

Mecanismos de disfunção imunológica nas doenças auto-imunes da tireóide

Celestino Neves¹; José Luís Delgado², José Luís Medina¹

1 - Serviço de Endocrinologia do Hospital S. João, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Unidade de Investigação e Desenvolvimento Cardiovascular da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

2 - Serviço de Imunologia do Hospital S. João, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Correspondência:

Dr. Celestino Neves · Serviço de Endocrinologia · Hospital S. João · Porto. E-mail: celestino.neves@sapo.pt

RESUMO

As doenças auto-imunes da tireóide – doença de Graves e tireoidite de Hashimoto – são caracterizadas pela reactividade para auto-antigénios, originando destruição inflamatória ou estimulação auto-imune do receptor da TSH (*thyroid-stimulating hormone*)¹⁻⁵.

A doença de Graves é caracterizada por infiltração linfocítica da tireóide e pela produção de TRAb (*antibody against receptor for TSH*), anticorpos anti-transportador Na⁺/I⁻, anti-TPO (peroxidase) e anti-tireoglobulina^{1-3, 6-9}.

A tireoidite de Hashimoto é caracterizada por infiltração de linfócitos nos tecidos da tireóide e também pela presença de anticorpos anti-TPO e anti-Tg^{1,5}.

Aproximadamente 10% das mulheres e 5% dos homens com função tireoideia normal têm anticorpos anti-TPO ou anti-Tg^{2,3,10,11}. Embora alguns destes indivíduos desenvolvam destruição dos folículos tireoideus e hipotireoidismo, a maioria permanece com função tireoideia normal^{5,12}.

Têm sido descritas várias anomalias no sistema imune em doentes com doença de Graves, tanto na tireóide como no sangue periférico^{2,3,13-19}.

A imunidade humoral (anticorpos anti-TPO ou anti-tireoglobulina) e celular (células T citotóxicas) são importantes para a indução de hipotireoidismo em doentes com tireoidite de Hashimoto, e os seus efeitos parecem ser independentes²⁰.

PALAVRAS-CHAVE

Auto-imunidade; Tireoide; Mecanismos imunológicos; Doenças auto-imunes.

SUMMARY

Auto-immune thyroid diseases – Graves disease and Hashimoto's thyroiditis – are characterized by the reactivity to auto-antigen, originating inflammatory destruction or auto-immune stimulation of the TSH (Thyroid-stimulating hormone)¹⁻⁵receptor.

Graves disease is characterized by lymphocytical infiltration of the thyroid and by the production of TRAb (antibody against receptor for TSH), anti-carrier antibody Na⁺/I⁻, anti-TPO (peroxidase) and anti-thyroiglobuline^{1-3, 6-9}.

Hashimoto's thyroiditis is characterized by an infiltration of lymphocytes in thyroid's tissues and also by the presence of antibodies anti-TPO and anti-Tg^{1,5}.

Aproximately 10% of men and 5% women with normal thyroid function have ant-TPO or anti-Tg^(2,3,10,11) antibody. Although some of these individuals develop a destruction of the thyroid follicles as well as hypothyroidism, the majority remains with normal thyroid function^{5,12}.

Several anomalies in the immune system of patients with Graves disease have been described, in thyroid as well as in peripheral blood^{2,3,13-19}.

Humoral immunity (antibodies anti-TPO or anti-thyroiglobuline) and cellular immunity (T cytotoxic

cells) are important to the induction of hypothyroidism in patients with Hashimoto's thyroiditis and its effects seem to be independent²⁰.

KEY-WORDS

Auto-immunity; Thyroid; Immunological mechanisms; Auto-immune diseases.

1.1. ESTUDOS DA IMUNIDADE CELULAR NAS DOENÇAS AUTO-IMUNES DA TIREÓIDE

Os estudos em populações de linfócitos circulantes são importantes, porque as alterações imunológicas das doenças auto-imunes da tireóide, principalmente na doença de Graves, não se limitam à tireóide, podendo surgir manifestações oftalmológicas e, por vezes, cutâneas^{13,21-23}. Numerosos estudos têm descrito alterações nos linfócitos intratireoideus e circulantes nas doenças auto-imunes da tireóide^{9,11,24-27}. Os estudos destas anomalias poderão ser úteis, como indicadores de prognóstico e de resposta à terapêutica. Embora os estudos fenotípicos dos linfócitos periféricos sejam, por vezes, discordantes, a maioria dos dados tem demonstrado um fenótipo activo, reflectindo um desequilíbrio imune generalizado, que poderá explicar o envolvimento multi-orgânico e a associação frequente com outras doenças auto-imunes^{9-14,21,22,28-33,84}.

