

*UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI*  
*"FEDERICO II"*

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in Morfologia Clinica e Patologica  
XX Ciclo



**TESI DI DOTTORATO**

**FENOTIPIZZAZIONE CITOFUORIMETRICA  
DELL'INFILTRATO LINFOIDE NELLA TIROIDITE DI  
HASHIMOTO  
IN CITOLOGIA ASPIRATIVA PER AGO SOTTILE**

COORDINATORE  
PROF. STEFANIA MONTAGNANI

Tutor  
Prof. Pio Zeppa

Candidato  
Dott. Maria Lepore

## **INTRODUZIONE**

Nel 1912 Hakaru Hashimoto descrisse per la prima volta, in quattro pazienti, una malattia della tiroide caratterizzata da un aumento simmetrico di volume della ghiandola e, microscopicamente, da un infiltrato linfocitario cronico con formazione di centri germinativi (1); tale malattia fu ritenuta di natura infiammatoria e fu definita “tiroidite”. Nella descrizione originale Hashimoto osservò, inoltre, l’eosinofilia citoplasmatica dell’epitelio follicolare (poi definito oncocitario, a cellule ossifile o a cellule di Askanazy) e la condensazione della colloide.

La patogenesi autoimmune organo-specifica fu chiarita nel 1956 da Roitt che dosò un elevato titolo di anticorpi anti-tireoglobulina nel siero di pazienti affetti da tiroidite (2). Tale ipotesi patogenetica fu poi confermata dalla dimostrazione di altri anticorpi circolanti anti-tiroide quali quelli diretti contro la perossidasi tiroidea e contro il recettore per la tireotropina (3), dalla predisposizione ad altre malattie autoimmuni in pazienti con tiroidite di Hashimoto (TH) (4) e dalla scoperta negli stessi di anticorpi sierici contro antigeni non tiroidei (ad esempio, anti-cellule parietali gastriche e anti-muscolatura liscia) (5).

Le cellule follicolari epiteliali sono soggette ad un danno indotto direttamente da meccanismi di immunità cellulo-mediata o indirettamente da anticorpi. Alterazioni funzionali dei linfociti T-suppressor antigene-specifici possono permettere ad un clone mutato di linfociti T-helper di sfuggire alla sorveglianza immune, indurre la proliferazione di linfociti B secernenti anticorpi anti-self e produrre alfa-interferone. Quest'ultimo provoca l'espressione dell'antigene HLA-DR sulla superficie delle cellule follicolari, di modo che tali cellule si comportino come presentanti l'antigene (6). Gli anticorpi antiperossidasi, presenti nel 90% dei pazienti con TH, fissano il complemento, sono citotossici per i tireociti e sono strettamente associati alla disfunzione della ghiandola, al danno tiroideo ed all'infiammazione. Gli anticorpi che bloccano il recettore per la tireotropina sono presenti in circa il 10% dei pazienti con TH e sono ritenuti correlati all'insorgenza ed alla gravità dell'ipotiroidismo (7).

Pertanto, i linfociti dell'infiltrato interstiziale possono causare danno d'organo sia tramite un meccanismo citotossico diretto sia attraverso la secrezione locale di anticorpi. Sono stati ipotizzati vari meccanismi di attivazione dei linfociti T-helper: genetici, agenti virali dotati di un antigeni simili a quelli tiroidei (8) o anche una azione diretta di linfociti natural killer (9), il cui ruolo resta però oscuro. Nelle fasi successive, infine,

l'organo è progressivamente colonizzato da centri germinativi con produzione locale di anticorpi antitiroidei.

Un meccanismo chiave nel danno tiroideo è rappresentato dall'alterazione dei meccanismi di controllo della morte cellulare programmata per apoptosi ed in particolare dalla interazione Fas/Fas-ligando (10, 11). Infatti, in condizioni normali, i tireociti non esprimono il gene Fas, che appartiene alla famiglia dei geni associati alla necrosi tumorale (TNF) e che è invece espresso dai tireociti in corso di tiroidite. L'interazione tra il gene FAS neoespresso e il suo ligando (Fas-ligando) induce apoptosi dei tireociti e distruzione del tessuto ghiandolare (12-14).

## **LABORATORIO E CLINICA**

Le conseguenze della TH sulla funzione tiroidea sono varie e dipendono dalla fase della malattia. Negli stadi precoci la distruzione della tiroide ed il rilascio di ormoni tiroidei può provocare una tireotossicosi transitoria caratterizzata dalla soppressione sierica di tireotropina e da concentrazioni elevate di T3 e T4 liberi (FT3 e FT4) (7). A differenza di quanto accade nella malattia di Graves, in cui sono più elevati i valori sierici di FT3, nella tiroidite sono più elevati i valori di FT4, come nel rapporto fisiologico tra i due valori ormonali (15).

Le fasi successive sono caratterizzate da eutiroidismo, sostenuto dalle capacità funzionali della ghiandola. L'esaurimento precoce o tardivo di tali capacità funzionali, a causa dalla distruzione della ghiandola, possono determinare ipotiroidismo evidenziabile precocemente dal progressivo aumento dei valori sierici di tireotropina. L'associazione tra tireotropina elevata e FT3 e FT4 normali è conosciuta col termine di "ipotiroidismo subclinico" (16).

Con l'ulteriore progressione del danno tiroideo, la concentrazione sierica di FT4 si abbassa e la combinazione tra tireotropina elevata e FT4

basso è riferita come “ipotiroidismo manifesto” (17). Tuttavia, l’insorgenza di ipotiroidismo in corso di TH è un evento né costante né necessariamente correlato alla storia naturale della malattia (18,19). Infatti il decorso clinico della TH può essere vario: molti pazienti conservano una normale funzionalità tiroidea per tutta la vita mentre altri, in fasi tardive o addirittura precoci della malattia, manifestano ipotiroidismo sub-clinico o conclamato e necessitano di terapia sostitutiva (18,20).

### **OBIETTIVO DEL LAVORO (I)**

Da quanto esposto, l’infiltrato linfocitario non solo è la caratteristica fondamentale del quadro istologico della TH (21) ma gioca un ruolo chiave nella induzione del danno cellulare e quindi nella patogenesi dell’ipotiroidismo. Pertanto, lo studio dell’infiltrato linfoide può essere utile non solo nella diagnosi, ma anche nella valutazione delle implicazioni cliniche della TH.

La citologia per ago sottile (FNC) della tiroide rappresenta uno strumento ideale per tale studio (22). Infatti, poiché la TH non necessita generalmente di trattamento chirurgico, i campioni citologici sono i soli a disposizione per lo studio dei meccanismi patogenetici della TH e delle

caratteristiche immunofenotipiche dell'infiltrato linfoide. Per tali finalità le metodiche immunocitochimiche non sono facilmente attuabili su campioni citologici (23), soprattutto in considerazione della molteplicità dei markers richiesti per uno studio comprensivo delle popolazioni linfocitarie, che può essere effettuata in maniera ottimale mediante la citofluorimetria (24-28). In questa Tesi abbiamo valutato l'infiltrato linfoide in corso di TH mediante citofluorimetria su campioni citologici al fine di verificare eventuali rapporti tra gli aspetti fenotipici dell'infiltrato e le diverse fasi funzionali della malattia.

