



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

SCUOLA DI MEDICINA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA TRASLAZIONALE

**Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina e Chirurgia**

Tesi di Laurea

**EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI  
L-CARNITINA E SELENIO IN PAZIENTI AFFETTI DA MORBO DI  
GRAVES-BASEDOW, IN TRATTAMENTO CON FARMACI  
ANTITIROIDEI: RISULTATI PRELIMINARI DI UN TRIAL CLINICO  
RANDOMIZZATO**

Relatore:

**Chiar.mo Prof. Gianluca AIMARETTI**

Correlatrice:

**Dott.ssa Chiara MELE**

Candidato:

**Giulia MAGISTRALI**

Matricola 20026883

Anno Accademico 2023/2024



# Sommario

1. Introduzione.....	4
1.1 Morbo di Graves Basedow .....	4
1.1.1. Epidemiologia.....	4
1.1.2. Fattori di rischio .....	5
1.1.3. Patogenesi.....	10
1.1.4. Presentazione clinica .....	13
1.1.5. Diagnosi.....	19
1.1.6. Trattamento.....	22
1.2. L-Carnitina .....	36
1.2.1. Sintesi endogena di L-Carnitina .....	36
1.2.2. Omeostasi e fonti alimentari di L-Carnitina.....	37
1.2.3. Ruolo metabolico di L-Carnitina.....	39
1.3. Selenio .....	40
1.3.1. Omeostasi e fonti alimentari di Selenio.....	41
1.3.2. Ruolo del Selenio nell'organismo umano .....	44
1.4. L-Carnitina e Selenio nel Morbo di Basedow .....	45
1.4.1. L-Carnitina e funzione tiroidea.....	45
1.4.2. Selenio e funziona tiroidea .....	47
2. Obiettivo dello studio .....	51
3. Pazienti e Metodi .....	51
3.1. Popolazione e disegno dello studio .....	51
3.2. Metodi.....	53
3.2.1. Parametri antropometrici .....	53
3.2.2. Test biochimici e dosaggi immunoenzimatici .....	53
3.2.3. Questionario .....	53
3.3. Analisi statistiche.....	54
4. Risultati.....	55
4.1. Caratteristiche della popolazione al basale.....	55
4.2. Follow-up e outcome .....	56
4.3. Qualità della vita.....	60
5. Discussione.....	67
5.1. Limiti e punti di forza dello studio .....	68
6. Conclusione .....	69
7. Bibliografia.....	70

# 1. Introduzione

## 1.1 Morbo di Graves Basedow

Il morbo di Graves Basedow o malattia di Graves (GD) fu riconosciuta per la prima volta nel diciannovesimo secolo come una sindrome che prevedeva l'aumento di dimensioni e l'iperattività della ghiandola tiroidea, associati all'aumento del ritmo cardiaco ed all'insorgenza di oftalmopatia [1].

GD è una malattia autoimmune organo-specifica della tiroide causata dalla presenza in circolo di anticorpi diretti contro il recettore per l'ormone stimolante della tiroide (tireotropina, TSH) [2,3] che inducono la produzione ed il rilascio di ormoni tiroidei, la proliferazione dei tireociti e l'aumento di dimensione della ghiandola tiroidea [4], portando ad un quadro di ipertiroidismo ed all'insorgenza di gozzo [2]. Gli ormoni tiroidei agiscono su molti sistemi e apparati dell'organismo e, per questa ragione, i segni e i sintomi associati alla patologia possono influenzare fortemente e significativamente la qualità di vita (QoL) dei pazienti affetti [5].

### 1.1.1. Epidemiologia

GD è la causa più frequente di ipertiroidismo nei paesi occidentali e nelle aree geografiche con un sufficiente introito di iodio [2,6], con un'incidenza che varia tra i 20 e i 30/50 casi su 100 000 persone all'anno ed una prevalenza nella popolazione dell'1-1.5% [1,3].

L'età media di insorgenza è di 48 anni [5] e, nonostante l'insorgenza di GD possa verificarsi ad ogni età in entrambi i sessi, le donne con un'età compresa tra i 30 e i 50 anni mostrano un rischio aumentato [6]. Il rischio di sviluppare la patologia nel corso della vita è del 3% nelle donne e dello 0,5% negli uomini [1]. In uno studio condotto in Francia nel 2016, nel quale sono stati arruolati 1572 pazienti affetti da ipertiroidismo, è emerso che il 73.3% di tali soggetti risultava affetto da GD, l'85% di questi erano donne, con età media di insorgenza di 43 anni e di 44 anni per le recidive [5].

I dati etnografici sono carenti, ma la malattia sembra essere più frequente nella popolazione asiatica piuttosto che in quella africana sub-sahariana [5,7].

In molti studi è stato osservato un rischio aumentato di sviluppare carcinoma della tiroide nei pazienti affetti da morbo di Basedow, soprattutto in presenza di un gozzo tiroideo

preesistente. Nello specifico, la variante Tall Cells del carcinoma papillare della tiroide, una variante più aggressiva di tumore, appare essere molto più frequente nei pazienti con GD [5,8].

### **1.1.2. Fattori di rischio**

GD è secondaria ad un processo autoimmune multifattoriale, in cui sono coinvolti fattori di rischio ambientali ed endogeni, in soggetti geneticamente predisposti [2,7].

I fattori di rischio che, nello specifico, predispongono allo sviluppo della malattia non sono ancora stati completamente chiariti; tuttavia, i fattori genetici ed epigenetici sembrano essere maggiormente determinanti [9–12].

#### ***1.1.2.1. Fattori di rischio genetici***

Una storia familiare di GD è considerata un fattore di rischio importante. Secondo diversi studi, il tasso di concordanza per GD tra i gemelli omozigoti oscilla tra 0.29 e 0.36, mentre negli stessi studi il tasso di concordanza tra i gemelli dizigoti varia tra 0.00 e 0.04 [5,11,13]. Particolarmente interessante in questo ambito risulta essere, nello specifico, uno studio condotto nel 2012 in Danimarca su due coorti di gemelli dello stesso sesso, sia omozigoti che dizigoti, da cui è emerso che il 79% del rischio di sviluppare GD è attribuibile all'ereditabilità, mentre il restante 21% può essere ricondotto a fattori ambientali [11,13].

Analisi genetiche condotte su ampia scala hanno identificato numerosi geni coinvolti nella suscettibilità alla GD, tra questi troviamo geni che codificano per la tireoglobulina, per il recettore della tireotropina, HLA-DR $\beta$ -Arg74, PTPN22, CTLA4, CD25 e CD40 [5,9]. Sono stati individuati, inoltre, meccanismi epigenetici di ipermetilazione di molti geni, tra cui il gene che codifica per il recettore per il TSH e geni che codificano per alcune proteine coinvolte nella via di segnalazione dei linfociti T [9,10]. Risulta interessante sottolineare come circa il 70% dei geni coinvolti nella patogenesi della malattia, che abbiano un ruolo noto, siano geni implicati nel funzionamento delle cellule T, indicando l'importanza dei linfociti T nella patogenesi delle patologie autoimmuni della tiroide [2,14].

##### ***1.1.2.1.1. Recettore per l'ormone stimolante la tiroide (TSH-R)***

GD è causata dalla produzione di anticorpi stimolanti il TSH-R (TRAb), che attivano la sintesi e la secrezione non regolata dell'ormone tiroideo. Essendo il TSH-R il bersaglio diretto della risposta autoimmune nella GD, il gene che codifica per il TSH-R è stato oggetto

di analisi genetiche, che hanno portato all'identificazione di alcuni polimorfismi [10]. Benché inizialmente i polimorfismi identificati fossero mutazioni missense e mancassero prove conclusive di associazione con la malattia, il completamento del Progetto Genoma Umano e la scoperta di dense mappe di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) hanno rivelato che il gene TSH-R risulta fortemente associato a GD e che la variante causale è localizzata nell'introne 1 [10,15]. Nonostante siano poco chiari i meccanismi, gli SNP potrebbero influenzare lo splicing oppure l'espressione del gene TSH-R, possibilmente nel timo. Se l'espressione del TSH-R nel timo fosse ridotta dalle varianti dell'introne 1, ciò consentirebbe alle cellule T autoreattive dirette contro il TSH-R di sfuggire alla delezione nel timo e quindi di innescare la malattia [7,10].

#### ***1.1.2.1.2. Antigeni leucocitari umani (HLA) di classe II***

La regione HLA sul cromosoma 6p21 comprende tre sottoregioni, due delle quali codificano per gli antigeni HLA di classe I (A, B, C) e di classe II (DP, DQ, DR). Mentre gli HLA di classe I sono espressi sulla superficie delle cellule nucleate e sono coinvolti nella presentazione degli antigeni endogeni ai linfociti T CD8+, gli HLA di classe II sono espressi solo sulla membrana cellulare delle cellule immunitarie (linfociti T attivati, linfociti B, macrofagi e cellule dendritiche) e sono coinvolti nella presentazione degli antigeni esogeni ai linfociti T CD4+ [16].

GD è considerata un disordine molto spesso associato agli HLA di classe II [5,17].

In particolare, nei caucasici gli aplotipi HLA-DR3, HLA-C\*07, HLA-DQB1\*03:01, HLA-DQB1\*02 e HLA-DQA1\*05 risultano essere predisponenti per lo sviluppo della malattia; al contrario, gli aplotipi HLA-C03, HLA-DRB1\*07 e HLA-C\*16 risultano essere protettivi [7,16,18]; negli asiatici sono stati individuati 4 aplotipi predisponenti: HLA-B\*35:01, HLA-B\*46:01, HLA-DRB1\*14:03 e HLA-DPB1\*05:01 [18]. Il ruolo predisponente di alcune delle varianti delle molecole HLA di classe II è dovuto al fatto che queste legano con maggiore affinità gli autoantigeni del TSH-R e questo interferisce con la selezione negativa dei cloni di cellule T autoreattive [7].

#### ***1.1.2.1.3. Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4)***

CTLA4 è un importante inibitore dell'attivazione dei linfociti T, il quale svolge la sua azione riducendo il tempo di adesione tra la cellula T e la cellula presentante l'antigene [7]. A dimostrazione della sua azione inibitoria sui linfociti T, sono stati condotti studi su topi

knockout per CTLA4, che hanno mostrato una morte precoce di questi modelli murini a causa dell'attivazione aberrante dei linfociti T, i quali infiltrano e distruggono diversi tessuti. CTLA4 non è espresso costitutivamente dai linfociti T a riposo, ma la sua espressione è indotta dal legame del recettore delle cellule T con la cellula presentante l'antigene (APC), con un picco tra le 24 e le 48 ore [19]. CTLA4 riconosce, nello specifico, due ligandi, B7-1 e B7-2 [19]. Diversi polimorfismi di CTLA4 sembrano essere associati ad un rischio aumentato di sviluppare la tiroidite di Hashimoto, GD e altre malattie autoimmuni [7]. In particolare, sono stati identificati due polimorfismi associati a GD: CT60 e A49G [7,19]. La metanalisi eseguita da Kavvoura et al. [20] mostra un odds ratio (OR) di circa 1.5 per ognuno dei polimorfismi; l'OR è più alto in omozigosi (CT60-CT60), suggerendo un effetto dose dipendente. Il meccanismo che sottende queste interazioni rimane ignoto [7,20]. I diversi polimorfismi di CTLA4 potrebbero agire in sinergia con i diversi polimorfismi di HLA come HLA-A\*02 oppure HLA-DPB1\*05:01 [21].

#### ***1.1.2.1.4. CD40***

Il CD40 svolge un ruolo chiave nell'interazione tra APC e cellula T. Espresso costitutivamente sulle APC, il CD40 è fondamentale per la loro funzione. Sulle cellule B, il CD40 fornisce un segnale cruciale per la loro proliferazione, differenziazione e per lo switch isotipico per la produzione di immunoglobuline di tipo G [10,19]. Dei geni di suscettibilità per GD identificati fino ad ora, il CD40 è l'unico che regola anche le risposte dei linfociti B [19]. Nello studio dei meccanismi attraverso i quali le varianti di CD40 possono innescare la malattia, si è osservato che la variante causativa (l'allele C del CD40 SNP, rs1883832) sovraregola l'espressione del CD40 sulle cellule B [22]; questa sovraregolazione potrebbe abbassare la soglia di attivazione per le cellule B e quindi contribuire all'insorgenza delle malattie autoimmuni. Un'ulteriore possibilità è che l'aumentata espressione del CD40 nei tireociti contribuisca alla malattia; secondo questo modello, l'attivazione del CD40 nei tireociti attiverebbe la secrezione di citochine e l'attivazione delle cellule T residenti, portando ad una risposta infiammatoria locale e all'autoimmunità [10].

#### ***1.1.2.1.5. Protein-tirosin-fosfatasi non recettoriale 22 (PTPN22)***

La tirosina fosfatasi linfoide (LYP), codificata dal gene della PTPN22, incorpora una proteina tirosina fosfatasi da 110 kDa [245] che, come CTLA4, è un potente inibitore dell'attivazione delle cellule T [19,23]. Recentemente, è stato scoperto che la sostituzione

dell'arginina con un triptofano nel codone 620 (R620W) della proteina LYP è associata all'artrite reumatoide, al lupus eritematoso sistemico e ad altre malattie autoimmuni, tra cui il diabete mellito di tipo 1, GD e la tiroidite di Hashimoto [19,24]. Si è scoperto che questo SNP suscita un cambiamento funzionale in LYP, in modo tale che l'allele LYP portatore di triptofano non possa associarsi con la src chinasi C-terminale (Csk), una molecola partner in un complesso inibitorio che regola il segnale chiave del recettore delle cellule T; in modo piuttosto paradossale, questa mutazione rende la proteina un inibitore ancora più potente delle cellule T poiché si tratta di una mutazione con guadagno di funzione [25]. Si ipotizza che una minore segnalazione delle cellule T porterebbe ad una tendenza delle cellule T autoreattive a sfuggire alla delezione timica e quindi a rimanere in periferia [19].

#### ***1.1.2.1.6. CD25***

Il gene CD25 codifica per la catena  $\alpha$  del recettore per l'interleuchina-2 (IL-2). Il CD25 è costitutivamente espresso su linfociti T regolatori (Treg) ed è fondamentale per la loro funzione [10]. Pertanto, i diversi polimorfismi di CD25 possono ridurre la funzione dei Treg, promuovendo l'autoimmunità e quindi può essere associato all'insorgenza di GD [26]. È interessante notare come anche il CTLA4 sia espresso sui Treg e questi dati suggeriscono che i difetti ereditari nella funzione dei Treg possono costituire un importante meccanismo predisponente per la patologia [10]. I geni identificati finora come predisponenti a GD sono solo una piccola parte del contributo genetico per questa malattia. I dati genetici mostrano un impatto dal punto di vista clinico, ma al momento non comportano alcuna implicazione per misure preventive o nel trattamento [7].

#### ***1.1.2.2. Fattori di rischio endogeni***

Nell'insorgenza della patologia sono coinvolti anche fattori di rischio endogeni.

La malattia ha una predominanza femminile ed il polimorfismo ESR2 del recettore per gli estrogeni è spesso individuato nelle pazienti affette da GD [5]. Inoltre, la variazione dei livelli estrogenici potrebbe spiegare l'andamento fluttuante della malattia durante la gravidanza, il ciclo mestruale e la menopausa. [5,27]. Il periodo post-parto, inoltre, è associato ad un rischio aumentato di sviluppare malattie autoimmuni della tiroide [5]. Gli estrogeni e l'inattivazione asimmetrica del cromosoma X alterano il sistema immunitario e potrebbero contribuire all'aumentata prevalenza di GD nel sesso femminile [7,28,29].

### ***1.1.2.3 Fattori di rischio ambientali***

I fattori ambientali influenzano l'incidenza delle malattie autoimmuni tiroidee approssimativamente per il 20%, essendo associati all'attivazione dell'immunità innata [30]. Tra i principali predisponenti ambientali, coinvolti nella patogenesi di GD in soggetti geneticamente predisposti, si possono annoverare l'esposizione ad alti livelli sierici di iodio, il fumo di sigaretta, lo stress, le radiazioni ionizzanti, alcuni farmaci, alcune infezioni virali, e molti altri [4,5,31].

La dose minima giornaliera raccomandata di iodio, per la corretta sintesi degli ormoni tiroidei, è di 150 µg. Alte dosi di iodio sono contenute in numerosi farmaci, come l'amiodarone, in alcuni antisettici, conservanti per i cibi e mezzi di contrasto [32]. Nelle regioni in cui è presente una carenza di iodio, molti pazienti affetti da GD sono clinicamente eutiroidei, ma sviluppano ipertiroidismo conclamato quando aumenta la quantità di iodio disponibile; analogamente, i pazienti affetti da GD eutiroidei in remissione in seguito alla terapia con farmaci antitiroidei, possono sviluppare ipertiroidismo iodio-indotto [5,32]. In alcuni soggetti, l'eccesso di iodio aumenta l'infiltrazione intra-tiroidea di linfociti T di fenotipo Th17 e inibisce la differenziazione dei linfociti T regolatori; questo induce l'apoptosi e la distruzione parenchimale [7].

Il fumo può condizionare lo stato immunitario della ghiandola tiroidea, aumentando il rischio di severità delle malattie autoimmuni tiroidee, in particolare GD. L'influenza del fumo di sigaretta è mediata principalmente dalla nicotina, ma anche da tossine come il tiocianato. In questo processo potrebbe essere coinvolta l'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno fumo-indotta [5].

I pesticidi e gli organoclorurati alogenati possono alterare la funzione tiroidea. I bifenili policlorurati ed i loro metaboliti legano le proteine di trasporto tiroidee, come la transtiretina, interferendo con la funzione tiroidea [30].

Alcune infezioni virali sono state osservate frequentemente in associazione al GD tra queste si possono annoverare herpes simplex virus (HSV), virus della rosolia, virus di Epstein-Barr [33], virus linfotropico a cellule T umano di tipo 1, virus dell'immunodeficienza umana (HIV), virus dell'epatite C (HCV) e parvovirus B19 [5,30].

Un ulteriore fattore di rischio ambientale rilevante è rappresentato dalle disbiosi intestinali [5]. Sia l'ipertiroidismo che l'ipotiroidismo, riscontrati di frequente nelle malattie autoimmuni tiroidee, sono spesso associati ad una crescita batterica incontrollata a livello

del piccolo intestino oppure a cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale [34].

### **1.1.3. Patogenesi**

GD è una malattia autoimmune organo-specifica della tiroide dovuta alla perdita di tolleranza da parte del sistema immunitario nei confronti di alcune strutture tiroidee, in particolare del TSH-R, in soggetti geneticamente predisposti [2,7].

I principali effettori di questo meccanismo sono i TRAb, che legano il TSH-R presente sulle cellule follicolari della tiroide [2,6].

GD è un disturbo fasico caratterizzato in fase attiva da ipertiroidismo, che può andare in remissione o dopo la terapia medica o in alcuni casi anche spontaneamente. La recidiva dell'ipertiroidismo può essere osservata dopo settimane o decenni di eutiroidismo [2].

#### ***1.1.3.1. TRAb***

I TRAb soddisfano i postulati di Koch come causa di malattia nella GD: questi anticorpi sono presenti in quasi tutti i casi di malattia, la gravità della malattia è direttamente correlata al titolo anticorpale, l'iniezione di TRAb negli animali trasferisce malattia e le madri affette da GD trasferiscono la malattia ai neonati [10].

Gli autoanticorpi diretti contro il TSH-R si possono dividere, in base alla loro azione, in anticorpi stimolanti la tiroide (TSAb), anticorpi inibenti la tiroide (TBAb) e anticorpi neutri [2,35]. Sono autoanticorpi della sottoclasse delle IgG1 [9] e la loro proliferazione oligoclonale, sostenuta primariamente dai linfociti B intratiroidei, riflette l'origine autoimmune del GD [2,9]. I TSAb mimano l'attivazione del TSH-R mediante l'attivazione di un via di trasmissione simile, ma non identica, a quella della tireotropina [12,36]; questi anticorpi stimolano l'iperplasia della ghiandola tiroidea oltre che la sintesi e il rilascio di ormoni tiroidei da parte della tiroide, indipendentemente dalla stimolazione da parte dell'asse ipotalamo-ipofisario [3,9].

Sebbene in Letteratura siano documentati casi in cui, sia all'inizio che in seguito ad un periodo di ipertiroidismo, prevale l'azione degli autoanticorpi inibenti rispetto a quelli attivanti, portando all'ipotiroidismo [7], il ruolo dei TBAb e degli autoanticorpi neutri nella patogenesi della malattia ad oggi è meno conosciuto [2,35].

I TRAb riconoscono alcuni epitopi presenti sulla subunità  $\alpha$  del TSH-R. Uno studio condotto negli Stati Uniti nel 2015 ha dimostrato l'importanza della struttura multimerica della subunità  $\alpha$  nel promuovere la maturazione di affinità per queste immunoglobuline [37,38]. Oltre ai TRAb, nei pazienti affetti da GD sono spesso rilevati anche TgAb e autoanticorpi diretti contro la tireoperossidasi (TPOAb) [7]. Questi anticorpi molto probabilmente derivano dall'esposizione di antigeni altrimenti sequestrati ed il loro ruolo nella patogenesi non è ancora completamente chiarito. Infine, nei pazienti affetti da GD sono stati riscontrati anche anticorpi attivanti il recettore per somatomedina (IGF-1), i quali potrebbero svolgere un ruolo importante nello sviluppo dell'oftalmopatia associata a questa patologia [39].