Foram descritas algumas características universais da imunidade celular nas doenças auto-imunes da tireóide³⁴. Na doença de Graves os linfócitos periféricos têm um fenótipo activo e há uma redução da percentagem de células T CD8⁺¹³. O hipertireoidismo pode estar parcialmente implicado na redução da percentagem CD8, devido ao efeito metabólico das hormonas da tireóide nas células T¹³. Contrariamente, os linfócitos intratireoideus apresentam uma fracção aumentada de CD8⁺, nomeadamente em localização intersticial e intra-epitelial^{12,14,19,35,36}.

As células CD16/56⁺ têm sido analisadas na doença de Graves^{10-13,17,21,22,26-29,35}. A maioria dos estudos tem demonstrado que a percentagem de células NK (*Natural Killer*) está diminuída nos linfócitos intratireoideus^{17,21,22,26-29,35,84}. Relativamente às populações periféricas NK, embora alguns estudos tenham apresentado resultados discordantes, foram demonstradas diminuições das percentagens de células CD56⁺, assim como

da actividade NK no sangue periférico, na doença de Graves^{3,26,28,35,37}. A actividade citolítica poderá estar relacionada com a hipertiroxinaemia^{10,26,28,34}. Todavia, a percentagem de células CD16/56⁺ continua diminuída nos doentes tratados com metimazol²⁸. Contrariamente, poderá haver normalização da percentagem dos subtipos de células CD16/56⁺ nos doentes com doença de Graves submetidos à terapêutica cirúrgica²⁸. Além disso, na doença de Graves com prognóstico desfavorável há uma diminuição significativamente superior da percentagem de células CD16/56⁺CD3⁻ periféricas, relativamente aos doentes com evolução favorável^{16,28}. Se estes resultados forem confirmados, as células NK poderão ser usadas como potenciais marcadores da resposta à terapêutica antitireoideia.

Nos doentes com tireoidite auto-imune há diminuição significativa da percentagem de células NK periféricas em comparação com controlos normais^{38,84}.

O antigénio CD25 é uma das três cadeias que formam o receptor da interleucina-2 (IL-2R), conhecido como cadeia IL-2R_α, que está envolvida na ligação de baixa afinidade da IL-2^{39,40}.

Os linfócitos CD8⁺ contêm as células T citotóxicas, que expressam o antigénio CD25^{15,29,41-43}.

As células CD4⁺CD25⁺ podem regular o início e o agravamento das doenças auto-imunes humanas⁴⁴⁻⁴⁷.

A proporção de células CD8⁺CD25⁺ está significativamente aumentada nos linfócitos totais de doentes com tireoidite de Hashimoto em tratamento (tireoidite de Hashimoto severa) em comparação com os doentes com tireoidite de Hashimoto e função tireoideia normal²⁹. As células CD8⁺ diminuem significativamente nos doentes com tireoidite de Hashimoto, sendo mais acentuado o decréscimo das células CD8⁺ na tireoidite de Hashimoto severa²⁹. A proporção de células CD8⁺CD25⁺ pode estar relacionada com propensão da tireoidite de Hashimoto

evoluir para hipotireoidismo, podendo ser um importante marcador de predição²⁹. Não parece haver correlação entre os títulos de anticorpos anti-TPO ou antitireoglobulina com a proporção de células CD25⁺ no subtipo CD8⁺²⁹.

1.2. IMPORTÂNCIA DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO NAS DOENÇAS AUTO-IMUNES DA TIREÓIDE

As moléculas de adesão regulam a migração transendotelial de leucócitos para tecidos linfóides e não-linfóides⁴⁸⁻⁵⁰. Este processo envolve uma cascata sequencial de eventos entre os leucócitos e as células endoteliais²⁰.