## **MATERIALI E METODI (I)**

Per il nostro studio sono stati arruolati, in una prima fase, 65 pazienti affetti da un ingrossamento palpabile, diffuso o nodulare della tiroide che sono stati sottoposti a FNC nell'ambulatorio di Citologia del nostro Dipartimento. Di questi pazienti (59 donne e 6 uomini, in un range di età dai 23 ai 72 anni), 54 avevano un sospetto clinico di TH per la presenza di anticorpi anti-tiroidei nel siero e/o per la presentazione ecografia e clinica. Nei rimanenti 11 un nodulo tiroideo palpabile era il solo segno obiettivo al momento del prelievo. In tutti i casi la TH è stata diagnosticata mediante esame estemporaneo di uno striscio colorato con Diff-Quik (Figure 1 e 2). Contestualmente alla diagnosi citologica, sono stati richiesti o acquisiti e valutati tutti gli esami presentati dai pazienti: studio ecografico, valutazione dei valori sierici di TSH, FT3, FT4 e degli anticorpi anti-tireoglobulina (TG) ed anti-perossidasi tiroidea (TPO). Tutti i pazienti hanno mostrato una elevata concentrazione ematica di anticorpi anti-tiroide. Per quanto concerne gli aspetti funzionali, i range di normalità ai quali ci siamo attenuti sono stati i seguenti:



TSH: 0.35-4.94 ml/litro; FT3: 2.63-5.70 pmol/litro; FT4: 9.01-19.05 pmol/litro; anticorpi anti-TPO: <40 IU/ml; anticorpi anti-TG: <35 IU/ml.

I pazienti con livelli sierici di TSH, FT3 e FT4 entro i range sopra riportati sono stati ritenuti eutiroidei; i pazienti ipertiroidei presentavano un valore soppresso di TSH e una concentrazione normale o elevata di FT3 e FT4. I pazienti con elevati livelli sierici di TSH e con livelli normali o bassi di FT3 e FT4 sono stati definiti rispettivamente ipotiroidei subclinici o cronici (15). Utilizzando tali criteri, sono stati pertanto identificati 7 pazienti ipertiroidei, 45 eutiroidei e 13 ipotiroidei.

### ***Citologia per ago sottile***

Le modalità del prelievo ed i rischi ad esso correlati (29) sono stati prima discussi col paziente; quest'ultimo è stato anche informato del fatto che due prelievi in più sarebbero stati effettuati a scopo di ricerca ed è stato ottenuto un consenso informato. In tutti i casi il primo prelievo è stato utilizzato per preparare un vetrino tradizionale che è stato colorato immediatamente con Diff-Quik, valutato per l'adeguatezza e, nello stesso tempo, usato per selezionare i casi di TH per questo studio. In caso di diagnosi positiva è stato effettuato un secondo prelievo, subito sospeso in

tampone fosfato (PBS) a cui veniva aggiunto un eventuale terzo prelievo in caso di scarsa cellularità.

### ***Citofluorimetria***

Le sospensioni cellulari sono state poi processate in due ore: in un primo tempo venivano lavate due volte tramite centrifugazione per 4 minuti a 2500 rotazioni per minuto, poi il supernatante è stato rimosso e sono stati aggiunti 400  $\mu$ L di PBS. Quando si riteneva che fossero disponibili un numero sufficiente di cellule, la sospensione finale veniva divisa in quattro cuvette. Una era messa da parte fino alla fine della procedura, allo scopo di avere altro materiale utilizzabile in caso di risultati insoddisfacenti o nel caso ci fosse bisogno di un test supplementare. Le rimanenti sono state poi incubate per 15 minuti al buio con 10  $\mu$ L della seguente combinazione di anticorpi: CD4/CD8, CD5/CD10/CD19 coniugati con ficoeritrina (PE), peridincolorofillina (PERCP), fluoresceinaisotiocianato (FITC) (Tabella 1).

Dopo l'incubazione, i globuli rossi sono stati lisati con soluzione lisante a base di cloridio di ammonio (diluata al 10%) per 5 minuti e poi lavati. Nel caso in cui erano presenti ancora piccoli frammenti, la sospensione veniva filtrata attraverso un filtro di 50 micron; infine una parte uguale di

paraformaldeide all'1% era aggiunta in ogni tubo per la fissazione delle cellule. La tipizzazione citofluorimetrica è stata effettuata utilizzando un Citofluorimetro FACS-SCAN (Beckton-Dickinson) a tre colori in dotazione al Dipartimento di Anatomia Patologica e Citopatologia. Sono stati acquisiti 5000 “eventi” (complessi cellula-anticorpo con fluorocromo coniugato) per campione; gli eventi acquisiti sono stati riportati sul monitor e selezionati mediante “gate” disegnati in ragione degli specifici parametri fisici dei linfociti. I gate ottenuti sono stati quindi analizzati valutando l'eventuale espressione e/o co-espressione dei rispettivi anticorpi coniugati e quantificati per valori assoluti e percentuali.

Per quanto riguarda la rappresentazione percentuale delle singole popolazioni linfocitarie, la tripletta CD5/CD10/CD19 permette di differenziare i linfociti T e B. La co-espressione CD10/CD19 consente inoltre di identificare tra questi ultimi l'eventuale presenza di linfociti centro-follicolari. I linfociti T sono identificati come helper e suppressor dagli anticorpi CD4/CD8. Per la valutazione percentuale dei due citotipi si è fatto riferimento al rapporto nel sangue periferico, che è riportato essere fisiologicamente di 2:1. Valori uguali o maggiori di 3:1 o uguali o minori di 1:1 (quindi non fisiologici) sono stati riportati come  $CD4/CD8 \geq 3:1$  e  $CD4/CD8 \leq 1:1$  rispettivamente.

### ***Analisi statistica***

L'analisi statistica è stata effettuata per valutare eventuali associazioni tra i differenti rapporti CD4/CD8 ( $=2:1$ ,  $\geq 3:1$  e  $\leq 1:1$ ) dell'infiltrato linfoide e le fasi funzionali della HT (eutiroidismo, ipertiroidismo ed ipotiroidismo) categorizzate secondo i parametri precedentemente riportati. E' stata anche valutata l'eventuale associazione tra i valori di CD4/CD8  $\geq 3:1$  e  $\leq 1:1$  e ipertiroidismo ed ipotiroidismo considerati insieme. Per queste finalità è stato utilizzato un test di associazione non parametrico (il test chi quadrato a due code).