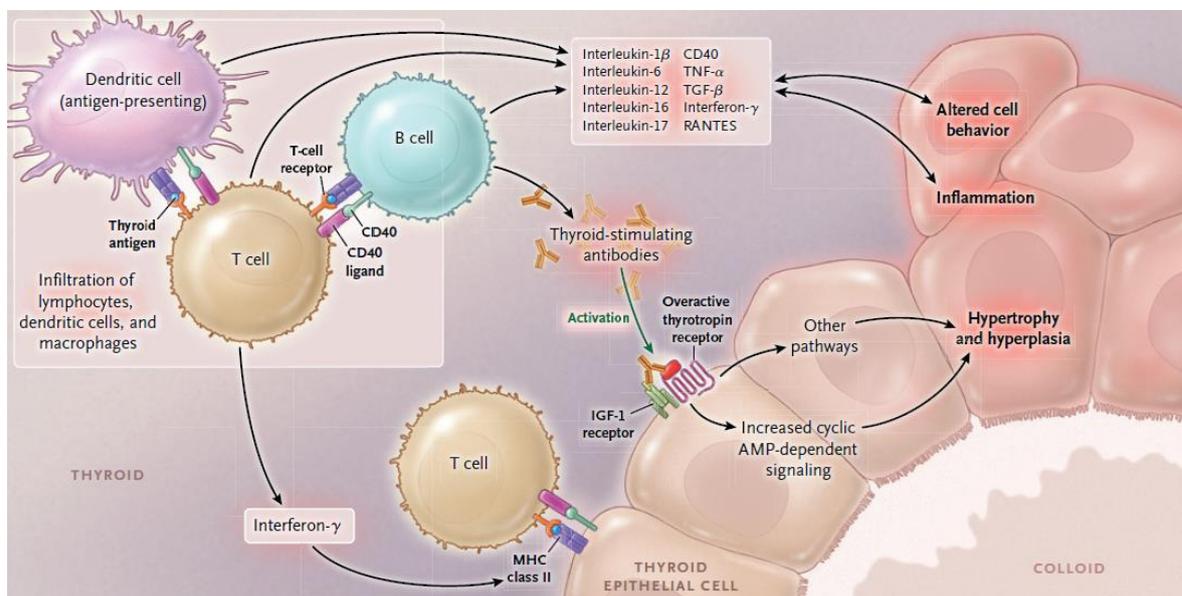
#### ***1.1.3.2. Cellule T e cellule B***

Nello sviluppo di GD è necessaria l'attività sia dei linfociti B che dei linfociti T, componenti fondamentali dell'immunità adattativa [6,9]. Nel timo avviene la maturazione delle cellule immunitarie, grazie alla quale si verifica la delezione dei linfociti T autoreattivi dal pool di linfociti. I linfociti T attivano risposte proliferative attraverso interazioni antigene-specifiche che avvengono tra i recettori dei linfociti T (TCR) e le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), presenti sulle APC, come le cellule dendritiche, monociti e linfociti B. Nel processo di maturazione dei linfociti T è necessario un secondo segnale, senza il quale diventano anergici. Alcuni linfociti T differenziano nei fenotipi delle cellule effettrici, che hanno funzione di cellule T-helper (Th) di tipo 1, di tipo 2 o di tipo 17; altri differenziano in linfociti Treg che hanno il compito di attenuare la reattività immunitaria. Ogni fenotipo produce un pattern particolare di citochine [40]. L'equilibrio tra fattori proinfiammatori e fattori che attenuano la reattività immunitaria determina l'ampiezza e la durata delle risposte immunitarie [9].

Nella GD i linfociti T autoreattivi diretti contro il TSH-R sfuggono ai meccanismi di controllo sia centrali (timici) che periferici. I recettori presenti sulle cellule Th CD4+ interagiscono con le molecole MHC di classe II, mediante le quali i peptidi del TSH-R vengono presentati. Le cellule T intratiroidi hanno prevalentemente un fenotipo Th di tipo 2 [40]; tuttavia, numerosi studi hanno dimostrato che durante le fasi attive della malattia ci sia una prevalenza della risposta Th di tipo 1, mentre le fasi inattive o le fasi tardive di malattia sono caratterizzate da uno switch dal fenotipo Th di tipo 1 ad un fenotipo Th di tipo 2 [2,7].

Anche la maturazione delle cellule B a plasmacellule richiede un doppio segnale. Il primo segnale è dato dal legame dell'antigene con il recettore delle cellule B (BCR) ed il secondo segnale è dato dal legame del CD40, presente sulla superficie dei linfociti B, con il CD40-ligando presente sulla superficie delle cellule T [9]. Queste interazioni risultano nella produzione di citochine fondamentali, come interleuchina-4, che promuovono il rilascio di anticorpi e il supporto da parte delle cellule T per lo switch isotipico [9,10]. Inizialmente le cellule B producono esclusivamente IgM, che possono subire uno switch isotipico ad IgG o IgE [9]. Le cellule B intratiroidee producono spontaneamente TRAb, infatti costituiscono la fonte principale di questi autoanticorpi; tuttavia, anche le cellule B circolanti possono essere ritenute una valida fonte di tali autoanticorpi [33]. Nella GD le cellule B svolgono un importante ruolo anche come APC ai linfociti T, contribuendo al mantenimento del meccanismo patogenetico [6].

**Figura 1.** Patogenesi della GD. Le immunoglobuline stimolanti la tiroide provocano la sovrapproduzione di ormoni tiroidei attivando il recettore della tireotropina, alterando così il normale ruolo regolatorio della tireotropina. Inoltre, le cellule B e T e le cellule presentanti l'antigene producono numerose interleuchine, interferone- $\gamma$ , fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), CD40-ligando ed altre citochine che, a loro volta, attivano e sostengono l'infiammazione ed alterano il comportamento delle cellule epiteliali tiroidee [1].



### 1.1.3.3. Le cellule epiteliali tiroidee

Il ruolo preciso delle cellule epiteliali tiroidee nella patogenesi della GD rimane incerto. Queste cellule esprimono importanti antigeni organo-specifici, come il TSH-R, la Tg e la TPO e secernono numerose chemochine, che potrebbero essere coinvolte nel reclutamento delle cellule immunitarie [9]. Nella GD, le cellule epiteliali, inoltre, esprimono molecole

MHC di tipo II, probabilmente come conseguenza dell'azione in situ dell'interferone- $\gamma$  prodotto dai linfociti infiltrati [41]; attraverso questo meccanismo, le cellule epiteliali tiroidee, che normalmente non sono considerate APC, possono presentare antigeni tiroidei alle cellule T. Infine, sulle superficie delle cellule epiteliali tiroidee è presente il CD40 che potenzialmente può portare ad interazioni produttive antigene-specifiche dirette tra l'epitelio tiroideo e le cellule T nella GD [42,43].

Le informazioni ad oggi disponibili, tuttavia, suggeriscono che l'epitelio tiroideo svolga un ruolo passivo e secondario nella patogenesi della malattia, successivo all'infiltrazione della ghiandola da parte delle cellule immunitarie [9].

#### **1.1.4. Presentazione clinica**

La presentazione clinica della GD dipende dall'età del paziente all'esordio di malattia, nonché dalla gravità e dalla durata dell'ipertiroidismo [1]. Le manifestazioni cliniche sono associate anche al processo autoimmune, oltre che all'ipertiroidismo. L'eccesso di ormoni tiroidei colpisce diversi organi e, per questo motivo, i segni e i sintomi associati alla GD possono variare fortemente ed influenzare in modo significativo il benessere e QoL dei pazienti [2]. Nei pazienti più anziani si verificano meno sintomi; in uno studio condotto su più di 3.000 pazienti affetti da tireotossicosi è stato riportato che più del 50% dei pazienti di età superiore a 61 anni presentava meno di tre sintomi classici della tireotossicosi [44].

##### ***1.1.4.1. Ipertiroidismo***

La presentazione classica della GD è un ipertiroidismo conclamato ad esordio improvviso causato dalla presenza di TRAb, con conseguente secrezione incontrollata ed eccessiva di ormoni tiroidei [45,46]. La presentazione con un ipertiroidismo subclinico (SCH), anche se meno comune, è in aumento e rappresenterebbe ormai il 20% dei casi di GD, secondo uno studio italiano [47]. L'SCH è definito da criteri biologici indipendentemente dalla presenza di segni clinici di ipertiroidismo. L'SCH è biologicamente determinato da una concentrazione di TSH inferiore al normale con concentrazioni di T4 libero (fT4) e T3 libero (fT3) entro il range di normalità [45,48]. L'SCH può essere ulteriormente suddiviso in base alla sua gravità biologica in due categorie: SCH di grado I con concentrazione di TSH ridotta ma ancora ampiamente misurabile (tipicamente tra 0,1 e 0,39 mU/L) e SCH di grado II con concentrazione di TSH bassa o non rilevabile (tipicamente <0,1 mU/L) [49]. Bassi valori di TSH sierico sono spesso transitori. Sebbene le concentrazioni sieriche di TSH possano

ritornare alla normalità spontaneamente, alcuni pazienti sviluppano con il tempo un ipertiroidismo manifesto [45].

I sintomi più comuni dell'ipertiroidismo sono: tremore, sensibilità al caldo, perdita di peso anche con normali abitudini alimentari, ansia e irritabilità, ingrossamento della tiroide (gozzo), alterazioni dei cicli mestruali, disfunzione erettile o diminuzione della libido, stanchezza, movimenti intestinali frequenti e palpitazioni, che si verificano in oltre il 50% dei pazienti [1,2]. La fibrillazione atriale secondaria ad ipertiroidismo è rara nei pazienti di età inferiore a 60 anni, ma si verifica in più di 10% dei pazienti di età pari o superiore a 60 anni [1]. Il gozzo palpabile si sviluppa nella maggior parte dei pazienti con ipertiroidismo di età inferiore a 60 anni, rispetto a meno del 50% dei pazienti più anziani [50]. Inoltre, l'ipertiroidismo porta a ridotti livelli di colesterolo nel sangue e può contribuire all'insorgenza ed al mantenimento di un quadro di insulino-resistenza [45].

Gli ormoni tiroidei hanno un effetto attivante sul riassorbimento osseo e l'ipertiroidismo conclamato è un noto fattore di rischio per l'osteoporosi [51]. Per quanto riguarda la SCH, gli studi forniscono invece risultati contrastanti. Mentre la maggior parte degli studi mostra una diminuzione della densità minerale ossea (BMD) nelle donne in post-menopausa con SCH [52], l'SCH non sembra alterare la BMD negli uomini o nelle donne in premenopausa [45,53]. Una metanalisi condotta su 13 studi prospettici ha confermato un'associazione tra SCH ed un aumento rischio di frattura vertebrale (rapporto di rischio pari a 1,5) e frattura dell'anca (rapporto di rischio di 1,4) con associazioni più forti quando il TSH era inferiore a 0,1 mU/L e quando l'origine esogena di SCH (assunzione di ormoni tiroidei) era stata esclusa [54].

La tireotossicosi, in casi rari, può causare paralisi periodica tireotossica (paralisi muscolare acuta e grave ipokaliemia) [55]. I pazienti con tireotossicosi, infrequentemente, possono manifestare una condizione pericolosa per la vita chiamata tempesta tiroidea, associata a funzionalità epatica alterata, stato mentale alterato, febbre, agitazione, tachicardia ed insufficienza cardiaca [56]. Diversi eventi come interventi chirurgici, parto, infezioni, traumi oppure una scarsa compliance al trattamento, sono in grado di far precipitare la condizione [57].

#### ***1.1.4.2. Oftalmopatia di Graves (GO)***

La GO, chiamata anche malattia dell'occhio tiroideo, è la principale manifestazione extratiroidea di GD (**Figura 2**) [1,58]. I fattori di rischio includono il fumo, la disfunzione

tiroidea, alti livelli sierici di TRAb, il trattamento con iodio radioattivo (RAI), lo stress ossidativo e l'ipercolesterolemia [58,59]. La GO è relativamente rara (incidenza stimata: 0,54–0,9 casi/100.000/anno negli uomini, 2,67–3,3 casi/100.000/anno nelle donne), si manifesta più comunemente con forme lievi e non progressive, e più raramente con forme da moderate a gravi (5-6% dei casi); tuttavia, molti pazienti con GD non presentano alcun coinvolgimento oculare alla diagnosi [59].

I sintomi oculari comuni sono la sensazione di un oggetto sabbioso o corpo estraneo negli occhi, una lacrimazione eccessiva (spesso aggravata dall'esposizione al vento, all'aria fredda, alle luci forti), diplopia, dolore o fastidio agli occhi o retrooculari, offuscamento della vista, desaturazione della visione dei colori e, occasionalmente, perdita della vista [2].

*Figura 2. Oftalmopatia di Graves.*



Il punteggio di attività clinica (CAS) è il miglior sistema di punteggio validato per la valutazione dell'attività di GO, nonostante presenti alcune limitazioni, come il suo caratteristico sistema dicotomico (sì/ no) [58,60]. Il CAS è composto da sette elementi (*Tabella 1*): GO è definito come attivo se CAS risulta  $\geq 3/7$  [58]. Un CAS composto da dieci elementi, che include anche un aumento dell'esoftalmo  $\geq 2$  mm, una riduzione dei movimenti dell'occhio in qualsiasi direzione dello sguardo  $\geq 8^\circ$  e una diminuzione dell'acuità visiva  $\geq 1$  linea sulla tabella di Snellen durante un periodo di 1-3 mesi, è utile per valutare la progressione recente e, quindi, l'attività di GO [60].

**Assessment of activity**

1. Spontaneous retrobulbar pain
2. Pain on attempted upward or downward gaze
3. Redness of eyelids
4. Redness of conjunctiva
5. Swelling of caruncle or plica
6. Swelling of eyelids
7. Swelling of conjunctiva (chemosis)

*Tabella 1* Valutazione dell'attività mediante il punteggio dell'attività clinica (CAS) [58].

Il coinvolgimento orbitale rappresenta una conseguenza parallela del processo autoimmune che si verifica all'interno della ghiandola tiroidea che porta a gonfiore, infiltrazioni linfocitarie con conseguente esoftalmo [4] e, successivamente, fibrosi e contratture dei muscoli extraoculari che limitano la normale funzione dell'occhio [1,60]. GO ha un forte impatto sulla QoL, anche nelle malattie lievi [58]. Il suo decorso clinico segue tipicamente uno schema originariamente descritto da Rundle e Wilson nel 1945 [61]. Lo sviluppo della malattia conclamata attraversa clinicamente una fase iniziale di cambiamenti infiammatori corrispondenti alla continua attivazione della cascata patogena di eventi che si verificano nell'orbita (fase attiva); in seguito la malattia si stabilizza quando l'infiammazione comincia a regredire (plateau o fase statica), per poi migliorare progressivamente in associazione alla risoluzione dell'infiammazione (fase inattiva), senza però tornare alla normalità. Non è noto quanto tempo impieghi la GO a diventare inattiva, ma generalmente si ritiene che ciò avvenga entro 18-24 mesi [1,59]. Va menzionato che, anche se raramente, può verificarsi una riattivazione tardiva della GO [62].

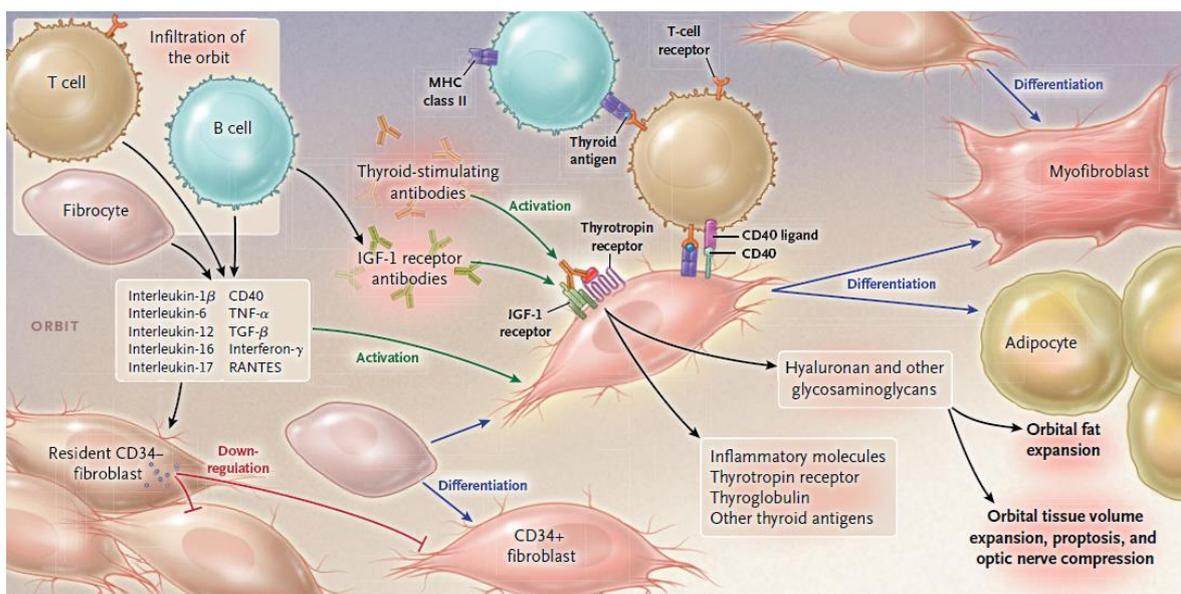
Da uno studio su una coorte di pazienti affetti da GD è emerso che la prevalenza delle diverse anomalie oculari era la seguente: retrazione palpebrale, 92%; esoftalmo, 62%; disfunzione dei muscoli extraoculari, 43%; dolore oculare, 30%; aumento della lacrimazione, 23%; e neuropatia ottica, 6% [63]. Una lieve retrazione o ritardo palpebrale può verificarsi nella tireotossicosi per qualsiasi causa, come risultato di un aumento del tono simpatico [1]. La profondità dell'orbita, il grado di ingrandimento dei muscoli retrooculari e del tessuto fibroso e adiposo retrooculare influenzano il grado di proptosi. Un edema periorbitale accompagna comunemente la proptosi, talvolta mascherandola. Nelle malattie più gravi, possono verificarsi importanti infiammazioni e ulcerazioni congiuntivali dovute a sovraesposizione [2].

Nella maggior parte dei pazienti affetti da GO la malattia è bilaterale, ma può svilupparsi anche in modo asimmetrico o addirittura unilaterale [59]. Le ragioni della presentazione asimmetrica della GO sono sconosciute, ma potrebbero includere differenze nell'anatomia ossea dell'orbita o nella sua vascolarizzazione. Uno studio prospettico ha dimostrato che i pazienti con GO eutiroidea o ipotiroidea tendono ad avere forme più lievi e asimmetriche della malattia [64]. D'altra parte, la GO unilaterale o asimmetrica può talvolta progredire in una malattia bilaterale [59].

Il TSH-R è il bersaglio primario dell'autoimmunità orbitale [4]. L'analisi immunocitochimica del tessuto orbitale umano nella GO rivela che l'attivazione del TSH-R influisce sull'adipogenesi orbitale [65]. Tuttavia, recenti esperimenti in vitro hanno dimostrato che

l'IGF-1R è un ulteriore fattore chiave ed un autoantigene rilevante nella patogenesi della GO [66]. Ciò è stato ipotizzato per la prima volta da un gruppo britannico, che ha dimostrato lo spostamento del fattore 1 insulino-simile (IGF-1) da parte delle immunoglobuline GD dai siti di legame dell'IGF-1R su fibroblasti in coltura ottenuti chirurgicamente da pazienti con GO [4,67]. Questo autoantigene è espresso sulla superficie delle cellule bersaglio orbitali nonché sulle cellule T e B nei pazienti con GO [4]. Successivamente al legame dei TRAb al loro ligando sulle cellule che esprimono TSH-R, avviene un "cross-talk" tra TSH-R e IGF-1R che porta all'attivazione delle vie intracellulari a valle dipendenti da IGF-1R [68]. Questo meccanismo potrebbe spiegare i recenti risultati promettenti ottenuti trattando pazienti con GO attiva, da moderata a grave, con un anticorpo monoclonale antagonista del recettore per IGF-1, il teprotumumab [59,69]. Ciò sarebbe anche in linea con un presunto, ma ancora da dimostrare, ruolo protettivo degli anticorpi contro il recettore IGF-1 presenti nel siero di pazienti con GO [59].

**Figura 3.** Patogenesi della GO. L'orbita viene infiltrata da cellule B, T e fibrociti CD34+. I fibrociti derivati dal midollo osseo si differenziano in fibroblasti CD34+, che possono ulteriormente differenziarsi in miofibroblasti o adipociti. I fibroblasti CD34+ coabitano nell'orbita con i fibroblasti CD34- residenti. Tutte queste cellule possono produrre citochine, a seconda dei segnali molecolari che incontrano nel microambiente. Questi includono le interleuchine 1 $\beta$ , 6, 8 e 16, il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), RANTES e ligando CD40. Queste citochine, a loro volta, attivano i fibroblasti orbitali. I fibroblasti CD34+ esprimono bassi livelli di recettore della tireotropina, tireoglobulina e altri antigeni tiroidei. Le immunoglobuline stimolanti la tiroide attivano il complesso recettoriale tireotropina-fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1), che porta all'espressione di molecole infiammatorie e alla sintesi dei glicosaminoglicani. Le immunoglobuline dirette contro il recettore IGF-1 possono attivare la segnalazione nei fibroblasti orbitali, portando alla produzione di citochine e acido ialuronico. I fibroblasti attivati dalle citochine sintetizzano acido ialuronico e altri glicosaminoglicani, che espandono il tessuto orbitale e causano proptosi e compressione del nervo ottico. Inoltre, il grasso orbitale si espande, probabilmente come conseguenza dell'adipogenesi [1].