A interacção entre os leucócitos e as células endoteliais é mediada, sobretudo, por selectinas, que interactivam com a porção de carbo-hidrato das proteínas tipo mucina. A interacção selectina-mucina promove a passagem dos leucócitos através do endotélio²⁰. A migração leucocitária é estimulada por quimiocinas produzidas localmente, que causam activação de receptores de adesão das integrinas²⁰. A acção das integrinas é um evento principal, pois origina adesão firme à parede vascular.

Os estudos sobre moléculas de adesão na patofisiologia das doenças auto-imunes da tireóide têm sido orientados para a caracterização da expressão destas moléculas, identificando as interacções essenciais para o desenvolvimento e progressão das doenças auto-imunes da tireóide. Tem sido levantada a hipótese da modulação da expressão das moléculas de adesão influenciar a gravidade da doença.

O endotélio, posicionado na interface entre o sangue e os tecidos que são alvo do processo auto-imune, desempenha um papel fulcral nas doenças auto-imunes da tireóide, controlando o influxo das células inflamatórias. O aumento da expressão de moléculas de adesão da família das imunoglobulinas e selectinas no interior do endotélio vascular facilita o recrutamento de linfócitos activados e de memória para a tireóide e para a órbita, na doença de Graves²⁰.

As células endoteliais da tireóide na doença de Graves apresentam aumento da expressão de ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*), P-selectina e E-selectina. Por outro lado, o endotélio vascular

nos tecidos retro-oculares na oftalmopatia de Graves revela também imuno-reactividade forte para ICAM-1, LFA (*lymphocyte function-associated antigen*)-3, E-selectina e VCAM-1, ao contrário dos tecidos retro-oculares normais^{34,54}. O aumento da expressão celular de ICAM-1 está directamente correlacionada com o LFA-1 nos linfócitos⁵⁴. Todos estes dados sugerem que as vias de adesão LFA-1/ICAM-1, VLA (*very late antigen*)-4/VCAM-1 e das selectinas são, provavelmente, fundamentais na aderência e migração dos leucócitos através do endotélio da tireóide e da órbita na doença de Graves^{20,55,56}.

Os linfócitos intratireoideus nas doenças auto-imunes da tireóide expressam um maior número de várias moléculas de adesão da família das integrinas e imunoglobulinas, incluindo as integrinas $\beta 2$ (CD18), como o LFA-1 (CD11a/CD18), as integrinas $\beta 1$ (CD29), VLA-1 (CD49a/CD29), VLA-4 (CD49d/CD29), VLA-5 (CD49e/CD29), bem como o ICAM1 e o ICAM-3^{20,48-54}. A presença de LFA-1 ocorre quer nas células mononucleares que infiltram a tireóide, quer nos tecidos da órbita⁴⁸⁻⁵⁴.

Relativamente aos linfócitos periféricos, os doentes com doença de Graves não tratada têm uma diminuição significativa de LFA-1^{51,52}, CD18 e CD29⁵³, em comparação com controlos. Estes dados podem estar relacionados com o aumento da migração de células LFA-1 da periferia para a tireóide. A expressão diferencial de moléculas de adesão em determinados subtipos de linfócitos pode determinar a sua mobilização para os sítios de inflamação onde ocorre o processo auto-imune à tireóide e a órbita na doença de Graves.

Assim, será importante estudar nos linfócitos periféricos a expressão do LFA1 e do VLA4 e, também, do ICAM-1 e do VCAM-1 solúveis como marcadores endoteliais.

1.3. APOPTOSE NAS DOENÇAS AUTO-IMUNES DA TIREÓIDE

As citocinas produzidas pelas células mononucleares que infiltram a tireóide têm um papel importante na patogénese da tireoidite de Hashimoto, induzindo apoptose (morte celular programada)^{57,58}. Neste sentido, a interleucina-1 (IL-1), abundantemente produzida pelas células que infiltram a tireóide na tireoidite de

Hashimoto, pode induzir a expressão de Fas nos tireócitos normais. O Fas (CD95) é um membro da família de receptores NGF (*nerve growth factor*)/TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), que medeia a apoptose^{59,60}. Como o ligando Fas (Fas-L) expressa-se normalmente nos tireócitos, a interação do Fas com o Fas-L pode induzir apoptose massiva nos tireócitos⁽⁶¹⁾. Por outro lado, sabe-se que as interações Fas/Fas-L são determinantes na manutenção da tolerância dos linfócitos T na periferia, isto é, extratímica^{62,63}.