Le associazioni sono state considerate significative per valori inferiori a 0.05 ( $P < 0.05$ ) e non significative per valori maggiori di 0.05 (NP).

## **RISULTATI (I)**

### ***Risultati clinici e citologici***

Gli aspetti citologici della TH possono evidenziarsi in due principali patterns: il primo è caratterizzato da scarsa colloide, cellule follicolari e cellule di Askanazy, generalmente organizzate in piccoli gruppi, e da numerosi linfociti dispersi nello sfondo. I linfociti sono piccoli, con cromatina compatta e con scarso citoplasma; questo è generalmente presente in un margine come una piccola protrusione che conferisce alla cellula una forma leggermente allungata. Sono presenti, inoltre, poche plasmacellule sparse, piccoli gruppi di macrofagi frammisti a linfociti ed occasionali detriti nucleari allungati di linfociti, chiamati in letteratura “tangles linfoidi” (22) (Figura 1). Nella seconda presentazione citologica si osservano numerose cellule linfoidi in differente stadio maturativo: sono presenti, infatti, piccoli linfociti, plasmacellule, cellule centrollicolari ed immunoblasti che conferiscono allo striscio aspetti simili a quelli di un linfonodo. Sono inoltre presenti pochi tireociti e cellule di Askanazy; la colloide è generalmente assente (Figura 2). In tutti i casi tali aspetti citologici sono stati diagnostici per TH; la diagnosi citologica è stata inoltre

confermata dalla presentazione clinica ed ecografica e dalla rilevazione di auto-anticorpi circolanti. I dati clinici, citologici e citofluorimetrici sono riassunti nelle Tabelle 2 e 3.

### ***Citofluorimetria***

Otto casi di scarsa cellularità (con un numero di linfociti <5000) non sono stati inclusi in questo studio. Nei rimanenti 57 casi (6 ipertiroidei, 39 eutiroidei e 12 ipotiroidei), la popolazione linfocitaria è rappresentata da linfociti T e B; i linfociti T, identificati dal CD5, CD4 e CD8, sono presenti in tutti i casi (Figure 3 e 4). Per quanto riguarda l'espressione di CD4 e CD8, un rapporto fisiologico di 2:1 è stato osservato in 20 casi (35%), un rapporto aumentato ( $\geq 3:1$ ) in 26 casi (46%) ed un rapporto diminuito ( $\leq 1:1$ ) in 11 casi (20%) (Figure 5 e 6). Stratificando tali risultati nei tre diversi gruppi di pazienti (eutiroidei, ipertiroidei e ipotiroidei), si è osservato un rapporto CD4/CD8=2:1 in 16 eutiroidei, in 1 ipertiroideo e in 3 ipotiroidei. Un rapporto CD4/CD8  $\geq 3:1$  è stato osservato in 22 eutiroidei, in 2 ipertiroidei e in 2 ipotiroidei; un rapporto CD4/CD8  $\leq 1:1$  è stato infine osservato in un solo caso eutiroideo, in 3 ipertiroidei e in 7 ipotiroidei.

I linfociti B, identificati da CD19 sono presenti in 44 casi (77%); in 27 di questi casi inoltre è stata osservata inoltre coespressione di

CD19/CD10 corrispondente ad un aspetto “follicolare” dell’infiltrato negli strisci corrispondenti .

Per quanto riguarda le implicazioni funzionali dell’infiltrato linfocitario, nel nostro studio abbiamo osservato la presenza di linfociti T (CD5, CD4 o CD8) in tutti i casi e, conseguentemente, in tutte le fasi funzionali. Viceversa, i linfociti B (CD19 e/o CD19/CD10) sono stati osservati in tutti i casi di ipotiroidismo, nei rimanenti casi di eutiroidismo ma solo in 2 su 6 casi di ipertiroidismo. Pertanto è ipotizzabile che i linfociti B non abbiano un ruolo diretto nell’apoptosi delle cellule follicolari e quindi nella conseguente insufficienza funzionale, ma intervengano nelle fasi più avanzate della malattia con produzione locale di anticorpi anti-tiroide, che si affiancano ai meccanismi di danno cellulare già instaurati e mediati dai linfociti T.

Per quanto riguarda i rapporti tra infiltrato linfoide ed aspetti funzionali, abbiamo valutato il rapporto CD4/CD8 dei linfociti T intratiroidi nelle diverse fasi funzionali della malattia. Avendo come riferimento il rapporto fisiologico di 2:1, abbiamo osservato un rapporto normale in 20 casi (35%),  $CD4/CD8 \geq 3:1$  in 26 (46%) casi e  $CD4/CD8 \leq 1:1$  in 11 casi (20%). L’analisi statistica non ha dimostrato una significativa associazione tra questi valori ed i gruppi funzionali considerati

separatamente. Tuttavia, considerando insieme i casi di ipertiroidismo e di ipotiroidismo, abbiamo osservato una significativa associazione tra queste due fasi funzionali ed il rapporto  $CD4/CD8 \leq 1:1$ .

Infatti,  $CD4/CD8 \leq 1:1$  è stato osservato in 10 dei 18 casi di ipo ed ipertiroidismo (55%) e in un solo caso di eutiroidismo (3%). Questo dato potrebbe sembrare sconcertante ma, se consideriamo l'ipertiroidismo nella TH come l'effetto transitorio di un danno follicolare acuto e massivo e l'ipotiroidismo similmente correlato ad danno follicolare cronico ma altrettanto massivo, questi fenomeni potrebbero essere considerati espressione di un'intensa distruzione dei follicoli accumulati entrambi da un ridotto rapporto  $CD4/CD8$  (30-33).

I dati disponibili in letteratura concernenti il rapporto  $CD4/CD8$  dei linfociti intratiroidici sono discordanti; infatti alcuni autori hanno riportato un rapporto  $CD4/CD8$  aumentato (27,28), altri diminuito (24,26). Queste differenze sono state spiegate sia come effetto dei diversi procedimenti tecnici, sia come effetto della contaminazione ematica o del precedente trattamento con farmaci antitiroidei (24). In nessuno di questi studi, tuttavia, il rapporto  $CD4/CD8$  è stato correlato allo stato funzionale. Pertanto riteniamo che diversi rapporti  $CD4/CD8$  potrebbero essere presenti negli stessi casi sebbene in differenti fasi della malattia.



## **OBIETTIVO DEL LAVORO (II)**

Nella prosecuzione del nostro studio abbiamo approfondito questi risultati, andando a verificare se nella TH vi siano alterazioni della distribuzione delle sottopopolazioni linfocitarie.

Alle fine degli anni '90 è stata scoperta una sottopopolazione linfocitaria TCD4+ caratterizzata dall'espressione della catena alfa del recettore dell'interleuchina-2 (CD25); tale sottopopolazione linfocitaria risulta dotata di attività regolatoria e per questo motivo è stata denominata "T-reg" (34). Le cellule CD4+CD25+ si sviluppano nel timo e rappresentano il 5-10% del compartimento periferico di cellule TCD4+. Esse esprimono costitutivamente, oltre al CD25, le molecole CTLA-4, GITR ed il fattore di trascrizione Foxp3 (35).