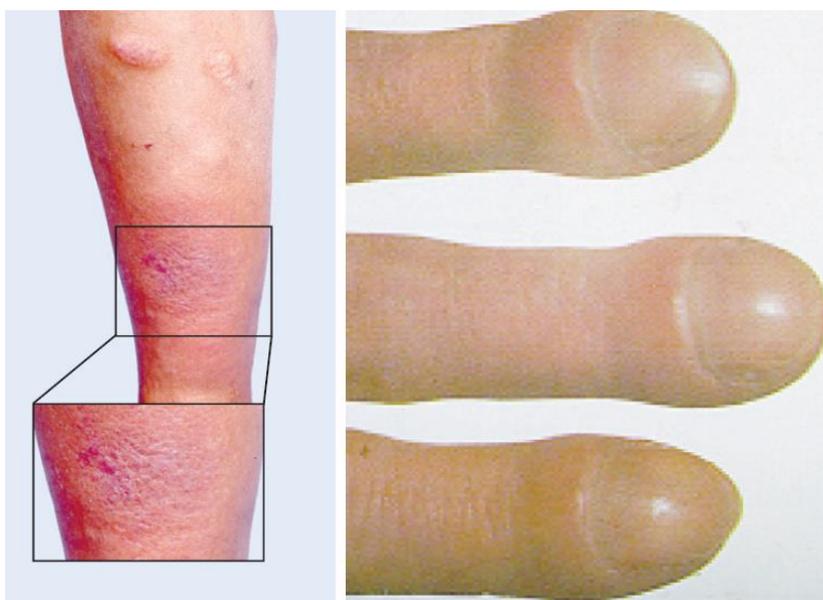
### ***1.1.4.3. Dermopatia localizzata e acropachia***

La dermopatia, o mixedema pretibiale (PTM), e l'acropachia sono manifestazioni extratiroidee della GD molto rare, si verificano rispettivamente nell'1,5%-2% e nello 0,3%-0,5% dei pazienti [70]. La dermopatia tiroidea è quasi sempre osservata nei pazienti affetti da oftalmopatia grave. Si localizza più frequentemente nella regione pretibiale, ma può verificarsi altrove, soprattutto in seguito ad un trauma cutaneo. Si può ipotizzare che GO e la dermopatia abbiano una patogenesi simile, basata sulla differenziazione e proliferazione dei fibroblasti e sulla sintesi di glicosaminoglicani (GAG). In entrambe le condizioni, l'accumulo di GAG determina la ritenzione di fluidi, la separazione delle fibre e l'espansione dei tessuti connettivi. Fattori cellulari, immunologici, molecolari, ambientali e fattori meccanici sono tutti coinvolti nella patogenesi della dermopatia tiroidea. I fattori meccanici come la posizione declive, il drenaggio linfatico più lento e la possibilità di traumi, sono particolarmente importanti e giocano un ruolo fondamentale nella localizzazione della malattia nell'area pretibiale [1,70].

Le lesioni nella zona pretibiale sono in rilievo, consistenti e di colore bruno-giallastro; queste lesioni conferiscono alla pelle un effetto simile alla buccia d'arancia (peau d'orange) (**Figura 4**). Le lesioni più lievi sono generalmente asintomatiche e hanno solamente una valenza estetica e non funzionale; nei casi più gravi il quadro può evolvere in un'elefantiasi associata ad ostruzione linfatica e linfedema [70].

Circa il 20% dei pazienti affetti da dermopatia presenta anche acropachia (**Figura 4**) [70].

**Figura 4.** Dermopatia pretibiale (sinistra) e acropachia (destra).



La forma più comune di acropachia è un ippocratismo asintomatico delle dita, simile a quello associato ad altre eziologie; il coinvolgimento è solitamente bilaterale e simmetrico [70,71]. Le articolazioni solitamente non sono coinvolte e non è presente un aumento della temperatura cutanea. Nei casi gravi può essere presente dolore alle estremità [71]. Le radiografie semplici mostrano una reazione periostale che coinvolge le ossa tubulari delle mani e dei piedi [72]. La patogenesi è probabilmente simile a quella della dermatopatia, tuttavia non sono disponibili studi specifici in questo ambito; si può ipotizzare che l'attivazione dei fibroblasti nel periostio possa essere un fattore determinante [70].

#### ***1.1.4.4. Associazione con altre malattie autoimmuni***

L'associazione con un'altra malattia autoimmune è presente in circa il 20% dei pazienti con GD. Uno studio prospettico su 3.209 pazienti con GD (984 con GO), ha valutato la prevalenza di altre malattie autoimmuni rispetto a 1.069 soggetti sani di controllo, o 1.069 pazienti con tiroidite autoimmune (AT), o 1.069 con gozzo multinodulare (MNG) (con un apporto di iodio simile e comparabili per sesso ed età) [73]. I risultati hanno mostrato che il 16,7% dei pazienti affetti da GD presentava un'altra malattia autoimmune associata: malattia di Sjogren (0,8%), lupus eritematoso sistemico e sarcoidosi (<0,1%), diabete di tipo 1 (0,9%), celiachia (1,1%), sclerosi multipla (0,3%), polimialgia reumatica (1,3%), artrite reumatoide (1,9%), gastrite cronica autoimmune (2,4%) e vitiligine (2,6%). Tre disturbi autoimmuni associati erano presenti nell'1,5% dei casi di GD. La prevalenza di un'altra malattia autoimmune era maggiore (18,9%) nei pazienti con GO, rispetto ai pazienti GD senza GO (15,6%). Questi risultati suggeriscono che i pazienti con GD che sviluppano nuovi sintomi non specifici dovrebbero essere valutati per altri disturbi autoimmuni [2,73].

### **1.1.5. Diagnosi**

Nella **Figura 5** è descritto l'algoritmo per indagare il sospetto clinico di ipertiroidismo secondario a GD [3].

#### ***1.1.5.1. Ipertiroidismo***

La diagnosi di GD può essere sospettata all'esame clinico, come ad esempio nel caso di oftalmopatia evidente associata, ma potrebbero essere necessari esami complementari per distinguere la tireotossicosi dall'ipertiroidismo e determinarne l'eziologia [74].

La misurazione del TSH sierico basale è il parametro di screening riconosciuto nella valutazione iniziale della sospetta disfunzione tiroidea [4]. La valutazione aggiuntiva degli ormoni tiroidei liberi distingue tra ipertiroidismo conclamato e subclinico [4,75]. Nell'ipertiroidismo conclamato, la frazione libera di T4 (fT4) e/o il T3 sierico sono elevati, mentre il TSH sierico è solitamente <0,01 mU/L. Nell'ipertiroidismo lieve, il T4 sierico e l'fT4 possono essere normali, solo il T3 sierico può essere elevato e il TSH sierico potrà essere basso o non rilevabile [3,75,76]. Questi risultati di laboratorio sono stati identificati come "tossicosi T3" e possono rappresentare i primi stadi dell'ipertiroidismo causato da GD o da un'attività autonoma di un nodulo tiroideo funzionante [76]. Il rapporto tra fT4 e TSH (quando l'asse ipofisi-tiroide è intatto) è una relazione log-lineare inversa; quindi, piccoli cambiamenti nella frazione dell'fT4 possono determinare grandi cambiamenti nelle concentrazioni sieriche di TSH [3].

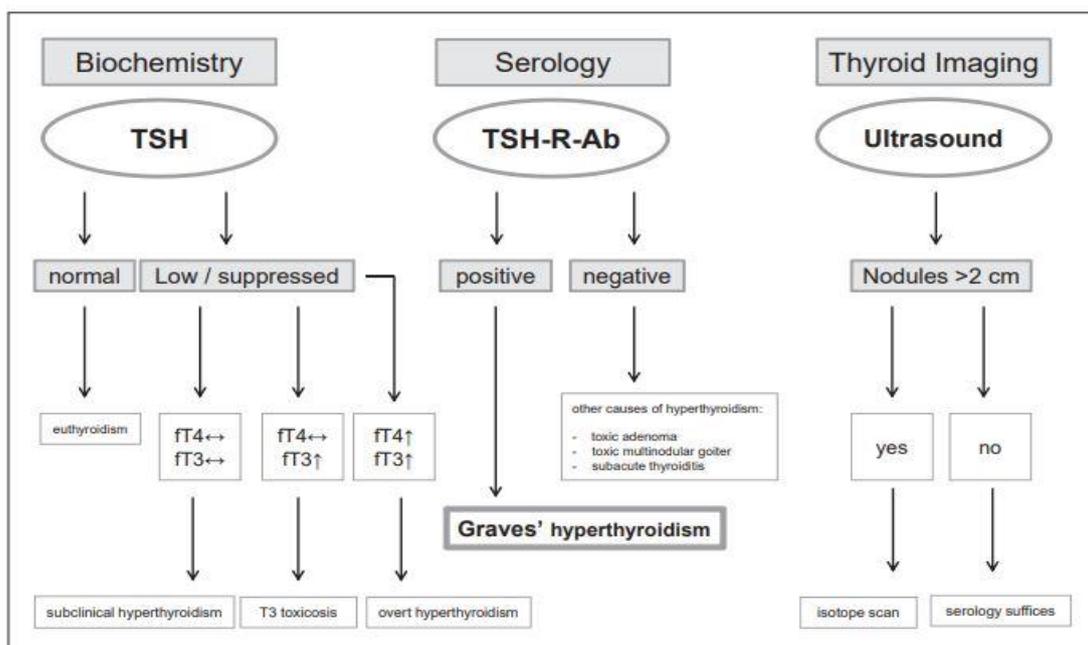
L'eziologia della tireotossicosi deve essere determinata. Se la diagnosi non è evidente sulla base della presentazione clinica e della valutazione biochimica iniziale, è indicata l'esecuzione di test diagnostici, che possono includere, a seconda delle competenze e delle risorse a disposizione, la misurazione dei TRAb, la determinazione dell'assorbimento di iodio radioattivo (RAI) o la misurazione del flusso sanguigno tiroideo mediante ecografia [1,76].

Il dosaggio routinario dei TRAb non è mandatorio, ma se dosati, hanno una sensibilità e una specificità per la GD, rispettivamente del 98% e del 99% [1,4,77]. Oltre alla loro utilità clinica e rilevanza diagnostica, la misurazione dei TRAb riduce notevolmente sia costi che tempo per la diagnosi di GD [4,78]. Sono stati utilizzati vari termini per descrivere i diversi tipi di TRAb; il termine TRAb si riferisce a qualsiasi tipo di anticorpi che interagiscano specificamente con il TSH-R [79]. Questi anticorpi sono comunemente valutati attraverso test immunologici di legame competitivo e per questo motivo sono denominati immunoglobuline inibitorie leganti il TSH-R (TBII); questo tipo di test fornisce informazioni riguardo alla presenza o all'assenza di TRAb e riguardo alla loro concentrazione, ma non riguardo alla loro attività funzionale. Al contrario, i test biologici basati su cellule altamente sensibili differenziano tra gli anticorpi stimolanti il TSH-R (TSAb) e gli anticorpi bloccanti il TSH-R (TBAb) [3,4,79]. I TSAb sono un biomarcatore altamente sensibile e predittivo per le manifestazioni extratiroidiche della GD [4,80]. Infine, l'incorporazione e l'utilizzo precoce di TSAb negli attuali algoritmi diagnostici ha conferito un tempo di diagnosi ridotto del 46% e un risparmio sui costi del 47% [4,81].

L'ecografia tiroidea nella GD non viene considerata indispensabile quando i TRAb sono positivi, ma può indirizzare la diagnosi. L'ecografia tiroidea viene effettuata tramite una sonda lineare ad alta frequenza e comprende l'analisi convenzionale in scala di grigi e l'esame color Doppler, che caratterizza i pattern vascolari e fornisce una quantificazione della vascolarizzazione tiroidea [74]. La GD è spesso caratterizzata da un ingrossamento diffuso della ghiandola tiroidea e da ipoecogenicità [3]. Il dato ecografico maggiormente caratteristico è l'ipervascolarizzazione tiroidea, che tipicamente all'esame color Doppler appare con uno schema pulsatile denominato "inferno tiroideo" che consiste in piccole aree multiple di aumento del flusso intratiroideo, visibili diffusamente in tutta la ghiandola. L'ecografia supporta la diagnosi di GD come procedura di imaging non invasiva, rapida e accurata, senza esporre il paziente a radiazioni ionizzanti [3,4]; aiuta, inoltre, nella determinazione dell'eziologia sottostante alla tireotossicosi e a rilevare noduli tiroidei concomitanti [3]. Nella stragrande maggioranza dei casi, una sierologia per TRAb positiva associata ad un'ecografia con un pattern tipico offre una diagnosi definitiva affidabile e rapida di GD [4].

Se è presente un gozzo con noduli di grandi dimensioni e/o se è indicata la terapia con iodio radioattivo (RAI), si suggerisce l'esecuzione di una scintigrafia con assorbimento di radioiodio, che in pazienti affetti da GD mostrerebbe un assorbimento diffusamente aumentato in tutta la ghiandola tiroidea [3,4,75,82].

**Figura 5.** Algoritmo per indagare il sospetto clinico di malattia di Graves [3].



### ***1.1.5.2. Oftalmopatia tiroide--associata***

L'imaging dell'orbita attraverso tomografia computerizzata o risonanza magnetica è giustificato quando la causa delle manifestazioni oculari rimane incerta. Questi studi di imaging sono utili per distinguere l'ingrossamento del muscolo extraoculare dall'espansione del grasso periorbitale. Soprattutto nei casi di proptosi asimmetrica, è importante escludere il tumore orbitale e la malformazione artero-venosa [1]. Molte altre tecniche di imaging, tra cui l'ecografia orbitale, la scintigrafia con octreotide radiomarcato, la scansione al gallio e l'imaging termico, possono essere utili per definire più precisamente la malattia orbitale [1,78].

## **1.1.6. Trattamento**

L'ipertiroidismo nella GD può essere trattato attraverso tre modalità:

- farmaci tireostatici (ATD);
- terapia radiometabolica con Iodio-131 (RAI);
- tiroidectomia [83,84].

La scelta dipende da criteri medici oggettivi, come il rischio di recidiva e le indicazioni e controindicazioni per ciascuna opzione, ma anche dalle preferenze del paziente [83,85–87]. Dal momento che nessuna delle tre opzioni mostra una chiara superiorità [86], la fattibilità, i vantaggi e gli svantaggi di ciascuna dovrebbero essere discussi in dettaglio con il paziente [84,85]. Negli ultimi anni, la migliore conoscenza delle basi immunologiche della GD ha condotto al recente sviluppo di terapie bersaglio, quali farmaci immunomodulanti (bloccanti del CD40 o del CD20), farmaci che antagonizzano gli effetti dei TRAb, o all'immunoterapia con peptidi derivati dalla struttura del TSH-R, la cui applicazione sta offrendo risultati promettenti, anche se limitata a studi preclinici o preliminari [88].

### ***1.1.6.1. I farmaci tireostatici***

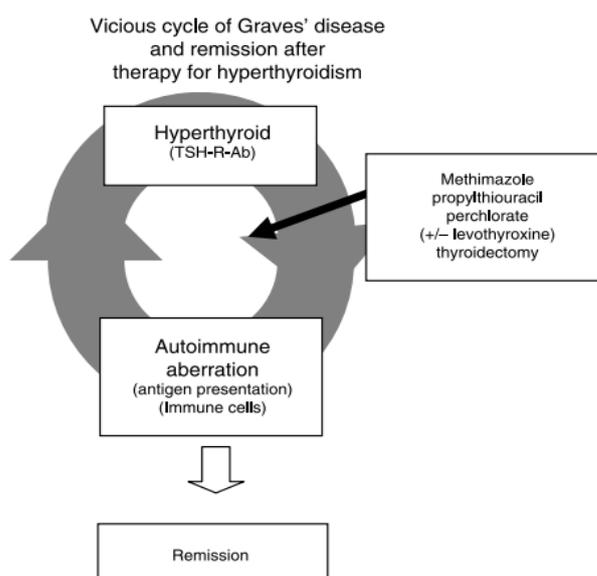
Le recenti linee-guida americane [76] ed europee [3] indicano il trattamento farmacologico come prima scelta nella maggior parte dei casi.

I farmaci antitiroidei possono avere marginali effetti immunomodulatori utili in considerazione della patogenesi autoimmune della malattia, ma non è chiaro se questi effetti siano diretti o indiretti, secondari alla normalizzazione dello stato tiroideo [88]. Il recupero dello stato eutiroideo è in ogni caso preferibile prima dell'intervento chirurgico o della RAI

[84]. Gli ATD utilizzati appartengono alla classe delle tionamidi. La classe è composta da due famiglie: le imidazoline, con il carbimazolo e il suo metabolita attivo il tiamazolo (noto anche come metimazolo o MMI) e i tiouracil-derivati, come il propiltiouracile (PTU) e benziltiouracile [84,89]. Dopo un assorbimento digestivo quasi totale, le tionamidi vengono trasportate attivamente all'interno della ghiandola tiroidea dove inibiscono l'ossidazione e l'organificazione dello ioduro inibendo la tireo-perossidasi (TPO) [88,90] e l'accoppiamento delle iodotirosine per sintetizzare T4 e T3 [75,84]. Il PTU, se somministrato a dosi elevate, blocca anche la deiodinazione di T4 in T3. Il trattamento antitiroideo, quindi, riduce i livelli di ormone tiroideo nel sangue [75]. Nella maggior parte dei casi si verifica una riduzione o un'abolizione dei livelli ematici di TRAb, con remissione della malattia in circa il 50% dei casi, definita come mantenimento dello stato eutiroidico per almeno un anno dopo la conclusione del trattamento [89,91].

Di regola, il trattamento ha una durata di 18–24 mesi, ma è stato recentemente suggerito che trattamenti prolungati per molti anni con basse dosi del farmaco possano associarsi con una più alta possibilità di remissione senza essere gravati da eventi avversi rilevanti [88].

La remissione sembrerebbe legata al ripristino dello stato eutiroidico ed è indipendente dalla dose o dal tipo di farmaco [89,92]. Inoltre, una remissione simile si osserva quando lo stato eutiroidico è raggiunto in seguito ad un intervento chirurgico di tiroidectomia; si presume, quindi, che i pazienti potrebbero ammalarsi a causa dell'instaurarsi di un circolo vizioso per cui l'ipertiroidismo peggiora l'autoimmunità e l'autoimmunità peggiora l'ipertiroidismo (**Figura 6**) [89].



**Figura 6.** Illustrazione dell'ipotesi secondo la quale la remissione della GD durante la terapia sarebbe legata al ripristino della regolazione immunologica una volta ripristinato uno stato eutiroidico nel paziente [92]. Presuppone che la GD abbia un picco di tendenza alla remissione spontanea nella maggior parte dei pazienti. Tuttavia, la remissione è ostacolata dalla presenza di un circolo vizioso: lo stato ipertiroidico peggiora l'aberrazione autoimmune che porta ad una maggior generazione di TRAb, ecc. Il ciclo è interrotto quando il paziente viene riportato ad uno stato eutiroidico. [89].

MMI o carbimazolo sono preferibili al PTU [93], che mostra una tossicità rara ma potenzialmente grave, per questo motivo il suo utilizzo è ora limitato a due situazioni: nel primo trimestre di gravidanza oppure in caso di intolleranza a MMI con rifiuto, controindicazione o impossibilità di trattamento alternativo [84]. Il MMI presenta due vantaggi rispetto al PTU: la sua farmacocinetica richiede una singola dose ogni 24 ore, rispetto a 3 dosi per PTU [94] e gli effetti collaterali sono generalmente meno gravi [84].

Sono stati descritti casi di resistenza ai farmaci antitiroidei, in questo caso si parla di ipertiroidismo refrattario [88]. Ciò si verifica più frequentemente nei casi in cui i livelli di ormoni circolanti sono più elevati e/o in presenza di grave T3-tossicosi. Quando la terapia medica è fallimentare, è necessario ricorrere in urgenza al trattamento definitivo della tireopatia mediante RAI o chirurgia [93].

Possibili meccanismi coinvolti nella resistenza alle tionamidi sono stati suggeriti da Li e collaboratori e includono: malassorbimento; rapida clearance sistemica; insufficiente accumulo intratiroideo del farmaco e presenza di anticorpi anti-tionamidi [95]. La valutazione della resistenza alle tionamidi dovrebbe prevedere un'accurata valutazione dei possibili fattori interferenti [93]. L'eccesso intratiroideo di iodio è la causa determinante della scarsa risposta al trattamento, in quanto favorisce l'accumulo nella ghiandola di ormoni preformati (effetto Wolff Chaikoff), riduce la captazione tiroidea delle tionamidi e favorisce l'escape dal blocco indotto dagli ATD della TPO con ripresa della sintesi ormonale incontrollata [96]. Alcuni studi epidemiologici nella GD hanno osservato una risposta ridotta al trattamento nelle aree ad alto intake di iodio. Al contrario, un apporto iodico ottimale è associato a un miglior tasso di remissione in corso di terapia medica [97]. I livelli della ioduria sono quindi utili nell'inquadramento della resistenza farmacologica [88].

#### ***1.1.6.1.1. Tossicità dei farmaci antitiroidei***

I trattamenti antitiroidei mostrano alcune tossicità, con frequenza e meccanismi non sempre perfettamente conosciuti [84]. Gli effetti collaterali legati all'assunzione di MMI sono dose-dipendenti, mentre quelli associati all'assunzione del PTU sono meno chiaramente correlati alla dose [91]. Le tossicità minori possono causare disagio ma generalmente non sono gravi, mentre la tossicità gravi possono richiedere l'interruzione del trattamento [84].

Tra le tossicità minori si possono verificare reazioni cutanee come eruzioni cutanee o orticaria, che incorrono nel 5-10% dei pazienti e che sono, generalmente, ben controllate dagli antistaminici e non richiedono l'interruzione del trattamento [84,88]. Si può verificare,

inoltre, dolore articolare o muscolare nel 1–5% dei casi che, sebbene non grave, può essere invalidante e potrebbe anche essere il sintomo iniziale di una vasculite, la quale rappresenta una complicanza importante seppur rara [91,98].

Un'epatite biologica moderata è stata riscontrata nel 14-28% dei pazienti in cui il dosaggio delle transaminasi epatiche era sistematico e regolare, principalmente durante i primi 2 mesi di trattamento [84,99]. La normalizzazione spontanea dei valori epatici è la regola, anche quando il trattamento è prolungato a basse dosi [84].