Curiosamente, na doença de Graves verificou-se que o Fas e o Fas-L estão expressos nos tireócitos, embora não ocorra, geralmente, apoptose^{64,65}. O aumento da expressão Bcl-2 – um inibidor da morte celular programada – nos tireócitos com doença de Graves pode antagonizar o processo apoptótico mediado pelo Fas⁶⁶. Além disso, o aumento da expressão de Fas-L nos tireócitos de doentes com doença de Graves pode manter a homeostasia da tireóide, eliminando os linfócitos infiltrados e os tireócitos hiperplásicos através da apoptose induzida pelo Fas^{67,68}. Conjuntamente, estas observações contribuem para a compreensão dos mecanismos imunes responsáveis pela infiltração linfocitária na doença de Graves e na tireoidite de Hashimoto.

Nesta perspectiva, será interessante medir o Fas/Fas-L solúvel como marcador de auto-imunidade tireoideia, permitindo correlacionar a expressão de Fas/Fas-L e o curso clínico da doença de Graves.

A interacção do ligando CD40 (CD40L ou CD154) com o CD40, presente nas células da tireóide, constitui outra via de activação de linfócitos nas doenças auto-imunes da tireóide^{20,69}.

O CD40 e o CD40L são moléculas de sinalização de linfócitos T e de outras células, por exemplo linfócitos B, que em termos de estrutura molecular pertencem à mesma família do Fas e Fas-L e podem estar particularmente envolvidas na estimulação de linfócitos B auto-reactivos, designadamente na síntese de auto-anticorpos de alta afinidade⁷⁰. Uma grande variedade de células vasculares e imunológicas expressa CD40, CD40L ou ambos. Estruturalmente, o CD40L é uma proteína transmembrana, relacionada com o TNF- α , originalmente identificado nas células T, CD4⁺, activadas e, posteriormente, nos mastócitos estimulados, basófilos, plaquetas

e células vasculares, como as células musculares lisas⁷¹. O CD40 está expresso nas células B, monócitos, macrófagos, células dendríticas e endoteliais^{70,72}.

O CD40 é estimulado por citocinas (interferon γ , IL-1 e TNF), que são produzidas pelo infiltrado linfocitário da tireóide⁸³. Por outro lado, a ligação do CD40-CD40L pode originar efeitos directos, através da libertação de citocinas, como a IL-1⁷³. Esta interacção CD40-CD40L provoca diminuição acentuada dos níveis do antagonista do receptor da IL1, um inibidor endógeno das células Th1. Contrariamente à indução de citocinas Th1, a ligação CD40-CD40L suprime as respostas mediadas por células Th2, provavelmente devido à diminuição da expressão da IL-4 e do receptor da IL-10, duas vias típicas Th2, cuja activação limita a expressão de IL-12 e CD40⁷⁴.

A apresentação de antígenos aos linfócitos T constitui outra via para induzir a expressão de CD40L⁷⁵. Adicionalmente, o CD40L pode ampliar a sua própria expressão e a do seu receptor⁷⁶.

O interferon γ tem um papel importante na indução de CD40/CD40L^{77,78}. Também foi demonstrado que o interferon γ e o TNF- α induzem a apoptose, mediada pelo Fas, de células foliculares da tireóide, desempenhando um papel importante na tireoidite auto-imune⁷⁹.

O sistema CD40/CD40L participa activamente na patogénese das doenças da tireóide, nomeadamente na doença de Graves e na tireoidite de Hashimoto^{80,81}.

O CD40 está expresso nos fibroblastos da órbita e representa uma via para a interacção entre estes fibroblastos e as células que expressam CD40L, como os linfócitos T e os mastócitos, desempenhando um papel importante na remodelação tecidual na oftalmopatia de Graves⁸².