Questi linfociti svolgono una funzione regolatoria in senso inibitorio nei riguardi dell'attivazione, della proliferazione e della produzione di citochine da parte delle cellule T autoreattive; inoltre bloccano la produzione di autoanticorpi da parte delle cellule B. Le cellule T-reg sono fondamentali per garantire il mantenimento della tolleranza periferica verso antigeni autologhi: infatti molti lavori hanno messo in evidenza una loro correlazione con la patogenesi di numerosi disordini autoimmuni (36).

### ***Cellule regolatrici e loro descrizione***

Nel 1953 Billingham, Brent e Medawar realizzarono un esperimento che portò alla definizione di tolleranza (37). Inoculando in epoca neonatale

in un topo di ceppo A cellule provenienti da un topo di ceppo B e non trattando in alcun modo il topo di ceppo B, si fecero crescere i due topi; quindi, in età adulta, fu operato trapianto di cute sia dal topo A al topo B che viceversa. Nel topo B si osservò rigetto del trapianto; nel topo A invece il rigetto non venne osservato. In realtà, ripetendo questo esperimento più volte, difficilmente si ottennero nuovamente questi risultati perché, anche se è vero che somministrando in un neonato un antigene non self induciamo la tolleranza nei confronti di questo antigene, in realtà si ha tolleranza solo se l'inoculazione avviene in uno strettissimo lasso di tempo. La fortuna di Medawar fu quella di operare quest'esperimento nel lasso di tempo corretto. Questo esperimento non è importante per la tolleranza ai trapianti ma perché è alla base di altri esperimenti compiuti per studiare la tolleranza ad antigeni non self. All'inizio degli anni settanta furono individuati linfociti T in grado di sopprimere la risposta immune e quindi utilizzabili per l'induzione della tolleranza (38), ma fu solo alla fine degli anni novanta che tali cellule soppressorie furono denominate cellule regolatrici (34). Realizzando esperimenti che si servivano sempre del trapianto di cute, Waldmann comprese che i linfociti T soppressori sono linfociti T CD4+ resi tolleranti; se uno di questi linfociti T tollerante si ritrova legato alla stessa cellula presentante l'antigene (APC) di un linfocita CD4+ non tollerante, induce tolleranza anche in quest'ultimo; una volta trasferita la tolleranza ad un'altra cellula il linfocita soppressore muore. Questo meccanismo è detto "linked suppression" (39). In questa maniera Walman diede la definizione fenotipica delle cellule soppressorie.

Esistono almeno quattro tipi di cellule regolatrici:

- Linfociti TH2: producono una citochina con forte potere soppressore, IL-10. questa citochina induce la soppressione delle cellule TH2 stesse; in realtà i linfociti TH2 non possono essere considerate soppressorie a tutti gli effetti perché questo è solo un aspetto della loro funzionalità.
- TH3, TR1, CD25: questi sono i tre citotipi prettamente soppressori; è infatti questa la loro principale funzione.
  - Linfociti TH3: sono dei linfociti CD4+ che producono il TGFβ (trasforming grown factor), potente immunosoppressore. I TH3 sono responsabili della tolleranza per via orale.
  - Linfociti TR1: la sigla indica che si tratta di cellule T regolatrici di tipo primo. Queste cellule producono una sola citochina, IL-10.
  - Linfociti CD25: sono particolari tipi di linfociti indicati come CD4+ CD25+, dove il CD25 rappresenta il recettore a bassa affinità per l'interleuchina-2. Altra caratteristica fenotipica è rappresentata dalla assenza di CD69, presente invece su altre cellule T CD4+ non regolatrici (40). Nel sangue questo citotipo costituisce il 10% del totale dei linfociti CD4+; crescono e maturano nel timo. La loro funzione è di inibire le funzioni effettrici delle cellule TCD4+ e CD8+. Ogni singola cellula regolatrice è in grado di bloccare l'attività di quattro linfociti T contemporaneamente. Privando un topo di cellule CD4+CD25+ si istaurano malattie autoimmuni; questi linfociti sono infatti fondamentali per garantire il mantenimento dell'omeostasi del sistema immunitario, soprattutto per quel che riguarda il mantenimento della tolleranza verso le strutture self (41). Affinché una cellula regolatrice possa esercitare la propria azione sui linfociti CD4+ e CD8+ deve entrare in contatto con queste cellule e

ciò è reso possibile solo nel caso in cui le due cellule si trovino entrambe sulla stessa APC.

La nostra attenzione si è quindi rivolta alla sottopopolazione linfocitaria TCD4+ CD25+ CD69- (T-reg) ed abbiamo verificato se nella TH si verifici un loro decremento.

## **MATERIALI E METODI (II)**

A tal fine abbiamo selezionato per il nostro studio, con le stesse modalità descritte per la prima fase, 23 pazienti (17 donne e 6 uomini, in un range di età dai 28 ai 70 anni) con evidenza clinica di TH in fase funzionale di ipertiroidismo (5 pazienti) e di ipotiroidismo (18 pazienti).

Le modalità del prelievo, il trattamento dei campioni citologici e la tipizzazione citofluorimetrica sono stati identici a quelli sopra esposti. Le combinazioni di anticorpi utilizzate sono state: CD4/CD8, CD4/CD25/CD69, CD4/CD25/CD95 coniugati con i fluorocromi fluoresceinai isotiocianato (FITC), ficoeritrina (PE) e peridinclorofillina (PerCP) (Tabella 1 bis). La tripletta CD4/CD25/CD69 permette di identificare la quota di linfociti T-reg, mentre la co-espressione di CD95 permette di identificare la suscettibilità di queste cellule all'apoptosi mediata da FAS.

## **RISULTATI (II)**

Tre prelievi scarsamente cellulati non sono stati inclusi nella nostra casistica; nei rimanenti 20 casi (5 ipertiroidei e 15 ipotiroidei) la

popolazione linfocitaria T presentava un rapporto CD4/CD8 fisiologico di 2:1 in soli 2 casi (10%), un rapporto aumentato ( $\geq 3:1$ ) in 4 casi (20%) ed un rapporto diminuito ( $\leq 1:1$ ) in 14 casi (70%) (Tabella 3 bis). Nei 14 casi in cui il rapporto CD4/CD8 risultava diminuito (Figura 7) abbiamo identificato la popolazione cellulare T-reg, ovviamente anch'essa depleta (Figure 8 e 9) ed abbiamo notato, nell'ambito di tale popolazione, una spiccata suscettibilità all'apoptosi mediata da Fas (Figura 10).