Per quanto riguarda le tossicità maggiori, ci sono tre complicazioni principali associate al trattamento antitiroideo:

1. Agranulocitosi (neutrofili polimorfonucleari (PMN)  $< 500/\text{mm}^3$ ). Il rischio di agranulocitosi è molto basso e stimato per il MMI tra lo 0,2 e lo 0,5%, a insorgenza precoce (4–12 settimane) e generalmente descritta per dosi superiori ai 30 mg/die. Per tale motivo, il ricorso a dosi superiori a quelle abituali è da utilizzare eccezionalmente e per periodi limitati, come nel trattamento della crisi tireotossica (PTU 200–250 mg ogni 4–6 ore o, in alternativa, MMI 20–30 mg ogni 4–6 ore) [76]. Si ritiene che l'agranulocitosi sia mediata da un meccanismo immunoallergico, quindi relativamente imprevedibile. La conta assoluta dei neutrofili al monitoraggio sistematico due settimane prima dell'inizio dell'agranulocitosi risulta normale in oltre il 60% dei pazienti sottoposti al trattamento, rendendo il monitoraggio scarsamente utile [84]. I fattori di rischio sono genetici [100]. La maggior parte dei casi di agranulocitosi si sono manifestati entro i primi tre mesi dall'inizio del trattamento, ma la complicanza può manifestarsi anche dopo un anno o più dall'inizio della terapia [91]. Il trattamento deve essere interrotto in caso di  $\text{PMN} < 1.000/\text{mm}^3$ , nonostante sia stata suggerita una soglia inferiore a  $800/\text{mm}^3$  a causa dell'alto tasso di neutropenia moderata spontanea pretrattamento nell'ipertiroidismo. L'agranulocitosi deve essere distinta da una lieve granulocitopenia transitoria (conta dei granulociti  $< 1500/\text{mm}^3$ ) che occasionalmente si verifica in pazienti con GD, in alcuni pazienti di origine africana e occasionalmente in pazienti trattati con ATD [91]. Qualora venga attuato un monitoraggio sistematico completo dell'emocromo, questo dovrebbe iniziare prima della somministrazione del trattamento antitiroideo. Il rischio di recidiva di agranulocitosi all'introduzione di un diverso farmaco antitiroideo è stimato al 50%; è quindi strettamente controindicato reintrodurre le tionamidi [84].
2. Epatite da grave a fulminante e fallimento epatocellulare, che si presentano con una frequenza stimata tra lo 0,1 e l'1% e possono comparire o complicare un quadro di

sofferenza epatica già presente in corso di ipertiroidismo [93]. Il danno epatico risulta essere più frequentemente di tipo colestatico in corso di trattamento con MMI e di tipo citolitico in corso di trattamento con il PTU [88]. L'epatite clinica si verifica nell'1–1,2% dei pazienti trattati con PTU [99]. I tassi di incidenza di epatite fulminante e di insufficienza epatocellulare sono stimati in 1/10.000 negli adulti e 1/1.000 nei bambini [101]. Le forme fulminanti sono principalmente, se non esclusivamente, associate all'assunzione di PTU [84]. Uno studio con monitoraggio sistematico delle transaminasi in una popolazione cinese ha riscontrato che l'epatite moderata, che richiedeva comunque il ricovero ospedaliero, era più spesso associata al trattamento con MMI o carbimazolo (3/1.000 contro 1,2/1.000), mentre le forme gravi, che comportano insufficienza epatica, risultavano associate al trattamento con PTU; la colestasi era associata nelle stesse proporzioni ad entrambi [102]. Probabilmente esistono diversi meccanismi di tossicità epatica, che coinvolgono reazioni immuno-allergiche e difetti di disintossicazione dai radicali liberi [84].

3. Vasculite. Una complicazione del trattamento antitiroideo che a volte può essere estremamente seria e che si manifesta con dolori articolari, febbre, lesioni cutanee o con insufficienza multiorgano. Semplici risultati positivi per gli anticorpi anti-neutrofili (ANCA), frequentemente riscontrati durante il trattamento antitiroideo e ancora più frequentemente riscontrati al basale nella GD rispetto alla popolazione generale, non indicano di per sé una vasculite [84,103]; lo screening sistematico per gli ANCA nel trattamento antitiroideo non è raccomandato, dal momento che possiede uno scarso valore predittivo [84].

La comparsa di questi eventi avversi gravi richiede l'immediata interruzione del trattamento farmacologico. La sostituzione di un antitiroideo con l'altro è sconsigliabile, per l'elevata possibilità di reazioni crociate [3].

#### ***1.1.6.1.2. Dose di farmaci antitiroidei come trattamento primario per l'ipertiroidismo di Graves***

La dose iniziale di farmaco antitiroideo deve essere adattata all'entità dell'ipertiroidismo [84]. Ci sono due regimi terapeutici utilizzati, il *titration method* e il *block-and-replace method* [88,93]. Il primo, dopo una dose di attacco per alcune settimane (15–40 mg/die per il MMI, 300–400 mg/die per il PTU), utilizza la minima dose del farmaco in grado di mantenere stabilmente l'eutiroidismo; il secondo metodo, meno utilizzato in Italia, impiega

continuativamente dosi elevate dell'antitiroideo in associazione alla levotiroxina (per evitare l'ipotiroidismo). Il secondo metodo, basato sull'ipotesi, mai dimostrata in maniera convincente, di un possibile maggiore effetto immunosoppressivo e di una maggiore stabilità del quadro metabolico, potrebbe essere associato con un maggior rischio di eventi avversi e pone rilevanti problemi di aderenza del paziente alla terapia per il numero elevato di compresse da assumere quotidianamente e non si associa a una prognosi migliore in termini di recidiva dell'ipertiroidismo dopo la sospensione del trattamento antitiroideo [3,90]. Il trattamento con il regime del *titration method* viene di solito proseguito, come già sottolineato, per 18–24 mesi, mentre la limitata evidenza disponibile suggerisce che proseguire il trattamento oltre i 6 mesi usando il *block-and-replace method* non migliori l'efficacia del trattamento [88].

I pazienti che presentano un ipertiroidismo relativamente lieve, se tratti con una dose di MMI eccessiva, potrebbero sviluppare un ipotiroidismo iatrogeno; d'altra parte, un dosaggio inadeguato porterà al perdurare di un ipertiroidismo assoluto. In caso di GO, è particolarmente importante evitare l'ipotiroidismo iatrogeno, che può aggravare l'orbitopatia [84].

Una volta che il paziente ha iniziato il trattamento con un farmaco antitiroideo, si raccomandano test di follow-up della funzionalità tiroidea ogni 4-6 settimane, almeno fino a quando la funzione tiroidea risulterà stabile o quando viene ristabilito uno stato eutiroideo. Dopo 4-12 settimane, la maggior parte dei pazienti presenta una funzione tiroidea considerevolmente migliorata o di norma; quindi, la dose di farmaco tireostatico spesso può essere ridotta mantenendo la normale funzione tiroidea dal momento che possono svilupparsi ipotiroidismo o gozzo se la dose non è correttamente diminuita. Dopo i primi 3-6 mesi, gli intervalli di follow-up possono essere aumentati a ogni due o tre mesi e poi ogni quattro o sei mesi. In tutti i casi, la funzione tiroidea dovrebbe essere monitorata sistematicamente per 1 anno: a 3-4 settimane dalla fine trattamento, poi ogni tre mesi o in caso di recidiva clinica [84].

I livelli sierici di TSH rimangono soppressi per settimane o addirittura mesi, nonostante una normalizzazione dei livelli di ormoni tiroidei; pertanto, un test dei livelli di TSH è una misura inadeguata [84,91]. Il follow-up biologico annuale o biennale è raccomandato, per diagnosticare la progressione verso l'ipotiroidismo, che può verificarsi spontaneamente anche senza trattamento con radioiodio o tiroidectomia nel 5-20% dei casi [84]. La probabilità di recidiva è aumentata nei pazienti con livelli sierici normali di fT4 e fT3 ma livelli di TSH soppressi [104].

#### ***1.1.6.1.3. Recidiva di malattia in seguito al trattamento con farmaci antitiroidei***

Le recidive rappresentano la maggiore limitazione del trattamento farmacologico dell'ipertiroidismo [88]. La recidiva di malattia avviene solitamente entro 3-6 mesi dalla fine del trattamento. Il rischio poi diminuisce e si stabilizza dopo 1 o 2 anni. Particolare attenzione dovrebbe essere prestata alle donne dopo il parto: il 70% delle donne in remissione della GD presenta recidive o tiroidite postpartum [84].

Si sono a lungo ricercati dei predittori clinici e di laboratorio utili per migliorare la selezione dei pazienti, in modo che solo quelli con maggiori probabilità di avere una remissione fossero soggetti ai potenziali rischi della terapia con ATD. Inoltre, ci sono stati tentativi di sviluppare strategie più efficaci per l'uso di ATD per aumentare le possibilità di remissione, compresa la modifica della dose, della durata del trattamento e la combinazione di farmaci antitiroidei con la terapia con T4 [91]. Molti studi retrospettivi mostrano chiaramente che i pazienti con gradi più gravi di ipertiroidismo, gozzi di grandi dimensioni o con un elevato rapporto T3/T4 nel siero hanno meno probabilità di entrare in remissione dopo un ciclo di trattamento farmacologico [88,105,106]. Inoltre, i pazienti con livelli basali più elevati di TRAb hanno probabilmente una minore probabilità di remissione [88,106,107]. Altre caratteristiche cliniche che sono state esaminate come possibili predittori, ma con risultati controversi, includono età, sesso, storia di fumo di sigaretta del paziente, la presenza o l'assenza di oftalmopatia e la durata dei sintomi prima della diagnosi. Sfortunatamente, nessuno di questi parametri ha sufficiente sensibilità o specificità nel predire i candidati ideali per la terapia farmacologica primaria [91]. La misurazione dei TRAb alla fine di un ciclo del trattamento può avere valore predittivo, in quanto i pazienti positivi agli anticorpi hanno quasi sempre una recidiva [108,109]. Tuttavia, anche quei pazienti i cui titoli anticorpali si sono normalizzati hanno un tasso piuttosto elevato di recidiva che varia tra il 30 e il 50% [84,110].

Quando la recidiva è confermata, le varie opzioni terapeutiche dovrebbero essere discusse di nuovo con il paziente [111]. Tradizionalmente, nell'evenienza di una ripresa di malattia dopo un ciclo completo di ATD, l'orientamento è stato quello di offrire ai pazienti la terapia definitiva dell'ipertiroidismo mediante l'eliminazione fisica (tiroidectomia totale) o funzionale (RAI) della ghiandola tiroidea. Recentemente, alcuni studi prospettici, hanno mostrato che un trattamento prolungato per molti anni con basse dosi di antitiroidei può associarsi con un'incidenza notevolmente più bassa di recidive dell'ipertiroidismo

basedowiano [112]. Pertanto, un trattamento a lungo termine con basse dosi di tionamidi può essere considerato una valida alternativa, soprattutto nei pazienti anziani, in età pediatrica, nei pazienti in cui vada data la priorità alla cura tempestiva dell'orbitopatia basedowiana severa e attiva o nei pazienti che sono stabilmente eutiroidei con bassi dosaggi del farmaco e rifiutano il trattamento chirurgico o radiometabolico e la conseguente necessità del trattamento ormonale sostitutivo per tutta la vita [88]. Tuttavia, un regime a basso dosaggio a lungo termine richiede una buona aderenza, un follow-up regolare e una dose efficace più bassa possibile ( $\leq 5$  mg di MMI al giorno), in grado di mantenere stabilmente lo stato eutiroideo. Questa opzione, inoltre, non è applicabile in caso di gozzo di dimensioni significative [84].

#### ***1.1.6.1.4. Ruolo dei farmaci beta-bloccanti***

L'utilizzo di beta-bloccanti è utile nel trattamento iniziale della GD, prima della normalizzazione della funzione tiroidea; questi farmaci permettono di ridurre i sintomi adrenergici legati all'ipertiroidismo quali tremori, palpitazioni, tachicardia e intolleranza al caldo. Alcuni di questi farmaci possono ridurre la conversione del T4 in T3 nel tessuto periferico, ma solo a dosi elevate ( $> 160$  mg di propranololo). Non c'è prova di superiorità di un composto rispetto ad un altro. Le dosi classiche sono 40-160 mg di propranololo o 25-100 mg di atenololo. Il trattamento con beta-bloccanti si accompagna alle classiche controindicazioni per questa tipologia farmaci; in particolare, è necessario prestare attenzione nel caso di asma, insufficienza cardiaca congestizia, bradicardia e di fenomeno di Raynaud [84]. Nei pazienti asmatici è preferibile utilizzare farmaci beta-1 selettivi (atenololo, metoprololo) che, tuttavia, hanno un effetto limitato sulla desiodasi tiroidea, o farmaci calcio-antagonisti [76]. Non vi è alcun interesse a continuare il trattamento beta-bloccante dopo il recupero dello stato eutiroideo [84].

#### ***1.1.6.2. Trattamento con radioiodio nell'ipertiroidismo di Graves***

In Europa il radioiodio è indicato principalmente in caso di fallimento di un trattamento medico ben condotto, ma può anche essere utilizzato in prima linea. La scelta del medico dovrebbe tenere conto delle controindicazioni, assolute e relative.

Le controindicazioni assolute sono:

- gravidanza o ricerca di gravidanza nei 4-6 mesi successivi (essendo il tempo minimo per il recupero dello stato eutiroideo nel rispetto dei criteri di radioprotezione);

- allattamento al seno;
- nodulo tiroideo che all'esame citologico suggerisce un cancro alla tiroide;
- paziente incapace di rispettare le norme di radioprotezione.

Le controindicazioni relative includono:

- incontinenza urinaria;
- dialisi;
- gozzo compressivo o gozzo > 60–80 g;
- rischio di fallimento del trattamento: bassa fissazione della tiroide alla scintigrafia,
- orbitopatia grave e/o attiva (punteggio CAS  $\geq 3$ );
- progetto di gravidanza per i due anni successivi al trattamento, a causa dell'aumento del titolo dei TRAb in seguito al trattamento con radioisotopi [84].

#### ***1.1.6.2.1. Preparazione al trattamento***

Il trattamento con radioisotopi può causare un precoce e transitorio aggravamento dell'ipertiroidismo a causa dell'effetto citolitico delle radiazioni [113,114]. Secondo uno studio, ciò avviene nel 10-15% dei casi, ed è solitamente di entità moderata, senza alcun risvolto clinico. Le forme tireotossiche gravi sono rare e si verificano nello 0,3-0,5% dei casi [115].

Nelle forme sintomatiche e/o in caso di ipertiroidismo significativo, la preparazione al trattamento con beta-bloccanti dovrebbe essere sistematica se non controindicata, per migliorare il comfort e prevenire l'aggravamento dovuto al trattamento. La preparazione al RAI mediante ATD accelera il recupero dello stato eutiroideo e migliora la tolleranza al trattamento, evitando l'insorgenza di complicazioni durante la fase transitoria di aggravamento dell'ipertiroidismo. Il trattamento farmacologico antitiroideo associato al trattamento con radioiodio è consigliato soprattutto in pazienti fragili (anziani o con storia cardiovascolare) e/o in pazienti con complicanze dovute all'ipertiroidismo (in particolare cardiopatie) o in caso di tireotossicosi molto sintomatica o grave. Gli ATD, tuttavia, rischiano di comprometterne l'efficacia del trattamento con radioiodio riducendo l'assorbimento dello iodio e la produzione di radicali liberi, ritardando così il recupero dello stato eutiroideo e aumentando il tasso di fallimento [116–118]. In una metanalisi di Walter et al., si osserva che l'efficacia del trattamento al radioiodio è stata ridotta quando nei sette giorni precedenti o seguenti la somministrazione di radioiodio erano stati somministrati ATD, senza alcuna differenza tra i derivati del tiouracile e i derivati dell'imidazolo

(carbimazolo/MMI) [116]. L'associazione con ATD, inoltre, non è sempre attuabile, in particolare nei pazienti che hanno sviluppato severi effetti collaterali con il trattamento farmacologico oppure quando non sia differibile il ripristino dell'eutiroidismo. In tali casi, la somministrazione adiuvante con sali di litio incrementa il trapping del radioisotopo ed è in grado di migliorare l'efficacia del trattamento radiometabolico [119].

#### ***1.1.6.2.2. Modalità di dosaggio e somministrazione***

Il radioiodio è ampiamente utilizzato nella GD da molti anni, con efficacia e sicurezza dimostrate [120]. Eppure, le modalità di trattamento e, in particolare, il dosaggio rimangono controversi.

Vengono generalmente utilizzati due metodi di dosaggio: (1) ablativo, mediante stima dell'attività tiroidea standardizzata, con dose fissa per tutti i pazienti oppure adattamento approssimativo in base al volume della tiroide e alla fissazione stimata; oppure (2) aggiustato, con dosaggio basato sull'assorbimento a 4 e 24 ore dopo la somministrazione della dose test, combinato con il volume stimato della tiroide. Il metodo con aggiustamento della dose non sempre si traduce in una dose somministrata inferiore, talvolta la dose erogata può essere addirittura superiore alla dose fissa erogata con il trattamento ablativo [84,121]. L'interesse teorico dell'aggiustamento della dose è ottenere lo stato di eutiroidismo con una dose di radiazioni che segue il principio "ALARA" ("as low as reasonable achievable") [84]. La maggior parte degli studi in questo ambito sono stati inclusi in una revisione sistematica [122], che non ha riscontrato differenze significative tra i due approcci, sia in termini di raggiungimento dell'eutiroidismo ( $44 \pm 19\%$ ) che di cura dell'ipertiroidismo ( $73 \pm 14\%$ ). È anche utile sottolineare, tuttavia, che il trattamento con ablazione ad alte dosi ( $> 10-15$  mCi) ha raggiunto tassi di successo superiori all'80% [123,124].

#### ***1.1.6.2.3. Follow-up del trattamento con radioiodio***

La maggior parte dei pazienti progredisce verso l'ipotiroidismo dopo un periodo variabile di tempo e con un rischio crescente nel tempo [123,125]. Con la strategia ablativa a dose fissa, la maggior parte dei pazienti raggiunge l'ipotiroidismo entro tre mesi. Più raramente, l'ipotiroidismo può essere transitorio, con recupero secondario della funzione tiroidea e di stato eutiroidico o addirittura di recidiva di ipertiroidismo; ciò richiede un monitoraggio biologico sia precoce che prolungato [84]. L'insorgenza di ipotiroidismo può, in un numero non trascurabile di casi, essere ad insorgenza precoce, entro il primo mese dopo il trattamento

[125]. Se non trattato, può indurre una serie di sintomi quali astenia, aumento di peso, depressione, con compromissione della QoL [126] e, cosa ancora più importante, insorgenza o aggravamento della GO [127,128].

L'asse ipotalamo-ipofisi può richiedere alcune settimane per riprendersi e il TSH spesso rimane inibito per 4-6 settimane. Durante il follow-up precoce, il dosaggio del TSH dovrebbe essere associato al dosaggio dell'fT4, per evitare interpretazioni errate; successivamente, il monitoraggio può essere limitato al TSH [84].

#### ***1.1.6.2.4. Radioiodio e oftalmopatia***

Il trattamento con radioiodio aumenta il rischio di insorgenza o aggravamento dell'orbitopatia [128–131]. Una metanalisi eseguita nel 2016 includeva due studi randomizzati con un totale di 425 soggetti adulti affetti da GD, trattati con radioiodio oppure con ATD, con follow-up a due anni. Il rischio di insorgenza o aggravamento dell'orbitopatia è stato del 38% nel braccio trattato con radioiodio e del 19% nel braccio trattato con la terapia medica (RR= 1,94; IC 95%: 1,4–2,7) [132].

Il rischio sembra essere intrinseco, principalmente a causa dell'effetto citolitico delle radiazioni [127,128]. Ulteriori fattori di rischio includono anche il trattamento ritardato dell'ipotiroidismo iatrogeno e il livello di TRAb, ma soprattutto il fumo [129–131]. Nei fumatori l'orbitopatia è più frequente, più grave e più resistente al trattamento [128].

In pazienti ben selezionati (GO non infiammatoria lieve o moderata: punteggio CAS, 0 o 1) con uno stretto follow-up specialistico, il rischio è < 2%. L'orbitopatia, quindi, non controindica formalmente il trattamento con radioiodio, ma è necessario adottare precauzioni: informare il paziente, incoraggiare fortemente alla cessazione del fumo, richiedere il parere di uno specialista oftalmologico ed eseguire stretto follow-up per evitare l'ipotiroidismo [84].

Per la prevenzione dell'aggravamento viene generalmente consigliata l'associazione di corticosteroidi [127,130,133,134].

#### ***1.1.6.3. Trattamento chirurgico della malattia di Graves***

L'intervento chirurgico viene spesso eseguito in seconda linea, in seguito al fallimento del trattamento medico [84,135]. Le indicazioni all'intervento chirurgico nella GD comprendono controindicazioni, effetti avversi o fallimento del trattamento medico, controindicazioni per il RAI e preferenze del paziente [84]. L'intervento chirurgico dovrebbe

essere preferibilmente eseguito in stato eutiroideo, per evitare un episodio tireotossico acuto nel postoperatorio. Il RAI permette di raggiungere l'eutiroidismo entro 3-6 mesi, mentre l'intervento chirurgico lo fa immediatamente, risolvendo rapidamente i sintomi legati all'ipertiroidismo [135]. La chirurgia, inoltre, è preferibile al trattamento con radioiodio nell'orbitopatia e in caso di nodulo tiroideo sospetto all'ecografia e/o all'agoaspirato [84].

#### 1.1.6.4. Nuovi orizzonti terapeutici

Lo sviluppo delle conoscenze sulla patogenesi della GD ha consentito di evidenziare la perdita della tolleranza al TSH-R e l'azione dei TRAb come momenti fondamentali nello sviluppo della malattia e dell'ipertiroidismo che ne rappresenta la manifestazione centrale. Come conseguenza della migliore comprensione dei meccanismi patogenetici della malattia, sono in corso di sviluppo e/o di iniziale sperimentazione farmaci specificamente diretti contro diversi momenti patogenetici (*targeted therapies*) (**Figura 7**) [1,136].

**Figura 7.** Farmaci specificamente diretti contro diversi momenti patogenetici (*targeted therapies*) del morbo di Basedow in corso di sviluppo o di studio [88].