Algumas evidências sugerem que na tireoidite de Hashimoto poderá haver uma predisposição genética para a auto-imunidade que, somada a factores ambientais e/ou hormonais precipitam ou contribuem para o desenvolvimento da doença. A evidência do papel dos factores genéticos é salientada em estudos com gémeos monozigóticos e dizigóticos e pelo aumento da incidência da doença em famílias^{85,86}.

Os mecanismos moleculares e celulares

que estabelecem a ligação entre a inflamação crónica e a tiroidite ainda não são conhecidos na totalidade. As citocinas, tais como o TNF- α , INF- γ e a IL-1 β , são produzidas pelas células inflamatórias intra-tiroideias e células foliculares da tiróide, participando nas fases de indução e ampliação da resposta imune^{3,86}. Assim, o TNF- α actua através do seu receptor, TNFR1, para activar o factor de transcrição NF-kB (frequentemente detectado em tumores e que pode constituir o elo de ligação entre a inflamação e o cancro). Durante uma inflamação aguda, a activação do NF-kB leva a um aumento da expressão de genes que codificam mediadores pró-inflamatórios (INF- γ e IL-1 β) e activa genes que regulam o balanço entre a proliferação celular e a morte^{85,86}. A resposta inflamatória mediada por citocinas pode ser modulada por vários factores incluindo a variação polimórfica dos respectivos genes^{85,86}.

BIBLIOGRAFIA

- Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr Rev* 1994; 15: 788-830.
- Pozzilli P, Carotenuto P, Delitala G. Lymphocytic traffic and homing into target tissue and the generation of endocrine autoimmunity. *Clin Endocrinol* 1994; 41: 545-554.
- Eguchi K, Matsuoka N, Nagataki S. Cellular immunity in autoimmune thyroid disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1995; 9: 71-94.
- Weetman AP. Graves' disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 1236-1248.
- Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. *N Engl J Med* 2003; 348: 2646-2655.
- Krassas GE, Pontikides N, Kaltsas T, Dumas A, Frystyk J, Chen JW, Flyvbjerg A. Free and total insulin-like growth factor (IGF)-I, -II, and IGF binding protein-1, -2, and -3 serum levels in patients with active thyroid eye disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 132-135.
- Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 2003; 24: 48-77.
- Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med* 2002; 43: 1188 - 1200.
- Pritchard J, Han R, Horst N, Cruikshank WW, Smith TJ. Immunoglobulin activation of T cell chemoattractant expression in fibroblasts from patients with Graves' disease is mediated through the insulin-like growth factor I receptor pathway. *Immunol* 2003; 170: 6348-6354.
- Londei M, Botazzo GF, Feldmann M. Human T-cell clones from autoimmune thyroid glands: specific recognition of autologous thyroid cells. *Science* 1985; 228: 85-89.
- Margolick JB, Weetman AP, Burman KD. Immunohistochemical characterization of intrathyroidal lymphocytes in Graves' disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 47: 208-218.
- Aust GG, Lehmann Y, Heberling HJ. Different immunophenotype and autoantibody production by peripheral blood and thyroid-derived lymphocytes in patients with Graves' disease. *Exp Clin Endocrinol* 1996; 104: 50-58.
- Cebrian M, Yague E, Rincon M, Lopez-Botet M, O de Landazuri M, Sanchez-Madrid F. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J ExpMed* 1988; 168: 1621-1637.
- Chan JY, Walfish PG. Activated (Ia+) T-cells and their subsets in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis using dual laser flow microfluorimetric analysis. *Mol Biol Med* 1986; 3: 99-112.
- Gessl A, Wilfing A, Agis H, Steiner G, Czernin S, Boltz-Nitulescu G, Vierhapper H, Waldhausl W. Activated naive CD4+ peripheral blood T cells in autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 1995; 5: 117-123.
- Corrales JJ, Lopez A, Ciudad J, Mories MT, Miralles JM, Orfao A. Methimazole therapy in Graves' disease influences the abnormal expression of CD69 (early activation antigen) on T cells. *J Endocrinol* 1997; 155: 491-500.
- Mclver B, Morris JC. The pathogenesis of Graves' disease. *Clin Endocrinol Metab* 1998; 27: 73-89.
- Aozasa M, Amino N, Iwatani Y, Tamaki H, Matsuzuka F, Kuma K, Miyai K. Intrathyroidal HLA-DR positive lymphocytes in Hashimoto's disease: increases in CD8 and Leu7 cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 52: 516-522.
- Bossowski A, Urban M, Stasiak-Barmuta A. Analysis of changes in the percentage of B (CD19) and T (CD3) lymphocytes, subsets CD4, CD8 and their memory (CD45RO), and naive (CD45RA) T cells in children with immune and non-immune thyroid diseases. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003; 16: 63-70.