## **DISCUSSIONE**

La TH è la più frequente delle malattie autoimmuni nel mondo occidentale (8,42). La sua incidenza è in aumento probabilmente a causa di fattori iatrogeni ed ambientali (43,44). Da un punto di vista patogenetico la TH è caratterizzata da una perdita progressiva di cellule follicolari e dalla concomitante colonizzazione della ghiandola da parte di linfociti con conseguente formazione di follicoli e fibrosi interstiziale (22). Vi è un generale accordo in letteratura sul fatto che l'apoptosi sia il principale meccanismo patogenetico di distruzione delle cellule follicolari (11,13,14,18-20); infatti una maggiore espressione di FAS e del suo ligando FAS-L da parte cellule follicolari determina secrezione di citochine da parte dei linfociti T che inducono apoptosi delle cellule follicolari stesse, sebbene sia ipotizzabile anche un concomitante meccanismo citotossico diretto (27).

I linfociti B che colonizzano la ghiandola partecipano inoltre al processo autoimmune attraverso la produzione di autoanticorpi. Immunità cellulare ed umorale cooperano pertanto ad una progressiva distruzione della ghiandola, la cui funzionalità è generalmente assicurata da una maggiore attività del parenchima residuo. Nelle fasi avanzate della malattia la distruzione delle cellule follicolari e la colonizzazione linfocitaria possono essere così massive da esaurire le capacità funzionali della ghiandola e causare ipotiroidismo che rappresenta la principale complicanza della TH.

#### ***Valutazione dell'infiltrato linfoide***

L'infiltrato linfocitario tiroideo è rappresentato quasi esclusivamente da linfociti e plasmacellule; cellule dendridiche e linfociti natural killer sono anche presenti sebbene numericamente esigui e con una funzione non chiara (9,27,45). Pertanto abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle caratteristiche quantitative e fenotipiche e dei linfociti T e B mediante citofluorimetria. Dividendo la casistica in tre gruppi funzionali (ipertiroidismo, eutiroidismo e ipotiroidismo), che possono rappresentare rispettivamente le fasi iniziale, conclamata e tardiva della malattia, si sono osservate alcune differenze nella composizione dell'infiltrato. Infatti, cellule CD5, CD4 e/o CD8 positive erano presenti in tutti i casi; viceversa,

CD19 e CD10 erano espressi solo in 44 casi (77%), per lo più rappresentati da eutiroidei ed ipotiroidei. E' ipotizzabile, pertanto, che i linfociti T siano i primi a colonizzare la ghiandola nelle fasi iniziali della malattia e i linfociti B, con eventuale formazione di follicoli, intervengono in fasi successive. Questa possibile sequenza temporale è abbastanza interessante, poiché la sua definizione in corso di TH potrebbe essere utilizzata per stabilire, più o meno approssimativamente, la durata della malattia al momento della diagnosi citologica.

Per quanto riguarda i rapporti tra infiltrato linfoide ed aspetti funzionali, è stato osservato un rapporto  $CD4/CD8 \leq 1:1$  nella maggior parte dei casi di ipo ed ipertiroidismo.

Proseguendo lo studio, l'attenzione si è focalizzata proprio sui pazienti con TH clinicamente manifesta (iper o eotiroidei) in cui il rapporto  $CD4/CD8$  si presentava invertito. In tutti questi pazienti si rendeva evidente una diminuzione di linfociti T-regolatori ed un corrispondente aumento della quota di linfociti T suppressor attivati ( $CD8+CD25+$ ). Per contro, la già ridotta quota di linfociti T-reg residui presentava una evidente suscettibilità a morte cellulare apoptotica mediata da Fas.

## CONCLUSIONI

L'infiltrato linfoide nella tiroidite di Hashimoto (TH) determina apoptosi delle cellule follicolari mediante meccanismi immunitari cellulo-mediati ed umorali, mediati rispettivamente dai linfociti T e B.

La TH è caratterizzata da diverse fasi funzionali: ipertiroidismo iniziale, eutiroidismo ed eventuale ipotiroidismo più o meno tardivo.

In questo studio è stata valutata la composizione dell'infiltrato linfoide intraghiandola nelle diverse fasi funzionali della TH ed in particolare il diverso rapporto CD4/CD8 mediante citofluorimetria.

Considerando l'insieme di pazienti ipo ed ipertiroidei, è stata osservata un'associazione statisticamente significativa con il rapporto  $CD4/CD8 \leq 1:1$ .

Inoltre la proporzione di cellule CD4+, CD25+CD69- (T-reg) è significativamente più bassa nella tiroide di pazienti con TH clinicamente manifesta e la proporzione di cellule apoptotiche CD4+CD25+ è maggiore di quella delle cellule CD4+CD25.

Ciò indica che molte cellule T attivate, tra cui molte cellule Treg vanno incontro ad apoptosi e che quindi la riduzione delle cellule Treg intratiroidi nella TH può essere posta in relazione alla patogenesi ed alla evoluzione clinica della malattia.



## TABELLE

**Tabella 1:** Anticorpi primari fluoresceinati usati per la tipizzazione citofluorimetrica

(I fase)

ANTICORPI FLUORESC EINATI	PRODUTTORE	DILUIZIONE	INCUBAZIONE
CD4(FITC)/CD8(PE)	Becton Dickinson (San José, CA, USA).	1µl : 100*	15' al buio, TA
CD5(FITC)/CD10(PE)/ CD19(PERCP)	Becton Dickinson (San José, CA, USA).	1µl : 100*	15' al buio, TA

PE: ficoeritrina

PERCP: peridinaclorofillina

FITC: fluoresceinai isotiocianato

TA: temperatura ambiente

\*100 ml di sospensione cellulare

**Tabella 1 bis:** Anticorpi primari fluoresceinati usati per la tipizzazione citofluorimetrica

(II fase)

ANTICORPI FLUORESCEINATI	PRODUTTORE	DILUIZIONE	INCUBAZIONE
CD4(FITC)/CD8(PE)	Becton Dickinson (San José, CA, USA).	1µl : 100*	15' al buio, TA
CD4(PERCP)/CD25(FITC)/ CD69(PE)	Becton Dickinson (San José, CA, USA).	1µl : 100*	15' al buio, TA
CD4(PERCP)/CD25(FITC)/ CD95(PE)	Becton Dickinson (San José, CA, USA).	1µl : 100*	15' al buio, TA