##### 1.1.6.4.1 Immunoterapia antigene-specifica

Per ripristinare la tolleranza immunologica, in diverse malattie autoimmuni è stata impiegata la tecnica di iniezioni ripetute di piccole e crescenti dosi di antigene solubile per ottenere risposte immuni tollerogeniche. Per evitare che la somministrazione dell'antigene possa causare un'esacerbazione della malattia, sono stati utilizzati, ad esempio nella sclerosi

multipla, piccoli peptidi sintetici chiamati apitopi (*antigen-processing independent epitopes*) simili ad epitopi processati dai linfociti T CD4+ [137]. In un modello animale di topi immunizzati con il TSH-R, la somministrazione di due apitopi immunodominanti derivati dalla sequenza del TSH-R prima dell'immunizzazione, determinava la soppressione della risposta dei linfociti T e della produzione dei TRAb [138]. In uno studio di fase 1 su 10 pazienti con ipertiroidismo da GD non trattato, dopo somministrazioni intradermiche ripetute di una mistura degli stessi due piccoli peptidi sintetici (ATX-GD-59), in dosi crescenti da 25 a 800 mg nell'arco di 8 settimane, con successivo mantenimento della dose piena per altre 10 settimane, 5 pazienti mostravano una normalizzazione e 2 una riduzione dei livelli di fT3, due pazienti rimanevano eutiroidei alla fine del trattamento, i TRAb si riducevano, anche se rimanevano elevati nella maggior parte dei pazienti. Il trattamento era ben tollerato [139]. Studi randomizzati, controllati con placebo, con diverse dosi e durata del trattamento saranno necessari per valutare l'effettiva efficacia di questo trattamento che, tuttavia, è di notevole interesse, in quanto antigene-specifico e non associato con una generalizzata immunosoppressione [88].

#### ***1.1.6.4.2. Blocco degli anticorpi stimolanti anti-recettore del TSH (TRAb)***

Poiché i TRAb sono i responsabili dell'incontrollata stimolazione della crescita e dell'iperfunzione tiroidea nella GD, bloccarne l'azione rappresenterebbe un passaggio fondamentale per il controllo dell'ipertiroidismo. Recentemente uno studio di fase 1 ha valutato l'efficacia di un anticorpo bloccante il recettore del TSH (denominato K1-70) in tre gruppi di 6 pazienti basedowiani trattati con una singola somministrazione intramuscolare o endovenosa di K1-70 in dosi variabili da 0,25 mg a 150 mg e seguiti successivamente per 100 giorni [140]. Dopo 4 settimane, la maggior parte dei pazienti, soprattutto nel gruppo trattato con le dosi più alte, progrediva verso l'ipotiroidismo con un miglioramento dei sintomi da ipertiroidismo (e anche da GO in due pazienti), con un effetto che persisteva in molti casi alla fine del periodo di osservazione. Come atteso i TRAb circolanti di tipo stimolante rimanevano elevati [140]. Questi risultati, anche se preliminari, indicano che il K1-70 potrebbe trattare sia l'ipertiroidismo che l'orbitopatia [88]. Piccole molecole che si legano ai domini transmembrana del TSH-R agendo come antagonisti o agonisti inversi (ANTAG-3, VA-K-14, S37a), hanno la potenzialità di essere utilizzati per la GD, ma i dati disponibili sono limitati a studi in vitro o in modelli animali [88,136].

#### ***1.1.6.4.3. Terapie dirette contro i linfociti B***

I linfociti B svolgono un ruolo chiave nella patogenesi della GD. Il rituximab è un anticorpo monoclonale che provoca una deplezione dei linfociti B positivi per l'antigene CD20. Inizialmente utilizzato per i linfomi non-Hodgkin, è stato successivamente impiegato per il trattamento di molte malattie autoimmuni. I dati relativi al suo utilizzo nel trattamento dell'ipertiroidismo basedowiano sono al momento limitati a due piccoli studi con risultati non particolarmente incoraggianti [88]. È, però, interessante riportare che un recente studio di 27 pazienti con ipertiroidismo giovanile (12–20 anni), notoriamente più soggetto a recidive dopo terapia antitiroidea, ha mostrato che l'associazione del rituximab al MMI si associava a una remissione dell'ipertiroidismo dopo un anno dall'interruzione del trattamento più alta (48%) rispetto a quella normalmente osservata nelle casistiche pediatriche [141]. Un approccio diverso può essere rappresentato dall'impiego di un anticorpo monoclonale, belimumab, che antagonizza il BAFF (fattore di attivazione delle cellule B), una citochina che, interagendo con recettori di superficie delle cellule B, ne favorisce l'attivazione, la differenziazione e la sopravvivenza [88,136]. Elevati livelli circolanti di BAFF sono stati riportati in pazienti con GD, soprattutto in presenza di GO (attiva o inattiva), con una riduzione a seguito del trattamento steroideo per l'orbitopatia [142]. Non sono al momento disponibili dati sull'utilizzo del belimumab nella GD [88]. L'interazione del recettore del tumor necrosis factor, CD40, localizzato sulla superficie delle APC e dei tireociti, con il suo ligando, CD154, transitoriamente espresso sulla superficie dei linfociti T attivati, è un segnale co-stimolatorio per la risposta immune adattativa, per lo sviluppo della memoria immunitaria e per la funzione dei linfociti B [1]. L'interruzione di questo segnale può essere rilevante per bloccare le reazioni autoimmuni che si verificano nella GD [88]. Iscalimab è un anticorpo monoclonale anti-CD40, che non ha, a differenza del rituximab, l'effetto di deplezione dei linfociti B. L'effetto di iscalimab, somministrato per via endovenosa (5 infusioni nell'arco di tre mesi) è stato studiato in uno studio aperto di fase 2 in 15 pazienti basedowiani (4 di nuova diagnosi e 15 con ipertiroidismo recidivato dopo terapia antitiroidea) [143]. Il trattamento portava a una normalizzazione dei livelli circolanti degli ormoni tiroidei in 7 pazienti (47%), mentre in 8 pazienti (53%) la risposta non era soddisfacente, i TRAb si riducevano, in diversa misura, in tutti i pazienti; 4 dei 7 pazienti inizialmente responsivi presentavano successivamente una recidiva, ma 3 pazienti risultavano eutiroidei alla fine del follow-up. Il trattamento era ben tollerato [143]. I dati sono, dunque, preliminari e richiedono studi randomizzati controllati multicentrici, ma si

potrebbe ipotizzare che, come per il rituximab nella GD giovanile, l'associazione di iscalimab e tionamidi possa migliorare l'efficacia del trattamento antitiroideo [88].

## **1.2. L-Carnitina**

La carnitina ( *$\beta$ -idrossi- $\gamma$ -trimetilamminobutirrato*), estratta per la prima volta dal muscolo scheletrico nel 1905, è un'ammina quaternaria presente in quasi tutti le specie animali, così come in diversi microrganismi e in alcune piante superiori [144]. Gli esseri umani e altri organismi superiori possono sintetizzare la L-Carnitina. In determinate condizioni, la richiesta di L-Carnitina può superare la capacità di un individuo di sintetizzarla, rendendola un micronutriente condizionatamente essenziale [144,145].

Può presentarsi in due forme enantiomeriche; mentre l'enantiomero "L" della carnitina svolge un ruolo importante nella produzione di energia, la D-Carnitina non è solo fisiologicamente inattiva ma ha anche un effetto di considerevole influenza tossica sui processi biochimici. Inoltre, la D-Carnitina è legata e trasportata dal sistema di trasporto attivo della L-Carnitina presente sulle membrane cellulari, diminuendo così la concentrazione di L-Carnitina all'interno della cellula e inibendo le reazioni L-specifiche [144].

La L-Carnitina è un nutriente essenziale per il metabolismo dei grassi; svolge la sua azione trasportando gli acidi grassi a catena lunga attivati dal citosol nei mitocondri, rendendoli disponibili per la  $\beta$ -ossidazione mitocondriale [146]. La L-Carnitina viene fornita all'organismo attraverso fonti esogene (dagli alimenti) e attraverso fonti endogene, cioè la biosintesi che richiede amminoacidi e una reazione enzimatica suddivisa in cinque fasi. In condizioni fisiologiche, gli esseri umani sani possono sintetizzare quantità sufficienti di L-Carnitina. Tuttavia, sono stati riportati casi di concentrazioni subnormali di L-Carnitina nel sangue a causa di difetti idiopatici nella sintesi della sostanza, come riscontrato in alcuni casi non comuni di pazienti in dialisi o come conseguenza in pazienti con funzionalità epatica o renale gravemente compromessa [144].

### **1.2.1. Sintesi endogena di L-Carnitina**

Nei mammiferi la L-Carnitina viene sintetizzata principalmente nel fegato, nei reni e, in alcune specie, nei testicoli e nel cervello, a partire dagli aminoacidi essenziali lisina e metionina, precursori finali per formare trimetillisina (TML) [147]. La disponibilità

dell'intermedio, la TML, limita la biosintesi della carnitina e la maggior parte delle riserve corporee di TML si trovano nelle proteine del muscolo scheletrico. Di conseguenza, il turnover proteico del muscolo scheletrico è considerato la fase limitante nella biosintesi della carnitina.

### **1.2.2. Omeostasi e fonti alimentari di L-Carnitina**

Poiché la concentrazione di carnitina nei tessuti è generalmente 20-50 volte superiore a quella del plasma e poiché, nell'uomo, solo il rene, il fegato e il cervello dispongono del pool enzimatico completo per sintetizzare carnitina, la maggior parte dei tessuti dipende dall'assorbimento di carnitina dal sangue tramite trasporto attivo. Sebbene l'esatta interazione dei tessuti e dei metaboliti coinvolti nella biosintesi della carnitina non siano del tutto chiari, è evidente che è necessario il trasporto dei metaboliti per completare il processo di sintesi [148,149].

Il trasporto della L-Carnitina è stato ampiamente studiato utilizzando animali e campioni di tessuti umani. Sono stati individuati sistemi sia Na<sup>+</sup>-dipendenti che Na<sup>+</sup>-indipendenti. Sono anche classificati come meccanismi di trasporto ad alta o bassa affinità ed entrambi i tipi possono funzionare parallelamente [148,149]. L'omeostasi intracellulare della carnitina è controllata da diversi trasportatori di membrana: i trasportatori di cationi organici (OCTN) che operano a livello dell'assorbimento intestinale e del riassorbimento renale della L-Carnitina, inoltre svolgono un ruolo importante nella distribuzione nei tessuti e nelle variazioni nelle velocità di trasporto. La L-Carnitina viene trasportata dal OCTN1 mitocondriale, dal OCTN2 plasmalemmale e dal OCTN3 perossisomiale. Tutti e tre i trasportatori sono membri della famiglia dei trasportatori di cationi organici/carnitina, e trasportano, quindi, non solo la carnitina ma anche una serie di xenobiotici e farmaci con diverse affinità [144,150].

OCTN2, fisiologicamente il più importante e il più conosciuto, è il trasportatore ad alta affinità che concentra la carnitina all'interno della cellula e funziona come trasportatore Na<sup>+</sup>-indipendente per altri cationi organici [144]. OCTN2 è espresso principalmente nel rene, dove è coinvolto nel riassorbimento della carnitina.

Sono noti diversi difetti in OCTN2, che causano carenza di carnitina cellulare e incapacità di metabolizzare gli acidi grassi. La forte espressione di OCTN2 nel cuore sottolinea il suo ruolo chiave nel supportare le fasi critiche della  $\beta$ -ossidazione per la produzione di energia miocardica e, quando carente, suggerisce il meccanismo fisiopatologico sottostante allo

sviluppo di cardiomiopatia ipertrofica e possibile cardiomiopatia dilatativa nell'insufficienza cardiaca congestizia allo stadio terminale [151]. Il contenuto di mRNA per OCTN2 delle cellule si riduce con l'invecchiamento [152] e anche per l'azione dei radicali liberi dell'ossigeno [153].

Più del 90% del pool totale di carnitina risiede nel muscolo scheletrico e miocardico, il resto si trova nel fegato, nei reni e in altri tessuti [144]. I muscoli scheletrici, serbatoio principale, sono caratterizzati da una concentrazione di L-Carnitina da 50 a 200 volte superiore a quella del plasma; nel sangue, in media, sono presenti concentrazioni di circa 41  $\mu\text{M/L}$  (nelle femmine) e 50  $\mu\text{M/L}$  (nei maschi) [154].

Il fabbisogno giornaliero di L-Carnitina ammonta a circa 15 mg, forniti all'organismo attraverso la biosintesi endogena e attraverso fonti esogene. Pertanto, l'omeostasi della carnitina viene mantenuta dall'assunzione alimentare e dalla gestione efficiente della carnitina da parte dell'organismo [155]. Fisiologicamente, il corpo umano adulto (~70 kg) può sintetizzare da 11 a 34 mg di L-Carnitina al giorno (160-480  $\mu\text{g/kg}$  di peso corporeo). Tuttavia, tale quantitativo può risultare insufficiente, in caso di stress e sforzo fisico, soprattutto nel caso di atleti con elevate prestazioni fisiche [144].

La maggior parte delle persone consuma carnitina in eccesso rispetto alle apparenti esigenze di mantenimento. Una dieta onnivora adeguatamente costruita fornisce circa il 75% del fabbisogno giornaliero di carnitina e solo il 25% deve provenire dalla sintesi endogena. La L-Carnitina è contenuta principalmente nella carne e nei latticini. La conoscenza delle concentrazioni di L-Carnitina nei diversi alimenti è utile quando è presente una carenza di tale sostanza ed è necessaria un'integrazione esogena [144]. La fonte primaria di L-Carnitina è la carne rossa, in particolare l'agnello e la carne di manzo, mentre un contenuto inferiore di carnitina si trova nel pesce, nel maiale, nel pollame e nei latticini. I prodotti di origine vegetale generalmente non sono buone fonti di carnitina; solo gli avocado e gli asparagi contengono notevoli quantità di carnitina [156].

La L-Carnitina viene assorbita dagli alimenti in un intervallo compreso tra il 50% e l'85% nel tratto alimentare e i residui vengono degradati dalla flora batterica dell'intestino crasso. All'interno degli enterociti, la carnitina viene trasportata attraverso le membrane tramite trasporto attivo [144].

Sebbene la biodisponibilità della L-Carnitina derivante dalla dieta sia piuttosto elevata, l'assorbimento derivante degli integratori alimentari a base di L-Carnitina è considerevolmente inferiore. La L-Carnitina supplementare viene assorbita principalmente per diffusione passiva [157].

Meno del 2% di L-Carnitina assorbita dal sistema viene escreta nelle urine, sotto forma di L-Carnitina, acetil-L-carnitina e altri esteri di acilcarnitina, e nella bile. Le perdite giornaliere sono minime (<60 mg/giorno) e si riducono a meno di 20 mg/giorno con una dieta priva di carne. La carnitina è liberamente filtrata nel glomerulo renale e successivamente circa il 95% viene riassorbito dal tubulo renale. Vari fattori fisiologici e fisiopatologici, nonché la dieta, influenzano il tasso di escrezione e riassorbimento della carnitina: nei casi di un ridotto assorbimento di L-Carnitina dal cibo, si riduce anche l'escrezione da parte dei reni [144].

### **1.2.3. Ruolo metabolico di L-Carnitina**

Gli acidi grassi a catena lunga costituiscono il substrato di base per il metabolismo energetico ossidativo nel miocardio. Dopo il trasporto attraverso la membrana cellulare, subiscono l'attivazione ad acil-CoA nel citoplasma o sulla membrana mitocondriale esterna. Anche se alcuni degli acidi grassi attivati vanno incontro ad esterificazione in trigliceridi, la maggior parte diventa un substrato per la  $\beta$ -ossidazione nei mitocondri. La funzione primaria della L-Carnitina è quella di consentire l'ingresso di acidi grassi esterificati, utili per la sintesi dell'ATP, all'interno della matrice mitocondriale, dove avviene la  $\beta$ -ossidazione. Il ruolo della carnitina a questo punto è fondamentale poiché è stato dimostrato che disturbi nell'assorbimento della L-Carnitina a carico delle cellule muscolari o cardiache può portare a miopatia e malattie cardiache. In generale, la carnitina funge da trasportatore di gruppi acilici. Gli acidi grassi a catena corta e media sono trasportati nella matrice mitocondriale senza alcuna necessità di azione della carnitina nel processo; i gruppi acilici degli acidi grassi a catena lunga, invece, sono trasportati esclusivamente sottoforma di esteri della carnitina da un trasportatore transmembrana chiamato translocasi, collocato sulla membrana mitocondriale interna. Nonostante questo ruolo apparentemente semplice, questa funzione è significativa sia per la  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi che per il mantenimento dell'acilCoA. Di per sé, gli esteri acil-CoA sono impermeabili alle membrane intracellulari. Il sistema della carnitina si è evoluto per consentire il trasporto attraverso queste membrane e, quindi, facilitare il loro ruolo metabolico [144].

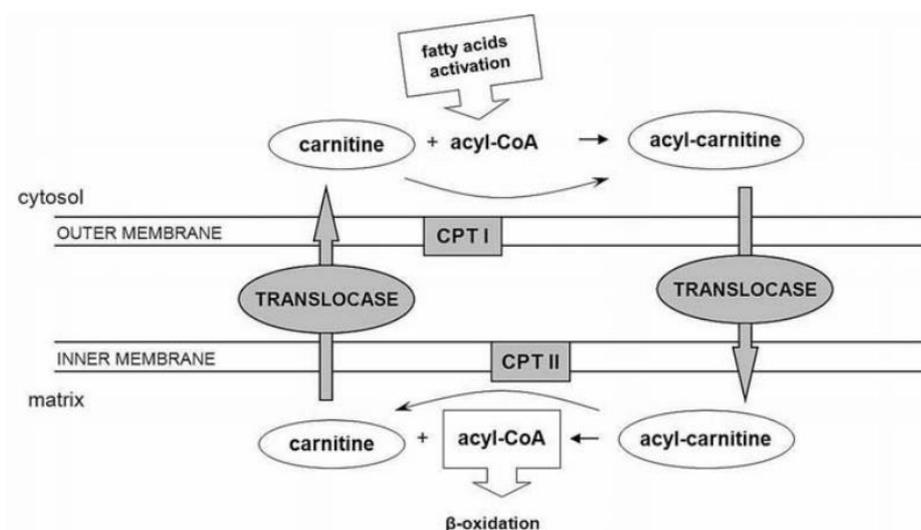
Le carnitina-aciltransferasi (CATs) sono una famiglia di enzimi ubiquitari fondamentali per l'omeostasi energetica e il metabolismo dei grassi. Le tre classi conosciute di CAT differiscono nella specificità del gruppo acilico, nella localizzazione subcellulare, nella distribuzione nei tessuti e nella funzione fisiologica. Le carnitina-palmitoil transferasi (CPT)

si trovano sia nella membrana mitocondriale esterna (CPT I) che nella matrice mitocondriale (CPT II) con una preferenza di substrato per acil-CoA a catena lunga [158,159].

La CPT I trasferisce i residui acilici a catena lunga attivati dall'acil-CoA alla carnitina.

La traslocasi della carnitina scambia acil-carnitina con carnitina attraverso la membrana mitocondriale interna. Sul lato interno della membrana mitocondriale interna, la CPT II catalizza la sintesi di acil-CoA a partire da l'acil-carnitina e dal pool di CoA presente nella matrice mitocondriale (**Figura 10**). Infine, l'acil-CoA subisce la  $\beta$ -ossidazione mitocondriale con rilascio di energia sotto forma di ATP. La carnitina abbassa il rapporto intramitocondriale tra acil-CoA e CoA e promuove la disintossicazione dagli esteri di acilCoA accumulati in pazienti con un metabolismo difettoso del glucosio o dell'ossidazione acilica [144].

**Figura 10.** Trasporto dipendente dalla carnitina di gruppi acilici a catena lunga attraverso la membrana mitocondriale [144].



### 1.3. Selenio

Il selenio (Se) è un metalloide (semi-metallo) ed è un micronutriente essenziale, importante per vari aspetti della salute umana, incluso quello del corretto metabolismo degli ormoni tiroidei, della salute cardiovascolare, della prevenzione della neurodegenerazione e del cancro e delle risposte immunitarie ottimali [160,161]. È naturalmente presente in quattro stati di ossidazione: selenato, selenito, selenio elementare e seleniuro, in ordine decrescente di stato redox [160,162]. Questi vengono convertiti da tutti i sistemi biologici in forme

organiche più biodisponibili, principalmente nei due seleno-amminioacidi, la selenocisteina (SeCys) e la selenometionina (SeMet) con successiva integrazione in 25 selenoproteine codificate dal genoma umano [160]. Il selenato e il selenito sono altamente solubili in acqua e noti per essere tossici per i sistemi biologici a concentrazioni relativamente basse. Al contrario, il selenio elementare è essenzialmente non tossico e altamente insolubile in acqua. Il seleniuro è altamente tossico e reattivo ma è facilmente ossidato a Se elementare [162]. Il selenio fu scoperto nel 1818 e le sue insolite proprietà elettriche e fotoelettriche attirarono immediatamente l'attenzione della comunità scientifica. La tossicità del Se cominciò a essere presa in considerazione in seguito un rapporto riguardante la morte di pazienti che avevano ricevuto overdose di selenato di sodio. Nel 1943, l'elemento stesso fu dichiarato cancerogeno, causando la fine di tutti gli usi terapeutici del Se. Diversi anni dopo il Se veniva ancora chiamato “il veleno essenziale” o “la tossina”, e veniva trattato con grande sospetto, nonostante fosse stato dimostrato che si trattava di un oligoelemento essenziale dal punto di vista nutrizionale. Al giorno d'oggi, la sua storia iniziale negativa influenza ancora le opinioni nei suoi confronti [162].

### **1.3.1. Omeostasi e fonti alimentari di Selenio**

La maggior parte dell'assunzione di Se deriva dalla dieta e il contenuto di Se di qualsiasi sistema alimentare è una conseguenza della sua presenza nel suolo. Di norma i terreni contengono 0,1-2 mg Se/kg [162] ma alcune aree del mondo, ad esempio Danimarca, Finlandia, Nuova Zelanda, Siberia orientale, Russia e alcune parti della Cina, sono note per avere terreni poveri di Se e, di conseguenza, basse quantità di Se nei loro sistemi alimentari. Al contrario, altre aree, ad esempio le Grandi Pianure degli Stati Uniti, Canada e parti dell'Irlanda, Colombia, Venezuela sono selenifere [163]. Il Se all'interno degli alimenti è presente essenzialmente in tracce e si trova in un'ampia varietà di fonti alimentari, tra cui cereali, verdure, frutti di mare, carne, latticini e noci [164].