20. Marazuela M. Lymphocyte traffic and homing in autoimmune thyroid disorders. *Eur J Endocrinol* 1999; 140: 287-290.
21. Bottazzo GF, Doniach D. Autoimmune thyroid disease. *Annu Rev Med* 1986; 37: 353-359.
22. Wall JR, Baur R, Schleusener H, Bandy-Dafoe P. Peripheral blood and intrathyroidal mononuclear cell populations in patients with autoimmune thyroid disorders enumerated using monoclonal antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 56: 164-169.
23. Levy Y, Segal N, Weintrob N, Danon YL. Chronic urticaria: association with thyroid autoimmunity. *Arch Dis Child* 2003; 88: 517-519.
24. Roura-Mir IC, Alcalde L, Vargas F, Tolosa E, Obiols G, Foz M, Jaraquemada D, Pujol-Borrell R. Gamma delta lymphocytes in endocrine autoimmunity in Graves' disease but not in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 1993; 92: 288-295.
25. Iwatani Y, Amino N, Kaneda T, Ichihara K, Tamaki H, Tachi J, Matsuzuka F, Fukata S, Kuma K, Miyai K. Marked increase of CD5+ B cells in hyperthyroid Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 1989; 78: 196-200.
26. Papic M, Stein-Streilein J, Zakarija M, McKenzie JM, Guffee J & Fletcher MA. Suppression of peripheral blood Natural Killer cell activity by excess thyroid hormone. *J Clin Invest* 1987; 79: 404-408.
27. Itoh M, Uchimura K, Yamamoto K, Makino M, Imamura S, Kobayashi T, Fujiwara K, Kato T, Hayakawa N, Sawai Y, Nagasaka A, Iwase K, Nomura T, Hagino Y. Distinctive response of thyroid-infiltrating mononuclear cells to B cell activation through CD40 and interleukin-4 in Graves' patients. *Cytokine* 2002; 19: 107-114.
28. Rojano J, Sasia S, Gavila I, Aguilar M, Escobar L, Giro J A. Serial analysis of the effects of methimazole or radical therapy on circulating CD16/56 subpopulations in Graves' disease. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 314-316.
29. Watanabe M, Yamamoto N, Maruoka H, Tamai H, Matsuzuka F, Miyauchi A, Iwatani Y. Independent involvement of CD8+CD25+ cells and thyroid autoantibodies in disease severity of Hashimoto's disease. *Thyroid* 2002; 12: 801-808.
30. Iwatani Y, Amino N, Hidaka Y, Kaneda T, Ichihara K, Tamaki H, Matsuzuka F, Fukata S, Kuma K, Miyai K. Decreases in alpha beta T cell receptor, negative T cells and CD8 cells and an increase in CD4+CD8+ cells in active Hashimoto's disease and subacute thyroiditis. *Clin Exp Immunol* 1992; 87: 444-449.
31. Corrales JJ, Orfao A, Lopez A, Ciudad J, Mories MT. Serial analysis of the effects of methimazole therapy on circulating B cell subsets in Graves' disease. *J Endocrinol* 1996; 151: 231-240.
32. Rottem M. Chronic urticaria and autoimmune thyroid disease: is there a link? *Autoimmun Rev* 2003; 2: 69-72.
33. Dittmar M, Kahaly GJ. Polyglandular autoimmune syndromes: immunogenetics and long-term follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2983-92.
34. Weetman AP. Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 1-9.
35. Tezuka H, Eguchi K, Fukuda T, Otsubo T, Kawabe Y, Ueki Y, Matsunaga M, Shimomura C, Nakao H, Ishikawa N, et al. Natural Killer and Natural Killer-like cell activity of peripheral blood and intrathyroidal mononuclear cells from patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 702-707.
36. Larsen PR, Davies TF. Hypothyroidism and thyroiditis. In *Williams Textbook of Endocrinology*. Eds Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS. Philadelphia, WB Saunders 2003; pp 423-449.
37. Teng WP, Cohen SB, Posnett DN, Weetman AP. T cell receptor phenotypes in autoimmune thyroid disease. *J Endocrinol Invest* 1990; 13: 339-342.
38. Ciampolillo A, Guastamacchia E, Amati L, Magrone T, Munno I, Jirillo E, Triggiani V, Fallacara R, Tafaro E. Modifications of the immune responsiveness in patients with autoimmune thyroiditis: evidence for a systemic immune alteration. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 1946-1950.
39. Waldmann TA. The interleukin-2 receptor. *J Biol Chem* 1991; 266: 2681-2684.
40. Nelson DL, Kurman CC. Targeting human IL-2 receptors for diagnosis and therapy. *Proc Soc Exp Biol Med* 2006; 239: 309-311.
41. Roman M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendano LF, Simon V, Escobar AM, Gaggero A, Diaz PV. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:190-195.
42. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: Induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998; 10: 1969-1980.

43. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164.
44. Sakaguchi S. Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101: 455-458.
45. Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1988; 188: 287-296.
46. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: Production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999; 162: 5317-5326.
47. Vasu C, Dogan RN, Holterman MJ, Prabhakar BS. Selective induction of dendritic cells using granulocyte macrophage-colony stimulating factor, but not fms-like tyrosine kinase receptor 3-ligand, activates thyroglobulin-specific CD4⁺/CD25⁺ T cells and suppresses experimental autoimmune thyroiditis *J Immunol* 2003; 170: 5511-5522.
48. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673-87.
49. von Andrian UH, Engelhardt B. α 4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 68-72.
50. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration – two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000; 343: 1020-1034.
51. Giron JA, Rojano J, Sasian S, Gavilan I, Aguilar M, Escobar L. The expression of the beta 1 integrin CD29 and the beta 2 integrin CD11b is decreased in peripheral blood lymphocytes from Graves' disease patients. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 349-54.
52. Marazuela M, Postigo AA, Acevedo A, Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F, de Landazuri MO. Adhesion molecules from the LFA-1/ICAM-1,3 and VLA-4/VCAM-1 pathways on T lymphocytes and vascular endothelium in Graves' and Hashimoto's thyroid glands. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2483-90.
53. Bossowski A, Urban M, Stasiak-Barmuta A, Turowski D. Expression of very late antigen-4 and lymphocyte function-associated antigen-1 on peripheral blood lymphocytes from patients with Graves disease. *Pediatr Res* 2002; 52: 533-7.
54. Arao T, Morimoto I, Kakinuma A, Ishida O, Zeki K, Tanaka Y, Ishikawa N, Ito K, Eto S. Thyrocyte proliferation by cellular adhesion to infiltrating lymphocytes through the intercellular adhesion molecule-1/lymphocyte function-associated antigen-1 pathway in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 382-389.
55. Khoo DH, Ho SC, Seah LL, Fong KS, Tai ES, Chee SP, Eng PH, Aw SE, Fok AC. The combination of absent thyroid peroxidase antibodies and high thyroid-stimulating immunoglobulin levels in Graves' disease identifies a group at markedly increased risk of ophthalmopathy. *Thyroid* 1990; 9: 1175-80.
56. Rapoport B, McLachlan SM. Thyroid autoimmunity. *Clin Invest* 2001; 108: 1253-1259.
57. Corrales JJ, Orfao A, Lopez A, Mories MT, Miralles JM, Ciudad J. Analysis of IL-2 and IL-6 binding to peripheral blood lymphocytes in Graves disease: relationship with disease activity. *Cytometry* 1997; 15: 30: 118-23.
58. Dong Z, Takakuwa T, Takayama H, Luo WJ, Takano T, Amino N, Matsuzuka F, Aozasa K. Fas and Fas ligand gene mutations in Hashimoto's thyroiditis. *Lab Invest* 2002; 82: 1611-1616.
59. Dhein J, Walczak H, Bäumler C, Debatin K-M, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995; 373: 438-441.
60. Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995; 373: 444-448.
61. Jen-Der Lin. The role of apoptosis in autoimmune thyroid disorders and thyroid cancer. *BMJ* 2001; 322: 1525-1527.
62. Kamradt T, Mitchison NA. Advances in immunology: Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001; 344: 655-664.
63. Davidson A, Diamond B. Advances in immunology: Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001; 345: 340-350.
64. Salmaso C, Bagnasco M, Pesce G, Montagna P, Brizzolara R, Altrinett V, Richiusa P, Galluzzo A, Giordano C. Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity: insights from Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 496-501.
65. Baker JR Jr. The nature of apoptosis in the thyroid and the role it may play in autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2001; 11: 233-44.