PE: ficoeritrina

PERCP: peridinaclorofillina

FITC: fluoresceinaiotiocianato

TA: temperatura ambiente

\*100 ml di sospensione cellulare

**Tabella 2:** Assetto fenotipico dell'infiltrato linfoide nella tiroidite di Hashimoto.

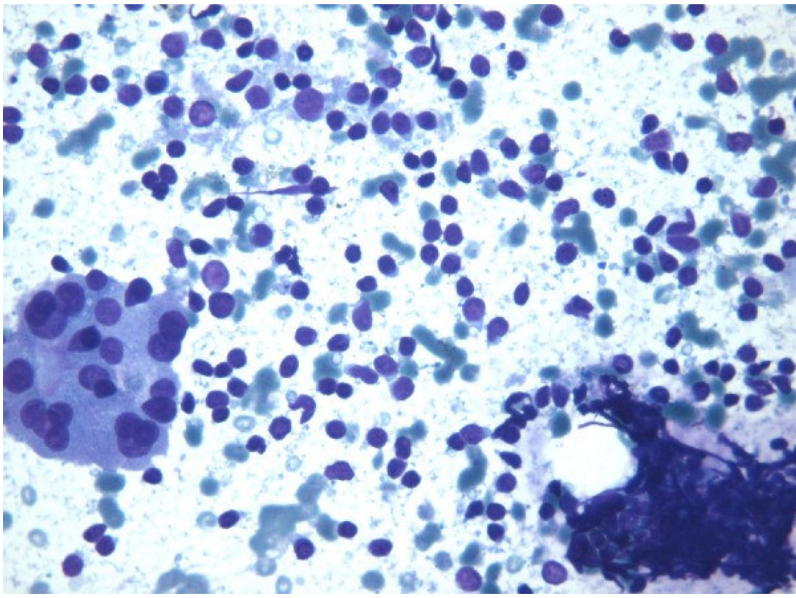
ANTICORPI FLUORESCENATI	TIROIDITE DI HASHIMOTO
CD5,CD4 o CD8	57 (100%)
CD19	44 (77%)
CD19/CD10	27 (47%)

**Tabella 3:** Assetto fenotipico dell'infiltrato linfoide tiroideo nelle differenti fasi funzionali della tiroidite di Hashimoto.

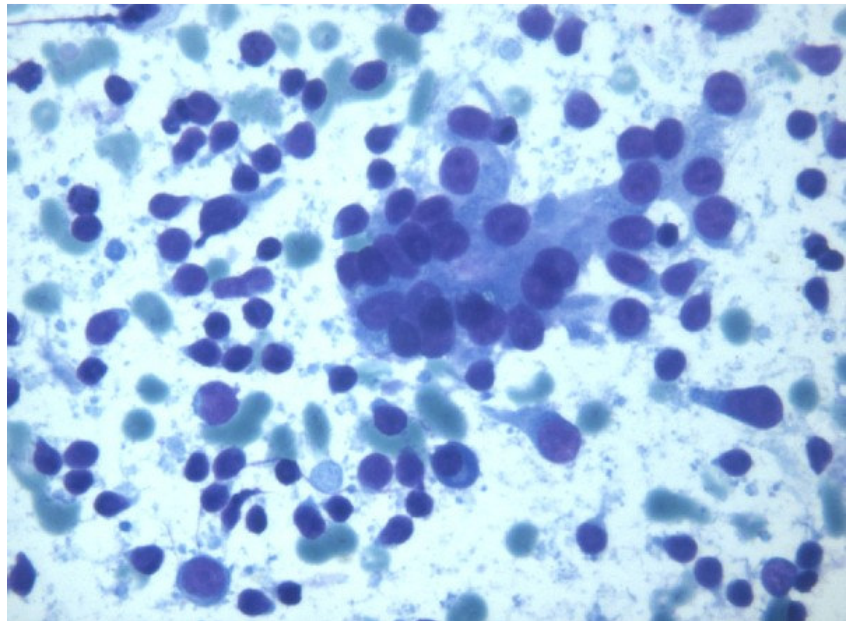
ANTICORPI FLUORESCENATI	TIROIDITE DI HASHIMOTO			
	Eutiroidismo	Ipertiroidismo	Ipotiroidismo	Totale
	39 casi (%)	6 casi (%)	12 casi (%)	57 casi (%)
CD5	39 (100%)	6 (100%)	12 (100%)	57 (100%)
CD4/CD8 = 2:1	16 (41%)	1 (17%)	3 (25%)	20 (35%)
CD4/CD8 ≥ 3:1	22 (56%)	2 (33%)	2 (17%)	26 (46%)
CD4/CD8 ≤ 1:1	1 (3%)	3 (50%)	7 (58%)	11 (20%)
CD19	33 (85%)	2 (33%)	9 (75%)	44 (77%)
CD19/CD10	21 (54%)	0 (0%)	6 (50%)	27 (47%)

**Tabella 3 bis:** Assetto fenotipico dell'infiltrato linfoide tiroideo nelle differenti fasi funzionali della tiroidite di Hashimoto.

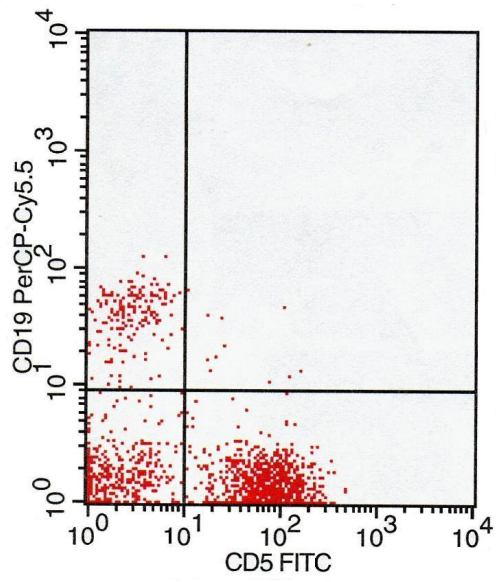
ANTICORPI FLUORESCIGINATI	Ipertiroidismo	Ipotiroidismo	Totale
	5 casi (%)	15 casi (%)	20 casi (%)
CD4/CD8 = 2:1	0	2 (13%)	2 (10%)
CD4/CD8 ≥ 3:1	1 (20%)	3 (20%)	4 (20%)
CD4/CD8 ≤ 1:1	3 (60%)	11 (73%)	14 (70%)