Le assunzioni dietetiche di riferimento (DRI) ed i livelli di assunzione superiori tollerabili (UL) di Se variano nei diversi paesi del mondo. Ad esempio, nel Regno Unito, l'assunzione raccomandata è di 75 µg/giorno per gli uomini e 60 µg/giorno per le donne [160]. Tuttavia, secondo la European Food Safety Authority (EFSA), l'assunzione raccomandata di Se nella popolazione europea è inferiore, cioè di 55 µg/giorno (UL 300) [165], in linea con la Food and Nutrition Board (FNB) negli USA (UL 400) [166]. Al contrario, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) raccomanda l'assunzione di non più di 26 µg/giorno per le

donne e 34 µg/giorno per gli uomini [167], valori notevolmente inferiori a quelli raccomandati da altre organizzazioni menzionate in precedenza. Pertanto, è di fondamentale importanza stabilire informazioni coerenti sulla richiesta quotidiana di Se per la normale funzione corporea [160].

L'intervallo di Se sierico adeguato è ristretto (circa 90–120 µg/L, stimato in base all'attività GPx e alla concentrazione ematica di selenoproteine), e al di sotto e al di sopra di questo intervallo c'è il rischio di carenza e tossicità, rispettivamente, con possibili effetti negativi sulla salute [168]. Un'esposizione acuta a livelli elevati di Se può provocare ipotensione, difficoltà respiratoria e alito con odore di aglio. La tossicità da selenio, nota anche come selenosi, può verificarsi se l'assunzione di Se supera la soglia di 400 µg/giorno [169]. A concentrazioni ancora più elevate, il Se può diventare un pro-ossidante, portando a stress ossidativo e danni ai vari componenti cellulari [160]. Negli anni '60 nella provincia cinese di Hubei è stata descritta una segnalazione di selenosi cronica, apparentemente derivante da concentrazioni estremamente elevate di Se nelle riserve alimentari e negli ambienti locali. I risultati di questa esposizione cronica furono principalmente la perdita di capelli e unghie e solo raramente manifestazioni più gravi quali lesioni cutanee, epatomegalia, polineurite e disturbi gastrointestinali [170–172].

Il metabolismo del Se risulta essere molto complesso e composto da un gran numero di vie (*Figura II*) [165]. La forma principale di Se assunta con la dieta dagli esseri umani è la SeMet, sebbene altre forme di Se siano presenti negli alimenti [161]. Quando assunto sottoforma SeMet, oltre il 90 % del Se viene assorbito a livello intestinale [165,166]; quando assunto tramite composti inorganici come il selenato o anche il selenito sembra essere ben assorbito, ma viene trattenuto meno efficacemente [165,173].

I meccanismi di assorbimento dei diversi composti del Se non sono del tutto chiariti [173]. L'efficienza dell'assorbimento non sembra essere influenzata dallo stato del Se e non sembra svolgere un ruolo nella regolazione omeostatica del Se [165]. La SeMet e il selenito presentano un metabolismo simile per diversi giorni prima divergere a causa della maggiore escrezione urinaria di composti derivati dal selenito rispetto con quelli derivati dalla SeMet [174].

La SeMet è incorporata in modo non specifico nelle proteine, in particolare in organi con livelli elevati di velocità di sintesi proteica, come i muscoli scheletrici, i globuli rossi, il pancreas, il fegato, i reni, lo stomaco e la mucosa gastrointestinale, che consente l'immagazzinamento del Se [175]. Il Se dalla SeMet può essere mobilitato per i processi

metabolici attraverso la conversione di SeMet in SeCys mediante la trans-solfurazione nel fegato o nei reni [165].

Studi sull'omeostasi, che misurano l'escrezione fecale di Se dopo l'assunzione alimentare da diete controllate basate su alimenti convenzionali, hanno riscontrato un assorbimento apparente di Se di circa il 70 % in ragazze adolescenti sane (11–14 anni; assunzione media di 105–131 µg/giorno di Se per due settimane) [176] e uomini (20–45 anni; assunzione media di 47 µg/giorno di Se per 21 giorni) [177] una volta che i soggetti si sono equilibrati al livello dieta sperimentale. Altri due studi hanno riportato valori medi di assorbimento apparente dell'83% e del 95% in soggetti giovani sani (20–33 anni) che ricevevano quantità controllate di Se (93–137 µg/giorno) da una fonte alimentare ricca del micronutriente (gamberetti o carne e prodotti a base di carne di maiale), in aggiunta ad una dieta basale [178,179].

Nel plasma, le selenoproteine più abbondanti sono la selenoproteina P (SEPP1) e la glutazione perossidasi (GPx3), che in genere rappresentano rispettivamente circa il 30-60% e il 10-30% del Se plasmatico [174]. Il resto del Se plasmatico è costituito dalla SeMet nell'albumina e altre proteine e una frazione minore (< 3 %) da piccoli composti molecolari come i selenozuccheri [165,180]. La distribuzione relativa di Se tra questi diversi composti è influenzata dalla quantità e dalla natura chimica del Se nella dieta [180].

Il tasso di escrezione del Se è massimo entro 24 ore dall'ingestione; le vie di escrezioni del Se principali sono le urine e le feci [165,174].

I metaboliti urinari includono un selenozucchero metilato, la Se-metilN-acetilgalattosamina, che è il principale composto presente nelle urine con il normale apporto alimentare di Se [165,181]. Sono stati identificati anche altri metaboliti urinari minori, come la Se-metilnacetilglucosamina e la Se-metilselenoneina [181].

In seguito ad un apporto elevato, il Se in eccesso viene eliminato attraverso l'urina come ione trimetilselenonio e attraverso il fiato come dimetilseleniuro [165].

La frazione di Se escreta nelle urine dipende, tra l'altro, dalla natura chimica del Se ingerito. In uno studio di integrazione che prevedeva l'assunzione di alimenti ricchi di Se da parte soggetti adulti, con una dose media di 200–600 µg/giorno di Se in diverse forme, si è osservata un'escrezione urinaria media del  $60 \pm 26$  %, quando il Se veniva fornito come SeMet e del  $41 \pm 15$  % quando fornito come selenito di sodio [180]. Non è del tutto chiarito se la sintesi dei metaboliti escretori sia un processo passivo, guidato dalla quantità di Se che non può essere accolta dalla via di sintesi delle selenoproteine, o se coinvolga una regolazione attiva [182].



anione (selenolato), proprietà che gli consente di effettuare reazioni redox biologiche [183,184] ed è la ragione della sua presenza nei siti catalitici degli enzimi redox come la glutatione perossidasi (GPx), la tioredossina reduttasi (TrxR) e la formiato deidrogenasi [162,185].

Il ruolo delle selenoproteine nell'ambito dell'immunità viene espletato tramite l'attivazione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule che guidano le risposte immunitarie innate e adattive. Il Se alimentare e le selenoproteine non sono solo importanti per avviare o migliorare l'immunità, ma sono coinvolti anche nell'immunoregolazione, che è fondamentale per prevenire risposte eccessive che possono portare all'autoimmunità o all'infiammazione cronica [161].

A livello cellulare, il Se alimentare può influenzare varie funzioni effettrici dei leucociti, tra cui aderenza, migrazione, fagocitosi e secrezione di citochine. Diversi membri della famiglia delle selenoproteine regolano o sono regolati dal tono redox cellulare, che è un modulatore cruciale della segnalazione e della funzione delle cellule immunitarie. Ci sono anche collegamenti importanti tra selenoproteine e flusso di calcio ( $Ca^{2+}$ ), importante per l'attivazione ottimale delle cellule immunitarie [161].

## **1.4. L-Carnitina e Selenio nel Morbo di Basedow**

### **1.4.1. L-Carnitina e funzione tiroidea**

La L-Carnitina è una molecola sicura, poiché il suo uso clinico non ha riportato tossicità, teratogenicità, controindicazioni o interazioni con altri farmaci [186–188].

Un gruppo di autori tedeschi condusse studi clinici cardine già nel 1959 in un numero molto limitato di pazienti con GD, utilizzando una miscela dei due isomeri (L- e D-Carnitina) [189].

La prima paziente era una donna di 53 anni costretta a letto da una GD molto grave accompagnata da nervosismo, insonnia, perdita di peso, sudorazione, tachicardia e GO. Il tasso metabolico basale (BMR) era +82% e le venne inizialmente somministrato 1 g/giorno di D, L-Carnitina. Dopo 10 giorni, il BMR risultava invariato, mentre nei successivi 7 giorni era sceso al +59%. Cinque settimane dopo l'inizio della somministrazione di carnitina, il BMR era ancora al +50% e gli autori decisero di passare alla somministrazione di L-Carnitina naturale. Dopo soli 10 giorni il BMR si era rapidamente ridotto a +8% con

associato miglioramento del benessere generale e della frequenza cardiaca. La fibrillazione atriale era scomparsa e la frequenza cardiaca era di 80-90 BPM. Per dimostrare che il miglioramento era dovuto alla L-Carnitina, la somministrazione della sostanza fu sospesa a partire dalla settima settimana dal ricovero. Il BMR salì al +39%, ma dopo il rechallenge con L-Carnitina scese nuovamente al +18% [189,190].

Nella Letteratura inglese, i primi tre pazienti ipertiroidei trattati con carnitina in monoterapia furono segnalati a metà degli anni '60 [191]. Gli autori osservarono che i pazienti erano diventati clinicamente eutiroidei senza alcun cambiamento consistente nei test di funzionalità tiroidea o riduzione dell'assorbimento di radioiodio tiroideo [188], supportando così l'ipotesi che l'effetto antitiroideo della carnitina è piuttosto un antagonismo periferico dell'ormone tiroideo rispetto ad un'inibizione diretta della funzione della ghiandola [188,192]. Ciò è in accordo con alcuni esperimenti condotti tramite coltura di tessuti umani, nei quali si è osservato che la L-Carnitina inibisce sia l'ingresso cellulare che, in misura maggiore, l'ingresso nucleare di entrambi gli ormoni tiroidei, T3 e T4 [186].

Questi dati suggeriscono che la carnitina è un antagonista periferico dell'ormone tiroideo, con un sito di inibizione che si trova in corrispondenza o nei pressi dell'involucro nucleare, poiché l'azione degli ormoni tiroidei è mediata dall'occupazione di specifici recettori nucleari, con successiva transattivazione di alcuni geni, e poiché la disponibilità di questi ormoni per i recettori è governata fundamentalmente dal loro ingresso e dalla loro uscita dalle cellule [186].

Il primo studio clinico controllato che valuta l'elevato valore antagonizzante della L-Carnitina nei confronti di livelli elevati di ormoni tiroidei è stato condotto in 50 donne sottoposte a terapia TSH-soppressiva, tramite assunzione di l-T4 ( $\geq 2,0$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  di peso corporeo/giorno) [188], per noduli tiroidei citologicamente benigni che hanno ricevuto un trattamento simultaneo per sei mesi con placebo ( $n = 10$ ), o per determinati periodi di tempo con L-Carnitina (2 g/die o 4 g/die per testare la dipendenza dalla dose) [187]. Sia la valutazione clinica approfondita che la valutazione biochimica hanno dimostrato effetti positivi, ad eccezione dell'osteocalcina, che risulta ulteriormente aumentata durante la somministrazione di L-Carnitina. TSH, fT3 e fT4 sierici sono rimasti invariati durante tutto il periodo del processo, della durata di 180 giorni. Pertanto, non è stato riscontrato alcun antagonismo da parte della carnitina sul feedback negativo che gli ormoni tiroidei esercitano sull'ormone di rilascio della tireotropina (TRH)/TSH. In aggiunta ai neuroni ipotalamici produttori di TRH e al TSH ipofisario, anche gli osteoblasti erano refrattari all'effetto antagonizzante dell'ormone tiroideo della L-Carnitina. Quindi, la L-Carnitina ha sinergizzato

con l'ormone tiroideo sugli osteoblasti per aumentare le concentrazioni sieriche di osteocalcina [187,190].

Casi più recenti di forme gravi di ipertiroidismo correlato alla GD, sono stati trattati con successo con l'integrazione di L-Carnitina [190,193]. Recentemente, uno studio pilota ha indicato i benefici dell'assunzione di una combinazione di L-Carnitina e di Se nell'ipertiroidismo subclinico; in questo studio è stato inoltre osservato che, dopo un mese di trattamento con L-Carnitina e Se, gli ormoni tiroidei e gli autoanticorpi sono rimasti all'interno del loro intervallo di normalità. Tuttavia, una volta interrotto il trattamento, i sintomi sono ricomparsi ed il profilo ormonale è peggiorato nel 60% dei casi rispetto al basale [194].

Un razionale, che potrebbe spiegare l'effetto benefico dell'integrazione di L-Carnitina nei pazienti ipertiroidei, è il fatto che l'aumento dei livelli degli ormoni tiroidei consuma i depositi tissutali della stessa L-Carnitina [195], ulteriormente confermato dal riscontro di diminuite concentrazioni di carnitina nei muscoli scheletrici dei pazienti ipertiroidei, ripristinate in seguito al recupero dell'eutiroidismo [190].

#### **1.4.2. Selenio e funziona tiroidea**

La ghiandola tiroidea è l'organo con il più alto contenuto di Se per unità tissutale, il quale si accumula nelle selenoproteine dove è presente come SeCys [168]. I tireociti esprimono un certo numero di selenoproteine, inclusi gli isoenzimi deiiodinasi (iodotironina deiiodinasi di tipo 1 (D1) e D2; D3 non è espresso nei tireociti), membri della famiglia della glutatione perossidasi (GPx1, GPx3 e GPx4), e della tioredossina reduttasi (TrxR1, TrxR2 e TrxR3), selenoproteina 15 (SELENOF), selenoproteina P (SELENOP), selenoproteina M (SELENOM) e selenoproteina S (SELENOS) (*Figura 12*) [196].

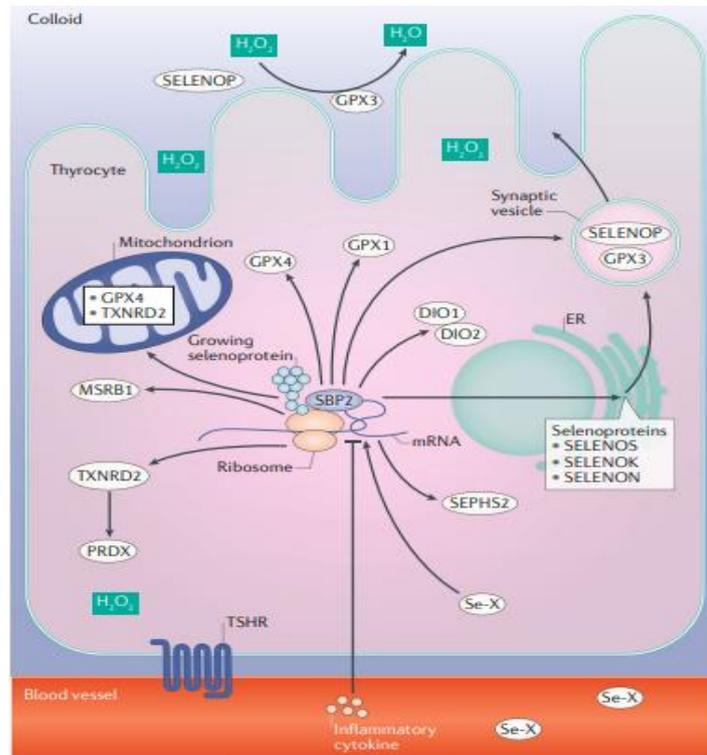
Nello specifico, queste proteine svolgono un ruolo chiave nel metabolismo ormonale e una potente attività antinfiammatoria ed antiossidante diretta contro i radicali liberi generati durante la produzione degli ormoni tiroidei [168,169,196].

Le prime selenoproteine identificate sono state le GPx, che proteggono le cellule dai danni dei radicali liberi dell'ossigeno [168]; GPx3 è secreto nella parte apicale della membrana del tireocita, dove degrada l' $H_2O_2$  in eccesso, utilizzato dalla TPO per la iodurazione dei residui tirosilici della tireoglobulina e per l'accoppiamento con iodotirosina, in acqua. [197].

GPx1 protegge il compartimento intracellulare dall'eccesso di  $H_2O_2$  che potrebbe diffondersi nei tireociti, mentre GPx4 degrada gli idroperossidi lipidici sia nei mitocondri che in tutte le

membrane cellulari [197,198]. TrxR è considerata un potente composto antiossidante, coinvolto nella regolazione di diversi fattori di trascrizione (ad esempio, NF-Kb, Ref-1, P53).

**Figura 12.** Ruolo delle selenoproteine all'interno della ghiandola tiroidea [196].



Le tre isoforme della deiodinasi (D1, D2 e D3) sono strettamente legate alla regolazione degli ormoni tiroidei e si trovano praticamente in tutti i tessuti dell'organismo [168]. Le deiodinasi sono selenoproteine integrali di membrana, formate da un singolo dominio transmembrana, che formano strutture dimeriche. SeCys si trova nel sito attivo dei tre enzimi, nella parte N-terminale della molecola, ed è cruciale per l'attacco nucleofilo che si verifica durante la deiodinazione [199]. I tre enzimi hanno localizzazioni cellulari diverse, a seconda del loro ruolo funzionale, poiché D1 e D3 sono a livello della membrana plasmatica, mentre D2 è a livello della membrana del reticolo endoplasmatico [200]. Il T4 è il principale prodotto della tiroide e viene convertito in triiodotironina (T3) da D1 e D2 mediante deiodinazione dell'anello esterno delle molecole di T4. T3 è considerato l'ormone biologicamente attivo, mentre T4 è principalmente un pro-ormone. Sia T3 che T4 possono essere inattivati mediante deiodinazione dell'anello interno da parte di D3 e, in minima parte, da parte di D1, con formazione di prodotti catabolici inattivi come T3 inverso (rT3) e T2, rispettivamente [201]. Un ruolo importante di D3 è, quindi, quello di proteggere le cellule

sensibili, come il tessuto fetale, la placenta e il sistema nervoso centrale da concentrazioni eccessive di T3 [196]. In condizioni fisiologiche, il ruolo dei tre enzimi è quello di mantenere l'omeostasi degli ormoni tiroidei e la loro attività nell'organismo. In particolare, D1 è responsabile della regolazione dei livelli di ormoni in circolo, mentre D2 e D3 sono coinvolti nel controllo locale della concentrazione intracellulare di T3 [202]. Praticamente tutti i tessuti del corpo ricevono lo stesso segnale dal T3 circolante; tuttavia, la risposta biologica e la conversione da T4 a T3 dipende principalmente dalle attività D2 e D3 nei tessuti bersaglio, in accordo con la richiesta metabolica locale [168].

SELENOS è una delle numerose selenoproteine situato nel RE. Questa proteina è coinvolta nel controllo della risposta infiammatoria nel RE mediante retrotraslocazione di proteine mal ripiegate dal lume del RE al citosol, dove vengono degradate attraverso il proteasoma. Inoltre, SELENOS protegge dalla trascrizione di diversi geni che codificano per i fattori proinfiammatori e citochine coinvolti nella patogenesi delle tiroiditi autoimmuni croniche (AIT) [196,203].

È noto che i pazienti affetti da malattie tiroidee, tra cui tiroidite autoimmune e struma, presentano livelli ridotti di Se [204]. I pazienti con GD di nuova diagnosi spesso presentano bassi livelli di Se, rispetto ai controlli [168,205]. Inoltre, la GD in remissione (in soggetti seguiti per 20,1 mesi) è associata a livelli sierici di Se più elevati ( $>120 \mu\text{g/L}$ ), inversamente correlati al livello di TRAb, suggerendo effetti benefici del Se sul processo autoimmune tiroideo e sugli esiti della GD [205,206]. Di conseguenza, molti studi hanno tentato valutare la supplementazione di Se come co-trattamento con farmaci tradizionali in pazienti con GD [168]. I dati disponibili indicano che l'integrazione di Se può potenziare l'effetto dei farmaci antitiroidei (ad es. metimazolo) in pazienti con GD ricorrente, abbassando i livelli di TRAb verso la normalizzazione, sebbene altri studi non abbiano riscontrato effetti significativi né sul decorso clinico né su parametri sierologici (ad es. rapporto  $\text{fT3/fT4}$ ), TRAb, prevalenza di GO da moderata a grave, volume della tiroide, tasso di remissione [207–210]. In questo contesto, una recente revisione sistematica e meta-analisi che include 10 studi randomizzati, caratterizzati da un periodo di integrazione di Se di 3 o 6 mesi, ha rivelato effetti clinicamente e statisticamente significativi sui livelli di  $\text{fT4}$ ,  $\text{fT3}$ , TSH e TRAb nei pazienti con GD, mentre, al contrario, il regime di integrazione di Se di 9 mesi non ha dimostrato di essere più efficace [211]. Questi risultati, incoerenti e apparentemente contraddittori, sono probabilmente attribuibili alle differenze tra gli studi, come durata del periodo di trattamento e follow-up, dimensione del campione, eterogeneità dei pazienti, stadio della malattia e variabilità nello stato del Se, spesso a seconda della zona geografica. Inoltre, gli studi

generalmente non misuravano i livelli basali di Se, sebbene l'integrazione di Se non fornisca alcun beneficio se l'assunzione con la dieta e, quindi, i livelli sierici sono adeguati, mentre è probabilmente più efficace nei pazienti con deficit di Se [168].

Uno studio trasversale del 2019 ha dimostrato che la carenza di Se aumenta il rischio di ipertiroidismo, sia dovuto a GD che a gozzo nodulare [212], ma i livelli di TRAb e la proliferazione delle cellule T non sono stati influenzati dall'integrazione di Se. La differenza nel rischio di ipertiroidismo era presente solo nei pazienti di sesso maschile, suggerendo la presenza di un dimorfismo sessuale in relazione allo stato del Se ed al rischio di patologie tiroidee [212]. Questo potenziale dimorfismo è particolarmente rilevante alla luce della preponderanza di donne e ragazze tra i pazienti affetti da malattie autoimmuni della tiroide [196].

