d'aquest receptor per part dels limfòcits T del subgrup CD45RO<sup>+</sup>.
- CXCR5, el receptor de quimiocina CXCL13, involucrat en la segregació de les cèl·lules T/B als centres germinals, és el que jeràrquicament està representat en els limfòcits que infiltren la tiroide en un grau mig. També en aquest cas (*figura 47*), la densitat de molècules del receptor a la superfície de les cèl·lules B és superior (MFI de 140) que a la de les cèl·lules T (49,7). En percentatges, és present en el 24,6±12,9% dels limfòcits intratiroïdals però la seva expressió és molt més restringida a les cèl·lules CD19<sup>+</sup> (67,2±19,0%) que a les CD3<sup>+</sup> (10,5±8,7%). Les preparacions d'immunofluorescència dobles amb marcadors de tipus cel·lular mostren que els limfòcits CD19<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> i CD3<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> se situen principalment a la zona del mantell fol·licular i a l'interior del centre germinal. Pel que fa als subtipus de limfòcits T, no detectem cèl·lules CD8<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> mentre que sí que ocasionalment se'n detecten de CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> a les àrees d'infiltració difusa.
- De la mateixa manera que s'ha descrit pels altres receptors, també s'ha estudiat l'expressió de CXCR5 en cèl·lules CD3<sup>+</sup> CD45RA o CD45RO i s'ha observat que la proporció de RO triplica la de cèl·lules CD45RA (7,1±3,4% i 2,1±1,9% respectivament).