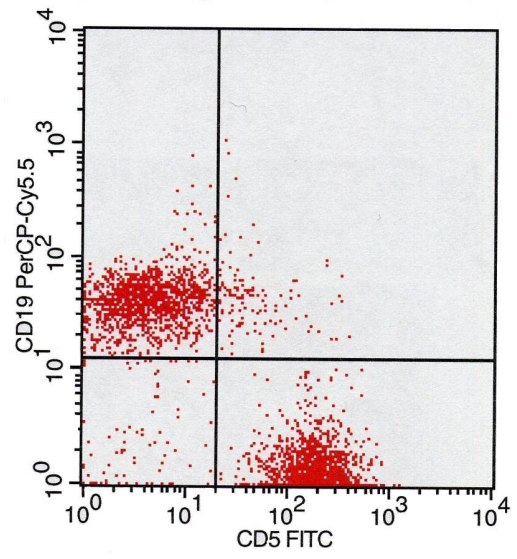
**Figura 1**



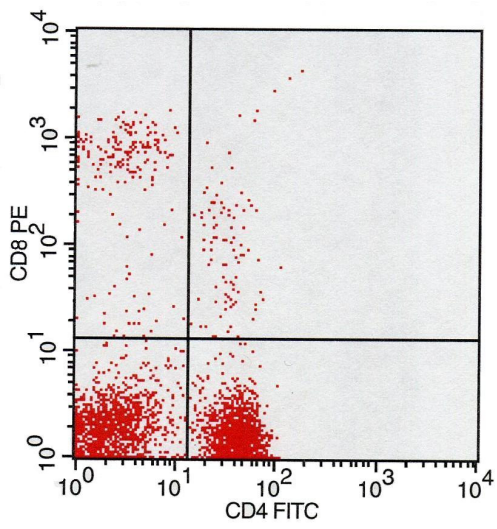
**Figura 2**



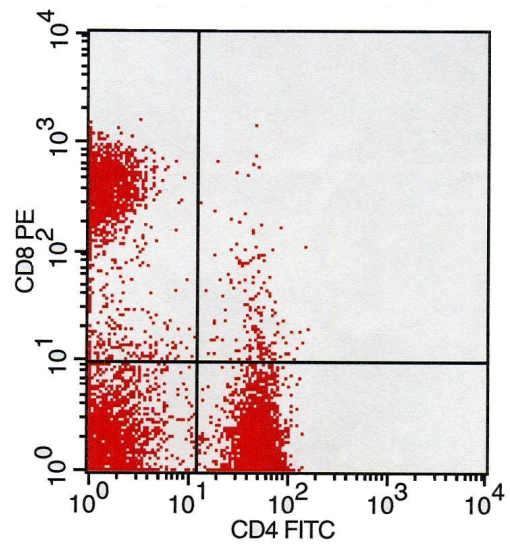
**Figura 3**



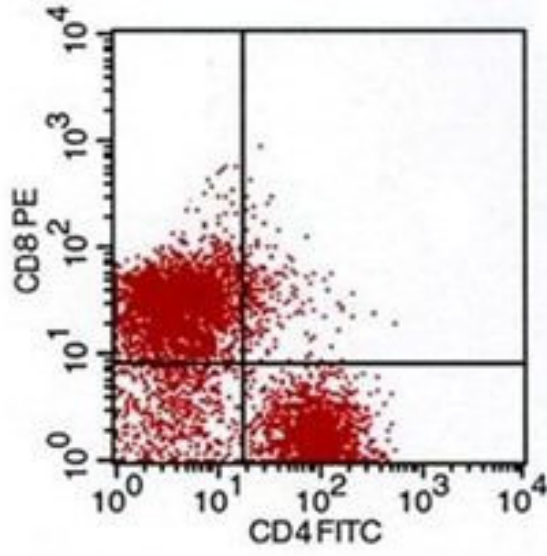
**Figura 4**



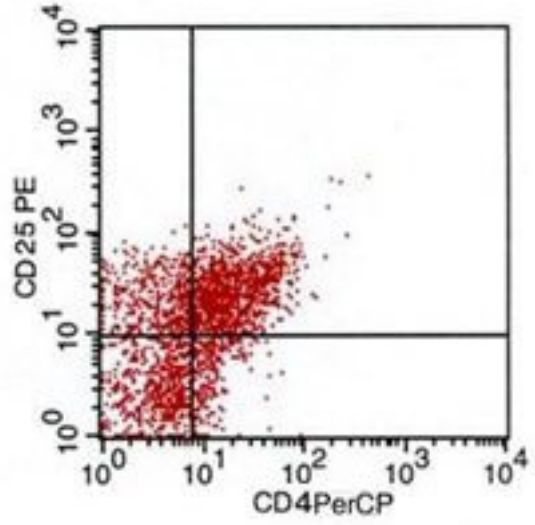
**Figura 5**



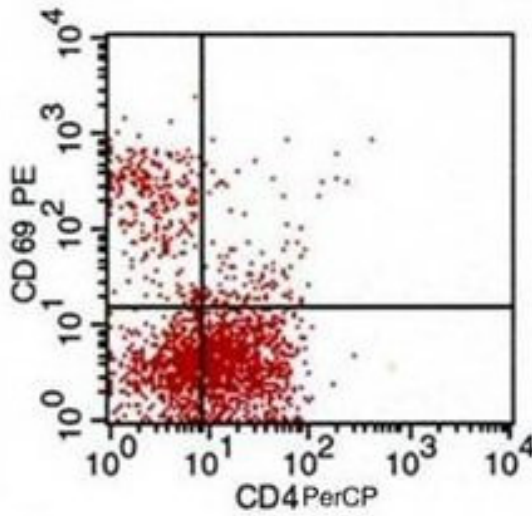
**Figura 6**



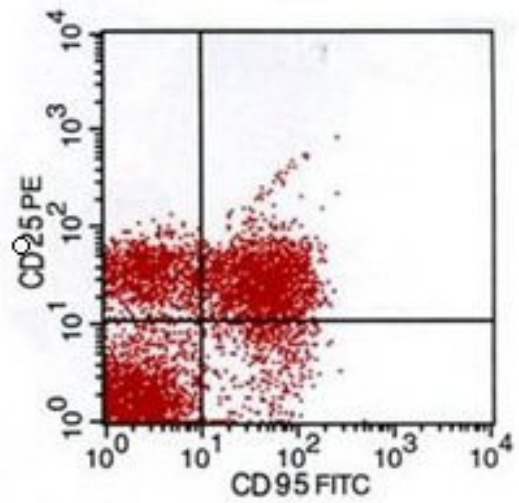
**Figura 7**



**Figura 8**



**Figura 9**



**Figura 10**

## **BIBLIOGRAFIA**

1) Hashimoto H.

Zur Kenntniss der lymphatischen Veränderung der Schilddrüse (Struma lymphomatosa).

Arch f klin Chir 1912; 97:219-248.

2) Roitt IM, Doniach D et al.

Autoantibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goiter).

Lancet 1956; 2:820-821.

3) Doniach D, Bottazzo GF, Russell RCG.

Goitrous autoimmune thyroiditis (Hashimoto's disease)

Clin Endocrinol Metab 1979; 8:63-80.

4) Walfish PG, Farid NR.

The immunogenetic basis of autoimmune thyroid disease.

In: Walfish PG, Wall JR and Volpe R: Autoimmunity and the Thyroid.

Orlando, Academic Press 1985; pp.9-36

5) Strakosch CR, Wenzel BE et al.

Immunology of autoimmune thyroid diseases.

N Engl J Med 1982; 307:1499-1507.

6) Bottazzo GF, Pujol-Borrell R et al.

Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity.

Lancet 1983; 2:1115-1118.

7) Pearce EN, Farwell AP, Bravemann LE.

Thyroiditis.

N Engl J Med 2003; 348:2646-2655.



8) Weetman AP

Autoimmune thyroid disease: propagation and progression.

Eur J Endocrinol 2003; 148:1-9.

9) Wenzel BE, Chow A, Baur R et al.