Dal momento che tra i soggetti affetti da GD, la sottopopolazione con GO presenta livelli di Se mediamente più bassi rispetto ai soggetti senza orbitopatia e la carenza grave di Se è associata a un'orbitopatia più grave, il problema dell'integrazione di Se nei pazienti con GO ha suscitato grande interesse [213,214]. Uno studio caso-controllo ha rilevato che le concentrazioni plasmatiche di Se risultano inferiori nei pazienti affetti da GO rispetto a quelle rilevate nei pazienti affetti dalla sola GD [215], aumentando la possibilità che la carenza di Se possa costituire un fattore di rischio indipendente per la GO [196]. Tuttavia, in uno studio retrospettivo successivo, non sono state trovate associazioni significative tra lo stato del Se e la gravità o l'attività di GO [216]. Alcuni effetti attraverso i quali Se può influenzare la GO sono legati alle sue azioni antiossidanti e comprendono la riduzione della proliferazione e della secrezione di citochine proinfiammatorie nei fibroblasti orbitali e il rilascio di acido ialuronico [217].

Alla luce dei risultati disponibili, la raccomandazione per l'uso del Se nei casi lievi di GO (ma non moderati/severi) è stata confermata nelle linee guida 2021 dell'EUGOGO per selenito di sodio (200 µg al giorno per 6 mesi), o SeMet (100 µg/giorno), per ottenere un tasso di miglioramento più elevato sia nella QoL nella GO che negli outcome oftalmici complessivi, nonché un tasso inferiore di progressione verso una GO più grave [58].

## **2. Obiettivo dello studio**

Lo studio ha come scopo quello di valutare l'effetto della somministrazione contemporanea dei farmaci tireostatici e di un integratore (Tiroxil 0.4) contenente 500 mg di L-Carnitina e 83 µg di Selenio in pazienti ipertiroidei, con Morbo di Graves. In particolare, l'obiettivo è quello di stabilire se tale co-somministrazione possa essere più efficace della sola terapia con antitiroideo nel ripristinare un corretto quadro ormonale, negativizzare gli anticorpi stimolanti (antirecettore TSH, TRAb) e nel controllare la sintomatologia associata, migliorando la qualità della vita dei pazienti trattati.

## **3. Pazienti e Metodi**

### **3.1. Popolazione e disegno dello studio**

Si tratta di uno studio sperimentale interventistico multicentrico prospettico randomizzato su pazienti con diagnosi di ipertiroidismo conclamato o subclinico sintomatico su base autoimmune secondario a Morbo di Graves, che abbiano ricevuto indicazione ad avviare la terapia tireostatica. I centri coinvolti nello studio sono la SCDU (Struttura Complessa a Direzione Universitaria) Endocrinologia dell'AOU (Azienda Ospedaliera Universitaria) "Maggiore della Carità" di Novara e la SCDU Endocrinologia, Diabetologia e Metabolismo dell'AOU "Città della Salute e della Scienza" di Torino.

Il protocollo prevede l'arruolamento di 60 pazienti a partire dal 2 Gennaio 2023 fino al 31 Maggio 2024. I dati preliminari dello studio considerati nel presente elaborato includono 32 pazienti, reclutati e seguiti con regolare follow-up ogni 2 mesi, dal 2 Gennaio 2023 al 31 Gennaio 2024. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico di entrambi i centri e tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato prima di essere arruolati.

I criteri di inclusione sono:

- Età  $\geq$  18anni;
- Presa visione e firma del consenso informato e del modulo di consenso al trattamento dei dati;

- Diagnosi di Morbo di Graves con alterazione della funzione tiroidea per la quale è necessario avviare la terapia tireostatica (ipertiroidismo conclamato o subclinico sintomatico).

Mentre, i criteri di esclusione sono:

- Qualunque condizione medica acuta o cronica instabile e/o inadeguatamente controllata o psichiatrica, o abuso di sostanze stupefacenti o alcool;
- Donne con gravidanza in atto;
- Trattamento con terapia interferente (amiodarone, litio, TKI, interferone).

Una volta arruolati, i pazienti hanno ricevuto un codice alfanumerico identificativo specifico per centro, cosicché i dati sono poi risultati pseudoanonimizzati. I pazienti sono stati quindi assegnati ai due bracci di studio secondo randomizzazione semplice: i pazienti con codice identificativo dispari sono stati definiti “casi” e trattati con combinazione di Terapia Tireostatica (Metimazolo o Propiltiouracile, in base all’indicazione clinica) e Tiroxil 0.4 (integratore combinato di Selenio ed L-Carnitina), mentre i pazienti con codice pari sono stati assegnati al gruppo trattato con sola terapia tireostatica e definiti “controlli”.

Per valutare l’endpoint dello studio sono stati utilizzati i seguenti strumenti:

- Dati anamnestici e antropometrici: peso, altezza, BMI, abitudine tabagica, pregresse patologie cardiovascolari e diagnosi di depressione clinica o stati d’ansia
- Valutazione biochimica del compenso ormonale e del titolo anticorpale (TSH, fT3, fT4, TRAb)
- Questionario di valutazione soggettiva sui sintomi dell’ipertiroidismo e sulla qualità della vita

Per ciascun paziente è stato valutato il profilo tiroideo ed il titolo anticorpale dei TRAb al basale e durante tutte le visite di follow-up (ogni 2 mesi). Nel contesto di ciascuna visita, è stata inoltre richiesta la compilazione del questionario sulla qualità di vita.

Lo studio ed il trattamento dei pazienti sono terminati alla normalizzazione della funzione tiroidea (TSH, fT3 e fT4 nel range di normalità secondo il nostro laboratorio), all’invio del paziente a terapia definitiva (tiroidectomia totale o terapia con iodio radioattivo), in caso di accertamento di stato di gravidanza, e comunque al raggiungimento dei 18 mesi di trattamento.

I dati dello studio sono stati raccolti mediante Case Report Forms (CRF) e informatizzati mediante l’utilizzo di maschere appositamente realizzate con Excel (Microsoft Corporation).

## 3.2. Metodi

### 3.2.1. Parametri antropometrici

Il **peso** è stato rilevato con un'approssimazione di 0.1 kg utilizzando una bilancia “Wunder Sa.bi. S.r.l.”, appositamente tarata a 0.0 Kg al momento della misurazione, mentre l'**altezza** è stata misurata con un'approssimazione di 0.1 cm utilizzando uno statimetro di Herpenden fisso “HOLTAIN LIMITED - Crymych, Dyfed”. È stato quindi calcolato il BMI (Body Mass Index), espresso come peso (chilogrammi)/ [altezza (metri) al quadrato].

### 3.2.2. Test biochimici e dosaggi immunoenzimatici

I livelli sierici di TSH, fT4 e fT3 sono stati misurati tramite dosaggio immunoenzimatico in chemiluminescenza mediante sistema Immulite 2000 (DPC, Los Angeles, CA). Per il dosaggio del TSH, la metodica utilizza una procedura a “sandwich”, che si basa su due anticorpi, uno diretto verso la subunità  $\alpha$  e l'altro verso la subunità  $\beta$  della molecola glicoproteica eterodimerica del TSH. Nel caso invece di fT4 e fT3, è stata utilizzata una procedura in fase solida di tipo “competitivo”. L'fT4 e l'fT3 legati al tracciante, che competono con gli ormoni presenti nel siero del soggetto, vengono sostituiti da molecole “analoghe” alla tiroxina e alla triiodotironina, legate ad un tracciante sufficientemente simile all'ormone endogeno da consentirgli di competere con l'antigene. I range di riferimento considerati sono 0,4-4,0  $\mu$ UI/mL per il TSH, 7,8–19 ng/L per l'fT4 e 1,8-4,2 pg/mL per l'fT3. Inoltre, sempre mediante chemiluminescenza, sono stati dosati i livelli plasmatici di TRAb, utilizzando mediante sistema Immulite 2000 TSI Assay (GBA, Siemens Healthcare Laboratory Diagnostics, Tarrytown NY, USA); i valori di normalità considerati sono < 1.75 IU/L. Per entrambi i parametri è stato utilizzato l'analizzatore “ADVIA Centaur” – Siemens.

### 3.2.3. Questionario

Il questionario utilizzato comprende 10 domini circa la sintomatologia soggettiva dell'ipertiroidismo e la qualità della vita percepita:

- 1) Palpitazioni
- 2) Nervosismo
- 3) Tremori
- 4) Sbalzi d'umore

- 5) Ansia
- 6) Eccessiva sudorazione
- 7) Intolleranza al caldo
- 8) Insonnia
- 9) Difficoltà respiratorie
- 10) Riduzione della concentrazione

Per ciascun dominio il paziente può scegliere tra le seguenti risposte:

- 1) Assente
- 2) Poche volte (per l'insonnia si intende una media di 1-2 volte alla settimana)
- 3) Frequente (per l'insonnia si intende una media di 3-4 volte alla settimana)
- 4) Costante

### **3.3. Analisi statistiche**

I dati sono stati espressi come mediana e range interquartile, numero assoluto o percentuale. La distribuzione per la normalità delle variabili è stata analizzata attraverso il test di Shapiro-Wilk. Differenze tra le variabili categoriche sono state analizzate con il test esatto di Fisher o con il test del  $\chi^2$ , mentre il test U di Mann-Whitney è stato utilizzato per confrontare le variabili continue.

L'analisi delle distribuzioni delle variabili continue inter-gruppo nei diversi tempi in studio è stata effettuata tramite analisi della varianza per ranghi a due vie di Friedman. Il confronto inter-gruppo per le variabili categoriche è stato effettuato mediante test Q di Cochran.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando SPSS per Windows versione 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). La significatività statistica standard è stata posta al 5%.

## 4. Risultati

### 4.1. Caratteristiche della popolazione al basale

Ad oggi sono stati inclusi nello studio un totale di 32 pazienti (16 casi, 16 controlli) con diagnosi di ipertiroidismo conclamato o subclinico sintomatico su base autoimmune secondario a Morbo di Graves, che abbiano ricevuto indicazione ad avviare la terapia tireostatica e afferenti alla SCU (Struttura Complessa a Direzione Universitaria) Endocrinologia dell'AOU (Azienda Ospedaliera Universitaria) "Maggiore della Carità" di Novara ed alla SCU Endocrinologia, Diabetologia e Metabolismo dell'AOU "Città della Salute e della Scienza" di Torino.

Le caratteristiche cliniche ed anamnestiche al basale dei due gruppi in studio sono riassunte nella **Tabella 2**. La maggior parte dei pazienti è di sesso femminile (24/32, 75,0%), con un rapporto M:F di 1:3. La mediana dell'età alla diagnosi è risultata essere di 51 (IQR, 32-59). Dal punto di vista anamnestico sono stati indagati l'abitudine tabagica, la presenza di pregresse malattie cardiovascolari e la presenza di una diagnosi di depressione clinica o stati d'ansia. I pazienti fumatori sono risultati essere il 18,8%, gli ex fumatori il 31,2% e i non fumatori il 50,0%. Per quanto riguarda le pregresse malattie cardiovascolari, ne è risultato affetto il 15,6% dei pazienti, mentre una diagnosi di depressione clinica o stato d'ansia è presente nel 12,5% dei pazienti.

Al momento della diagnosi, la maggior parte dei pazienti era normopeso (84,4%), mentre 5 pazienti (15,6%) presentavano un quadro di sovrappeso (2 pazienti) o obesità (3 pazienti).

Dal punto di vista clinico, 6 pazienti presentavano esoftalmo (18,8%), di cui 3 di grado lieve, 2 di grado moderato e un solo paziente di grado severo.

Tutti i pazienti presentavano un quadro di ipertiroidismo conclamato associato a positività dei TRAb, con valore mediano di 8,5 (IQR, 4,5-16,2). In tutti i casi è stata avviata la terapia tireostatica con metimazolo (mediana 15,0 mg, IQR 10,0-15,0 mg).

Dividendo la popolazione nei due gruppi (Casi: terapia tireostatica + integratore combinato di Selenio ed L-Carnitina; Controlli: sola terapia tireostatica), non sono emerse differenze significative in termini di sesso, età, abitudine tabagica, anamnesi positiva per patologie cardiovascolari e diagnosi di depressione clinica o stati d'ansia. Inoltre, i due gruppi sono risultati comparabili per dati antropometrici, presenza di esoftalmo, funzione tiroidea e livelli di TRAb alla diagnosi. Infine, la dose iniziale di metimazolo prescritta è stata sovrapponibile nei due gruppi.

**Tabella 2.** Caratteristiche anamnestiche e cliniche al basale della popolazione totale e suddivisa nei 2 gruppi in studio (Casi e Controlli).

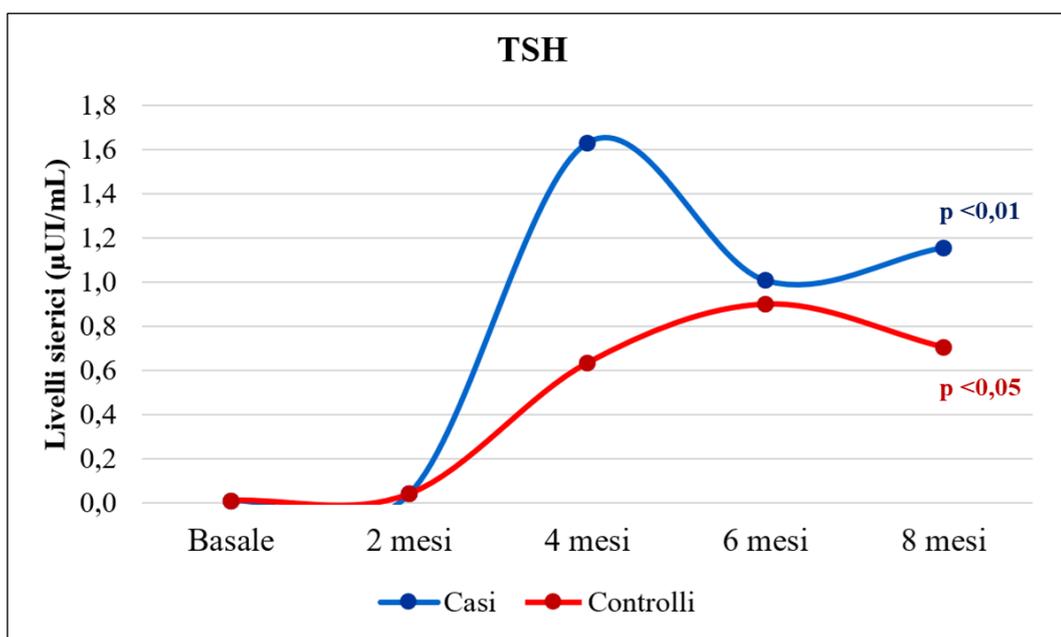
Parametri			Popolazione Totale (n=32) N (%)	Casi (n=16) N (%)	Controlli (n=16) N (%)	p value
Dati anagrafici	Sesso	M	8 (25,0)	3 (18,8)	5 (31,3)	0,68
		F	24 (75,0)	13 (81,2)	11 (68,7)	
	Età (anni) (mediana, IQR)		51 (32-59)	52 (41-54)	51 (30-66)	0,97
Dati anamnestici	Fumatore	Si	6 (18,8)	4 (25,0)	2 (12,5)	0,59
		No	16 (50,0)	8 (50,0)	8 (50,0)	
		Ex	10 (31,2)	4 (25,0)	6 (37,5)	
	Patologie CV	Si	5 (15,6)	1 (6,3)	4 (25,0)	0,33
		No	27 (84,4)	15 (93,7)	12 (75,0)	
	Depressione stati d'ansia	Si	4 (12,5)	1 (6,3)	3 (18,8)	0,60
No		28 (87,5)	15 (93,7)	13 (81,2)		
Dati antropometrici (mediana, IQR)	Altezza (cm)		165 (159-170)	165 (158-169)	167 (160-170)	0,40
	Peso (kg)		62,0 (53,8-72,0)	60,0 (53,8-66,0)	64,0 (55,6-72,8)	0,51
	BMI (kg/m <sup>2</sup> )		22,7 (20,7-24,6)	22,8 (20,8-24,7)	22,6 (20,7-24,3)	1,00
Dati clinici e laboratoristici (mediana, IQR)	Esoftalmo	Si	6 (18,8)	4 (25,0)	2 (12,5)	0,65
		No	26 (81,2)	12 (75,0)	14 (87,5)	
	TSH (μUI/mL)		0,008 (0,008-0,008)	0,008 (0,008-0,008)	0,008 (0,007-0,009)	0,98
	fT4 (ng/L)		23,0 (18,4-29,5)	23,0 (16,0-27,9)	23,0 (19,5-29,6)	0,86
	fT3 (pg/mL)		8,00 (6,05-14,85)	8,50 (6,15-14,75)	7,80 (5,70-14,85)	0,65
	TRAb (UI/L)		10,10 (5,76-17,00)	9,75 (5,95-15,15)	10,1 (4,50-20,0)	0,61
Posologia di metimazolo prescritta alla diagnosi (mg)			15,0 (10,0-15,0)	15,0 (10,0-16,3)	15,0 (13,8- 15,0)	0,67

I dati sono espressi come mediana e IQR o numero assoluto e percentuale. Il confronto tra i gruppi è stato effettuato con il test esatto di Fisher per le variabili categoriche e con il test di Mann-Whitney U per le variabili continue.

## 4.2. Follow-up e outcome

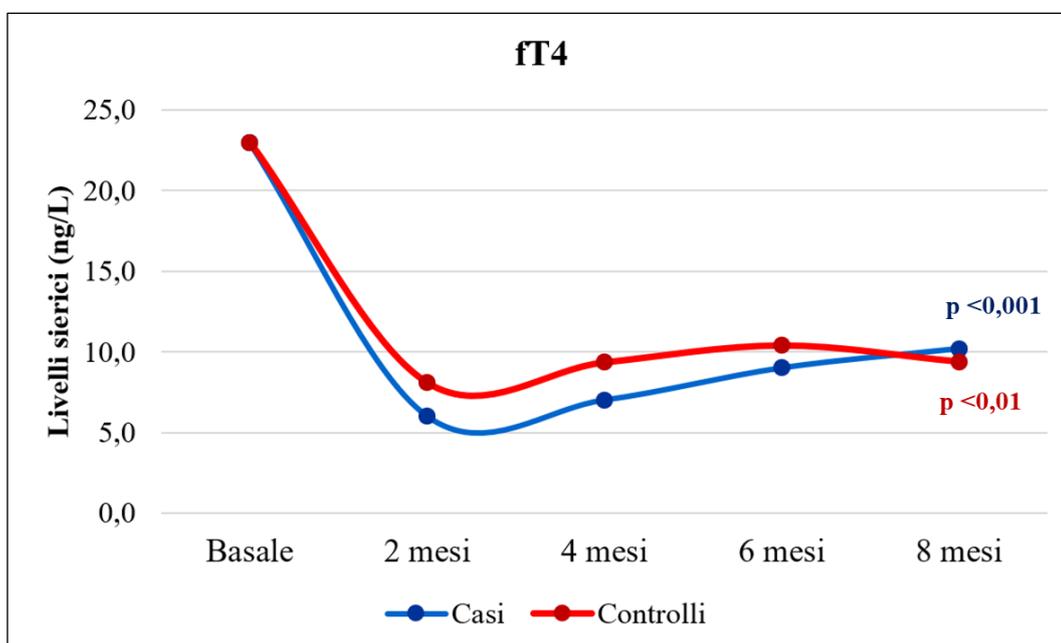
Le *figure 13, 14 e 15* mostrano l'andamento dei parametri di funzionalità tiroidea nei diversi tempi in studio (non sono stati rappresentati i dati a 10 e 12 mesi per scarsa numerosità campionaria). Durante le visite di follow-up, si è osservato un progressivo miglioramento dei parametri tiroidei senza differenze statisticamente significative alle analisi di confronto tra i due gruppi. Per ciascun gruppo, sono stati confrontati i valori di TSH, fT4 e fT3 nei diversi tempi. In entrambi i gruppi, ma soprattutto nel gruppo trattato con Selenio e L-Carnitina in associazione alla terapia tireostatica, si è osservato un incremento significativo dei livelli di TSH (casi:  $p < 0,01$ ; controlli:  $p < 0,05$ ) ed un concomitante decremento delle concentrazioni sieriche di fT4 (casi:  $p < 0,001$ ; controlli:  $p < 0,01$ ) e fT3 (casi:  $p < 0,01$ ; controlli:  $p < 0,05$ ).

**Figura 13.** Valori mediani di TSH nei diversi tempi in studio per ciascuno dei due gruppi.



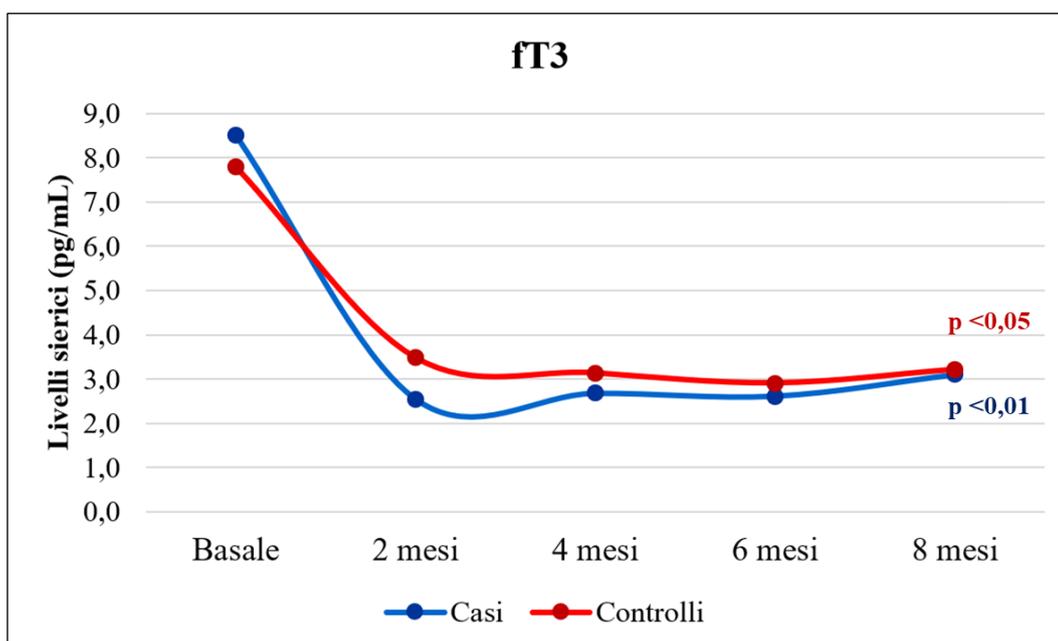
I p-value riportati ai lati delle due curve sono relativi alle analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (test di Friedman).