66. Giordano C, Richiusa P, Bagnasco M, Pizzolanti G, Di Blasi F, Sbriglia MS, Mattina A, Pesce G, Montagna P, Capone F, Misiano G, Scorsone A, Pugliese A, Galluzzo A. 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: 233-44.
67. Hiromatsu Y, Hoshino T, Yagita H, Koga M, Sakisaka S, Honda J, Yang D, Kayagaki N, Okumura K, Nonaka K. Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1999; 84: 2896-2902.
68. Tang H, Chen K, Wei Y, Sharp GC, McKee L, Braley-Mullen H. Apoptosis of thyrocytes and effectors cells during induction and resolution of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *Int Immunol* 2000; 12: 1629-1639.
69. Metcalfe RA, McIntosh RS, Marelli-Berg F, Lombardi G, Lechler R, Weetman AP. Detection of CD40 on human thyroid follicular cells: analysis of expression and function. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1268-1274.
70. Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv Immunol* 1996; 61: 1-77.
71. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signalling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1931-1936.
72. Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* 1993; 178: 669-674.
73. Clark LB, Foy TM, Noelle RJ. CD40 and its ligand. *Adv Immunol* 1996; 63: 43-78.
74. Brossart P, Zobywalski A, Grunebach F, Behnke L, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Tumour necrosis factor α and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Cancer Res* 2000; 60: 4485-4492.
75. Ruedl C, Bachmann MF, Kopf M. The antigen dose determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2056-2064.
76. Pinchuk LM, Klaus SJ, Magaletti DM, Pinchuk GV, Norsen JP, Clark EA. Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *J Immunol* 1996; 157: 4363-4370.
77. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 111-135.
78. Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 4-43.
79. Wang H, Bretz JD, Phelps E, Mezosi E, Arcsott PL, Utsugi S, Baker JR Jr. A unique combination of inflammatory cytokines enhances apoptosis of thyroid follicular cells and transforms non-destructive to destructive thyroiditis in experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 2002; 168: 2470-2474.
80. Smith TJ, Sciaky D, Phipps RP, Jennings TA. CD40 expression in human thyroid tissue: evidence for involvement of multiple cell types in autoimmune and neoplastic diseases. *Thyroid* 1999; 9: 749-55.
81. Tomer Y, Concepcion E, Greenberg DA. A C/T single-Nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. *Thyroid* 2003; 12: 1129-1135.
82. Sempowski GD, Rozenblit J, Smith TJ, and Phipps RP. Human orbital fibroblasts are activated through CD40 to induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol* 1998; 274: C707-14.
83. Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Romagnani P, Ferrari SM, Paolicchi A, Ferrannini E, Serio M. Increase of interferon- α inducible α -chemokine CXCL10 but not β chemokine CCL2 serum levels in chronic autoimmune thyroiditis. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 171-177.
84. Solerte SB, Prececutti S, Gazzaruso C, Locatelli E, Zamboni M, Schifino N, Bonacasa R, Rondanelli M, Taccani D, Ferrari E, Fioravanti M. Defect of a subpopulation of natural killer immune cells in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis: normalizing effect of dehydroepiandrosterone sulfate. *J Endocrinol* 2005; 152(5): 703-12.
85. Dittmar M, Kahaly GJ. Immunoregulatory and susceptibility genes in thyroid and polyglandular autoimmunity. *Thyroid* 2005; 15(3): 239-50.
86. Bresson D, Rebuffat SA, Peraldi-Roux S. Localization of the immunodominant region on human thyroid peroxidase in autoimmune thyroid diseases: an update. *J Autoimmune Dis* 2005; 2(1):2.