Natural killer cell activity in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis.

Thyroid 1998; 8:1019-1022

10) Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades CS et al.

Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases.

Trends Endocrinol Metab. 2001;12:384-90.

11) Giordano C, Richiusa P, Bagnasco M et al.

Differential regulation of Fas-mediated apoptosis in both thyrocyte and lymphocyte cellular compartments correlates with opposite phenotypic manifestations of autoimmune thyroid disease.

Thyroid 2001;11:233-244.

12) Topliss DJ, Eastman CJ.

Diagnosis and management of hyperthyroidism and hypothyroidism.

Med J Aust. 2004;180:186-193.

13) Mirakian R, Nye K, Palazzo FF et al.

Methods for detecting apoptosis in thyroid diseases.

J Immunol Methods. 2002; 265:161-175.

14) ) Arscott PL, Baker JR Jr.

Apoptosis and thyroiditis.

Clin Immunol Immunopathol. 1998;87:207-217. Review.

15) Larsen PR, Ingbar SH.

The thyroid gland. In: Wilson JD, Foster DW editors.

Williams textbook of Endocrinology, 8<sup>th</sup> ed.

Philadelphia: W.B. Saunders, 1992: 357-487.

16) Amino N.

Autoimmunity and hypothyroidism.

Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1988; 2:591-617.

17) Mizukami Y, Michigishi T, Kawato M et al.

Chronic thyroiditis : thyroid function and histologic correlations in 601 cases.

Hum Patol, 1992; 23:980-988.

18) Watanabe M, Yamamoto N, Maruoka H et al.

Independent involvement of CD8+ CD25+ cells and thyroid autoantibodies in disease severity of Hashimoto's disease.

Thyroid 2002;12:801-808.

19) Watanabe M, Yamamoto N, Maruoka H et al.

Relation of CD30 molecules on T-cell subsets to the severity of autoimmune thyroid disease.

Thyroid 2003;13:259-263.

20) Ajjan RA, Watson PF, McIntosh RS et al.

Intrathyroidal cytokine gene expression in Hashimoto's thyroiditis.

Clin Exp Immunol. 1996; 105:523-528.

21) Hsi ED, Singleton TP, Svoboda SM, et al.

Characterization of the lymphoid infiltrate in Hashimoto thyroiditis by immunohistochemistry and polymerase chain reaction for immunoglobulin heavy

chain gene rearrangement.

Am J Clin Pathol. 1998;110:327-333.

22) Kini SR.

Guides to clinical aspiration biopsy.

Igaku-Shoin ED. New York, Tokio, 1987

23) Tani E, Skoog L.

Fine needle aspiration cytology and immunocytochemistry in the diagnosis of lymphoid lesions of the thyroid gland.

Acta Cytol. 1989;33:48-52.

24) Fujikawa M, Okamura K, Sato K et al.

Usefulness of surface phenotype study of intrathyroidal lymphocytes obtained by fine needle aspiration cytology in autoimmune thyroid disease and malignant lymphoma of the thyroid.

Clin Endocrinol. 1998; 49:191-196.

25) Matsubayashi S, Tamai H, Morita T et al.

Hashimoto's thyroiditis manifesting monoclonal lymphocytic infiltration

Clin Exp Immunol 1990 ;79 :170-174

26) Bene MC, Derennes V, Faure G et al.

Graves' disease: in situ localization of lymphoid T cell subpopulations.

Clin Exp Immunol. 1983; 52:311-316.

27) Iwatani Y, Hidaka Y, Matsuzuka F et al.

Intrathyroidal lymphocyte subsets, including unusual CD4+ CD8+ cells and CD3loTCR alpha beta lo/-CD4-CD8- cells, in autoimmune thyroid disease.

Clin Exp Immunol. 1993; 93:430-436.

- 28) Jansson R, Karlsson A, Forsum U.  
Intrathyroidal HLA-DR expression and T lymphocyte phenotypes in Graves' thyrotoxicosis, Hashimoto's thyroiditis and nodular colloid goitre.  
Clin Exp Immunol. 1984; 58:264-272.
- 29) Zeppa P, Benincasa G, Lucariello A et al.  
Association of different pathologic processes of the thyroid gland in fine needle aspiration samples.  
Acta Cytol. 2001; 45:347-352.
- 30) Salmaso C, Bagnasco M, Pesce G et al.  
Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity: insights from Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease.  
Ann N Y Acad Sci. 2002; 966:496-501.
- 31) Hammond LJ, Lowdell MW, Cerrano PG et al.  
Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis.  
J Pathol. 1997;182:138-144.
- 32) Iwatani Y, Watanabe M.  
Normal mechanisms for cell tolerance.  
In: Volpè R (ed). Autoimmune endocrinopathies, Totawa Humana press Inc.1999; pp.1-30.
- 33) Romagnani S.  
Biology of human TH1 and TH2 cells.  
J Clin Immunol. 1995;15:121-129.

- 34) Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM et al.  
CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells.  
J Immunol. 1998 Feb 1; 160(3):1212-8.
- 35) Yagi H, Nomura T, Nakamura K et al.  
Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells.  
Int Immunol 2004; 16:1643-1656.
- 36) Sakaguchi S, Sakaguchi N.  
Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease.  
Int Rev Immunol 2005; 24:211-226.
- 37) Billingham RE, Brent L, Medawar PB.  
Actively acquired tolerance of foreign cells.  
Nature 1953 Oct 3;172(4379):603-6.
- 38) Weigle WO, Sieckmann DG, Doyle MV, Chiller JM.  
Possible roles of suppressor cells in immunologic tolerance.  
Transplant Rev. 1975;26:186-205.
- 39) Wise MP, Bemelman F, Cobbold SP, Waldmann H.  
Linked suppression of skin graft rejection can operate through indirect recognition.  
J Immunol. 1998 Dec 1;161(11):5813-6.
- 40) Hartwig UF, Nonn M, Khan S et al.  
Depletion of alloreactive T cells via CD69: implications on antiviral, antileukemic and immunoregulatory T lymphocytes.  
Bone Marrow Transplant 2006; 37:297-305.

- 41) Ng WF, Duggan PJ et al.  
Human CD4+CD25+ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells.  
Blood 2001; 98:2736-2744.
- 42) Dong Z, Takakuwa T, Takayama H et al.  
Fas and Fas ligand gene mutations in Hashimoto's thyroiditis.  
Lab Invest. 2002; 82:1611-1616.
- 43) Tomer Y, Davies TF  
Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function.  
Endocr Rev. 2003; 24:694-717.
- 44) Stuck BJ, Pani MA, Besrou F et al.  
No association of two Fas gene polymorphisms with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease.  
Eur J Endocrinol. 2003; 149:393-396.
- 45) Pedersen BK, Feldt-Rasmussen U, Bech K et al.  
Characterization of the natural killer cell activity in Hashimoto's and Graves' diseases.  
Allergy 1989; 44:477-481