**Figura 14.** Valori mediani di fT4 nei diversi tempi in studio per ciascuno dei due gruppi.



I p-value riportati ai lati delle 2 curve sono relativi alle analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (test di Friedman).

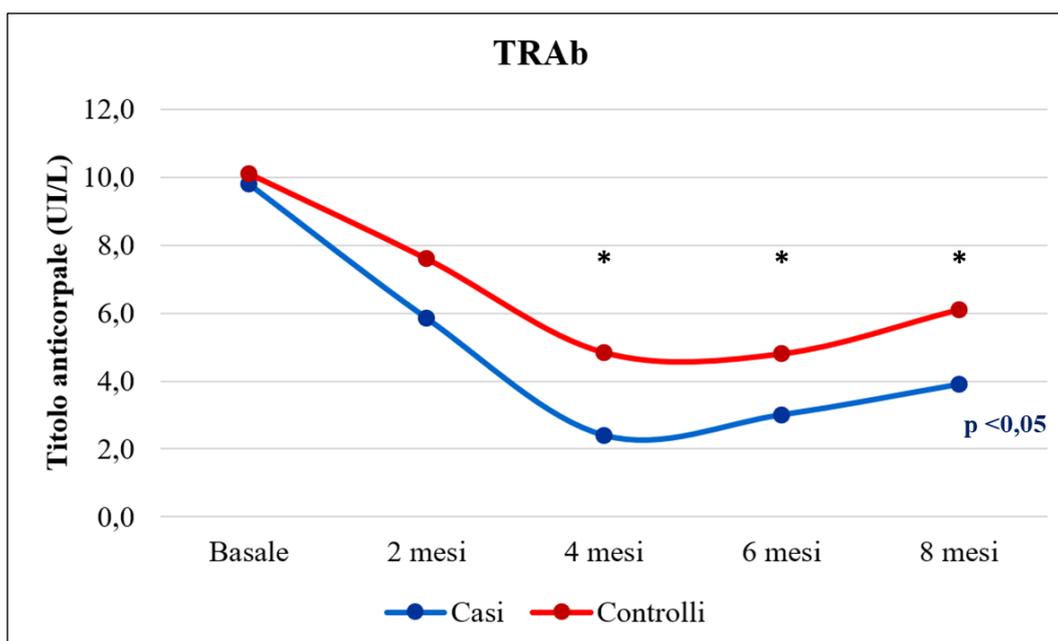
**Figura 15.** Valori mediani di fT3 nei diversi tempi in studio per ciascuno dei due gruppi.



I p-value riportati ai lati delle 2 curve sono relativi alle analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (test di Friedman).

La **figura 16** mostra l'andamento del titolo anticorpale nei diversi tempi in studio. La riduzione dei livelli di TRAb è stata maggiore nei casi rispetto ai controlli, con una differenza statisticamente significativa a 4, 6 e 8 mesi dalla diagnosi ( $p < 0.05$ ).

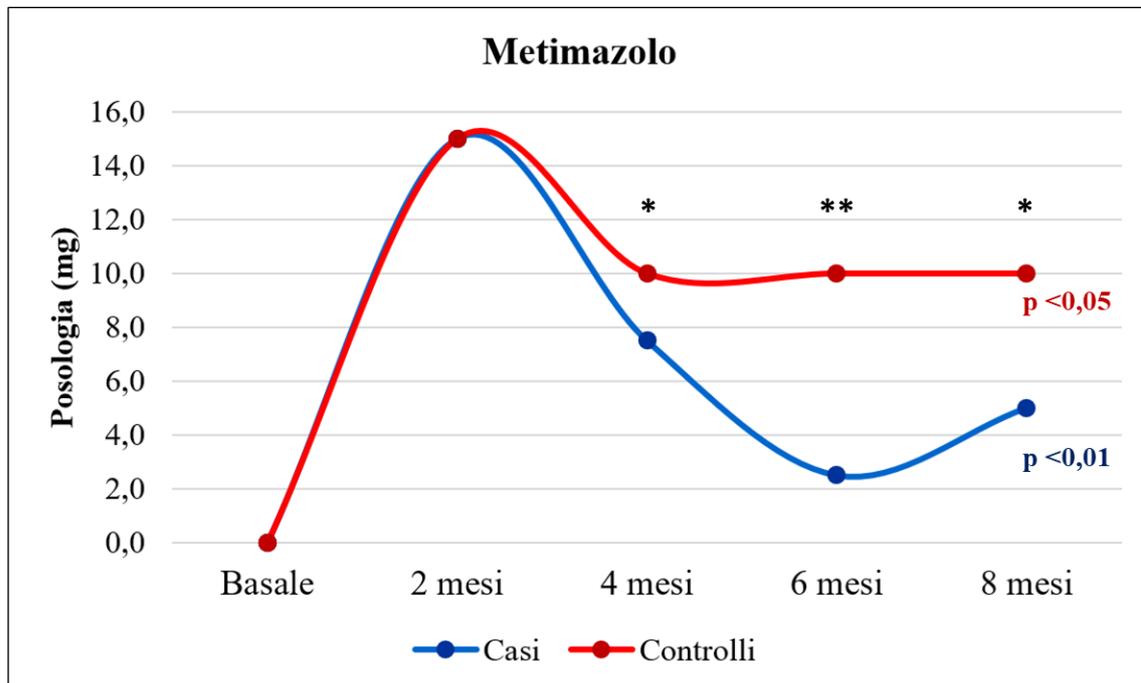
**Figura 16.** Valori mediani dei TRAb nei diversi tempi in studio per ciascuno dei due gruppi.



\* $p < 0,05$  (confronto tra i due gruppi, test U di Mann-Whitney). I p-value riportati ai lati delle 2 curve sono relativi alle analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (test di Friedman).

Per quanto riguarda la terapia tireostatica prescritta nel corso dello studio, i pazienti che hanno assunto l'integrazione di L-Carnitina e Selenio in aggiunta alla terapia tireostatica, hanno avuto necessità di una dose significativamente inferiore di metimazolo rispetto ai pazienti in sola terapia tireostatica a 4 ( $p<0,05$ ), 6 ( $p<0,01$ ) e 8 mesi ( $p<0,05$ ) dalla diagnosi (**Figura 17**). Nel corso dei mesi, inoltre, la dose di metimazolo è stata ridotta maggiormente nel gruppo che assumeva anche L-Carnitina e Selenio (casi:  $p<0,01$ ; controlli:  $p<0,05$ ).

**Figura 17.** Valori mediani della posologia di metimazolo prescritta nei diversi tempi in studio per ciascuno dei due gruppi.



\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  (confronto tra i due gruppi, test U di Mann-Whitney). I p-value riportati ai lati delle 2 curve sono relativi alle analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (test di Friedman).

La **Tabella 3** riassume l'outcome della popolazione totale e dei due gruppi analizzati separatamente. In 7 pazienti (21,9%) è stata osservata una remissione completa di malattia con recupero della normale funzione tiroidea e negativizzazione dei TRAb, la maggior parte dei quali apparteneva al gruppo trattato con terapia tireostatica e integratore combinato di Selenio e L-Carnitina (casi 37,5% vs controlli 6,2%,  $p=0,03$ ). Nel gruppo dei casi, 2 pazienti hanno avuto una remissione di malattia entro 6 mesi dalla diagnosi, mentre i rimanenti 4 pazienti entro il 10-12esimo mese dalla diagnosi. L'unico paziente del gruppo controlli è andato in remissione di malattia al quarto mese dalla diagnosi.

Un solo paziente, appartenente al gruppo dei casi, è stato indirizzato a valutazione chirurgica entro 6 mesi dalla diagnosi per essere sottoposto a tiroidectomia totale a causa di una scarsa tolleranza alla terapia tireostatica.

Due pazienti, uno per gruppo, sono stati sottoposti a terapia radiometabolica (RAI) entro 8 mesi dalla diagnosi per scarsa responsività alla terapia tireostatica e controindicazioni all'intervento chirurgico.

Risultano ancora in follow-up un totale di 15 pazienti (46,9%), di cui 6 casi e 9 controlli. Attualmente, 5 pazienti (1 caso e 4 controlli) hanno effettuato la valutazione a 4 mesi dalla diagnosi, 2 pazienti (1 caso e 1 controllo) la valutazione a 6 mesi, un controllo la valutazione a 8 mesi, 2 pazienti del gruppo di controllo la valutazione a 10 mesi e 5 pazienti (4 casi e 1 controllo) la valutazione a 12 mesi dalla diagnosi.

Infine, un totale di 7 pazienti (21,9%) è stato perso al follow-up (2 casi e 5 controlli).

*Tabella 3. Outcome della popolazione totale e suddivisa nei 2 gruppi in studio (Casi e Controlli).*

<b>Outcome</b>	<b>Popolazione Totale (n=32) N (%)</b>	<b>Casi (n=16) N (%)</b>	<b>Controlli (n=16) N (%)</b>	<b>P value</b>
Remissione di malattia	7 (21,9)	<b>6 (37,5)</b>	<b>1 (6,2)</b>	<b>0,03</b>
Inviati a chirurgia	1 (3,1)	1 (6,2)	0 (0,0)	0,31
Inviati a RAI	2 (6,2)	1 (6,2)	1 (6,2)	1,00
Follow-up ancora in corso	15 (46,9)	6 (37,5)	9 (56,3)	0,29
Persi al follow-up	7 (21,9)	2 (12,5)	5 (31,3)	0,20

*I dati sono espressi come numero assoluto e percentuale. Il confronto tra i gruppi è stato effettuato con il test esatto di Fisher.*

### **4.3. Qualità della vita**

Il questionario relativo alla sintomatologia soggettiva dell'ipertiroidismo ed alla qualità della vita percepita è stato somministrato a tutti i pazienti in studio.

Al basale, la maggior parte dei pazienti riportava di percepire in modo costante o frequente almeno due tra i seguenti sintomi: palpitazioni, nervosismo, tremori, sbalzi d'umore, ansia, eccessiva sudorazione, intolleranza al caldo, insonnia, difficoltà respiratorie e riduzione della concentrazione.

Le palpitazioni sono risultate essere il sintomo maggiormente percepito in modo costante o frequente (23 pazienti, 71,9%), seguito da eccessiva sudorazione (21 pazienti, 65,6%), nervosismo (19 pazienti, 59,4%), ansia (18 pazienti, 56,3%), tremori e intolleranza al caldo

(17 pazienti, 53,1%), sbalzi d'umore e insonnia (15 pazienti, 46,9%), riduzione della concentrazione (14 pazienti, 43,8%) e, infine, difficoltà respiratorie (13 pazienti, 40,6%).

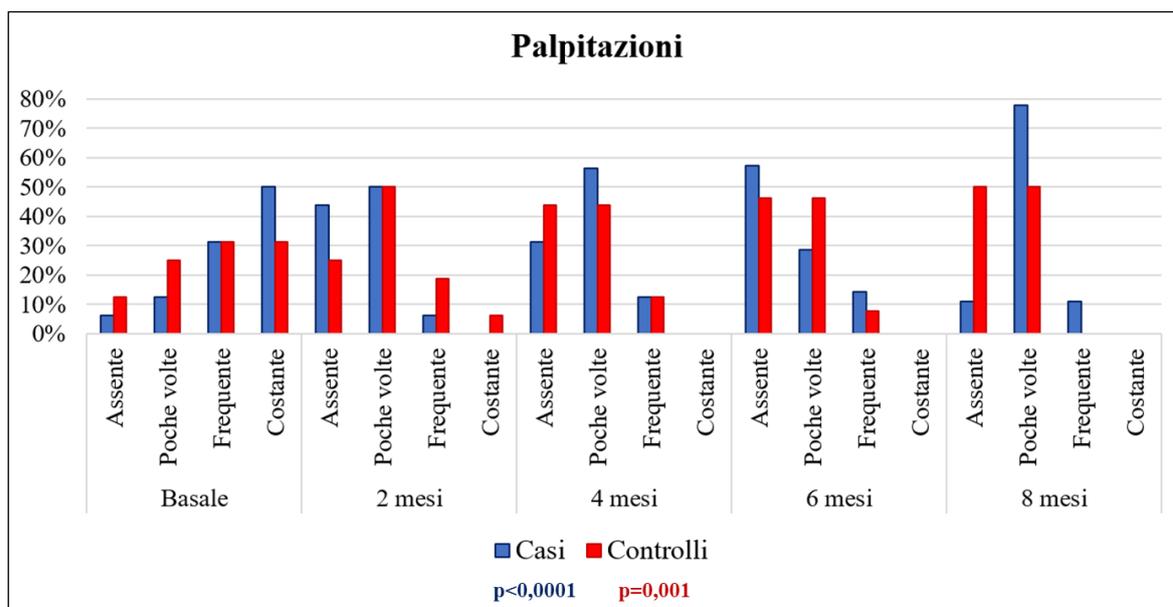
Le **figure 18-27** riportano i grafici relativi alla prevalenza della sintomatologia soggettiva e della qualità di vita percepita nei soggetti coinvolti nello studio ai diversi tempi.

Al basale, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa in termini di prevalenza della sintomatologia nei due gruppi in studio.

Analizzando la risposta al trattamento nei diversi tempi, i pazienti trattati con Selenio e L-Carnitina in associazione con metimazolo presentavano una prevalenza significativamente inferiore di nervosismo ( $p < 0,01$ ) e ansia ( $p < 0,05$ ) a 2 mesi dall'inizio del trattamento, rispetto ai pazienti in sola terapia tireostatica. Inoltre, una prevalenza significativamente inferiore di insonnia ( $p < 0,05$ ) ed intolleranza al caldo ( $p < 0,05$ ) è stata osservata nei casi rispetto ai controlli, rispettivamente a 6 e 8 mesi dall'inizio del trattamento.

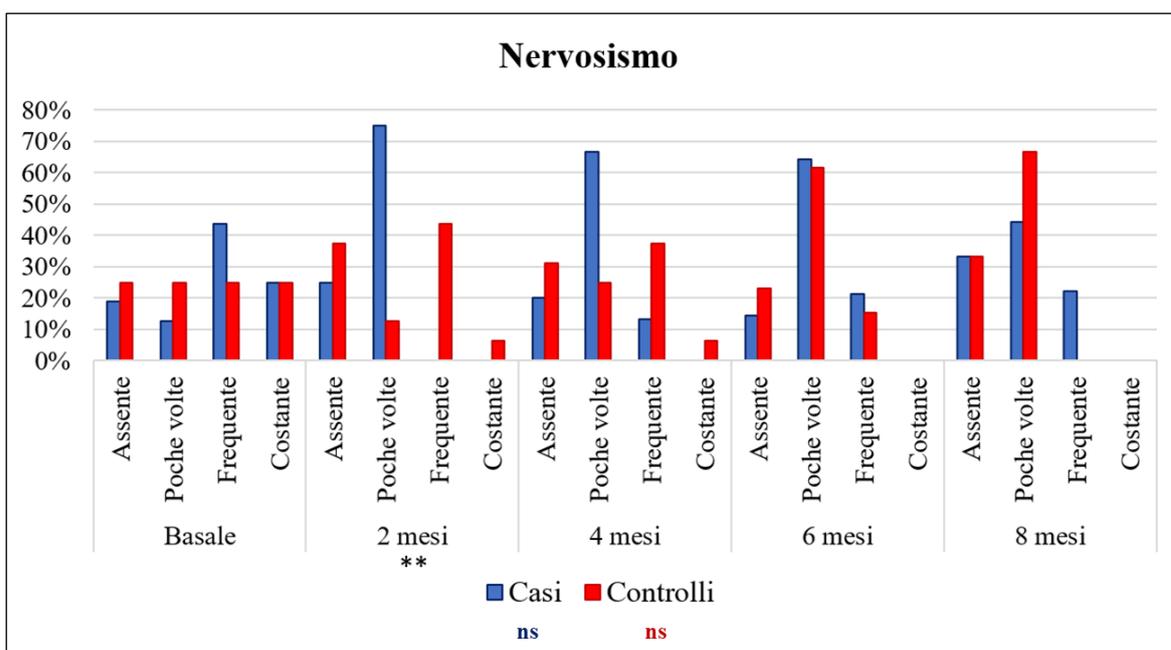
Nel corso dei mesi, sia nei casi che nei controlli, è stato osservato un miglioramento della sintomatologia percepita dai pazienti. In particolare, un miglioramento significativo è stato osservato per il sintomo palpitazioni, più marcato nei casi rispetto ai controlli (casi:  $p < 0,0001$ ; controlli:  $p = 0,001$ ). Nel caso invece della sintomatologia comprendente tremori, ansia ed eccessiva sudorazione, è stato osservato un significativo miglioramento nel tempo solo nel gruppo trattato con Selenio e L-Carnitina in associazione alla terapia tireostatica ( $p < 0,01$ ).

**Figura 18.** Prevalenza del sintomo palpitazioni nei due gruppi e nei diversi tempi.



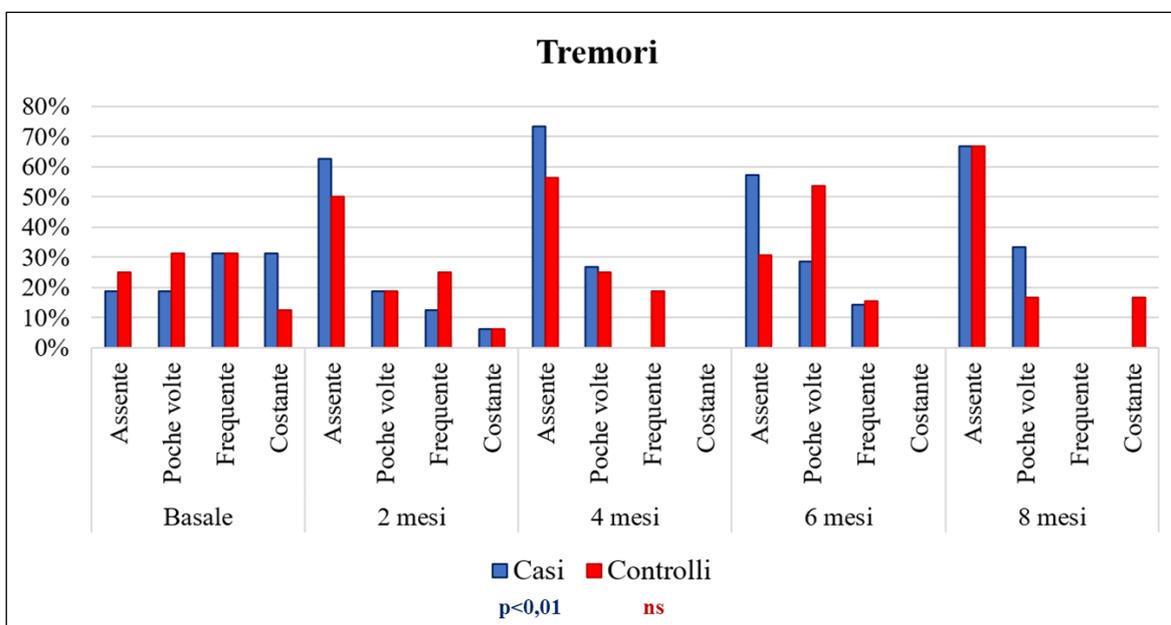
*I p-value riportati sotto la legenda sono relativi alle analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (Test Q di Cochran).*

**Figura 19.** Prevalenza del sintomo nervosismo nei due gruppi e nei diversi tempi.



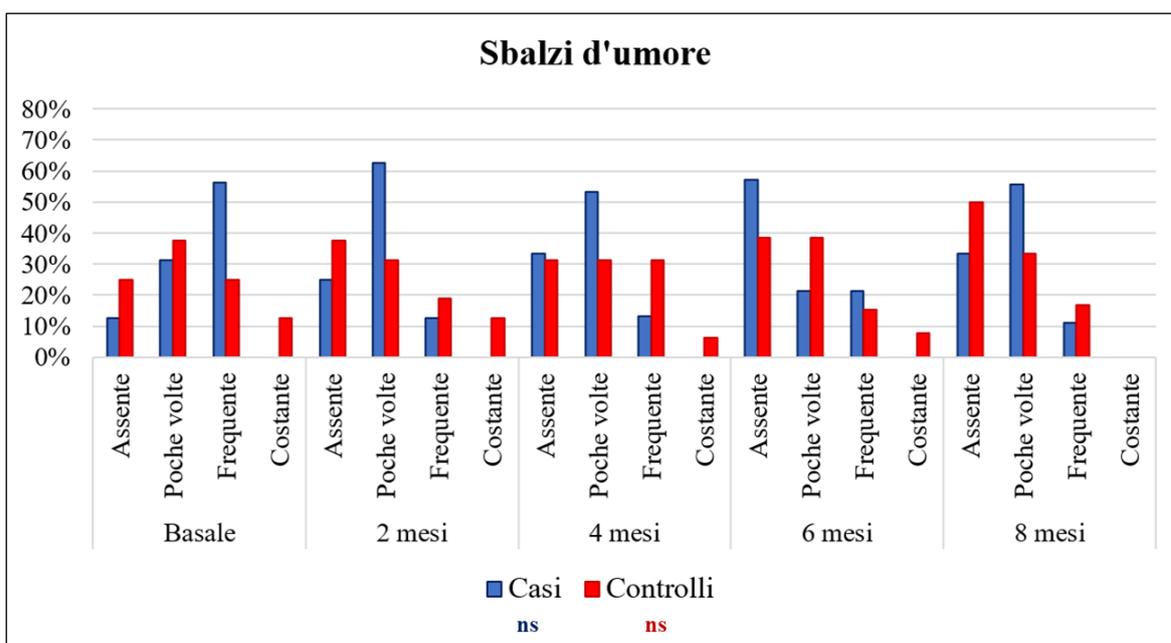
**\*\*** $p < 0,01$  (confronto tra i due gruppi, test del  $\chi^2$ ). L'abbreviazione ns (non significativo) riportata sotto la legenda è relativa all'analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (Test Q di Cochran).

**Figura 20.** Prevalenza del sintomo nervosismo nei due gruppi e nei diversi tempi.



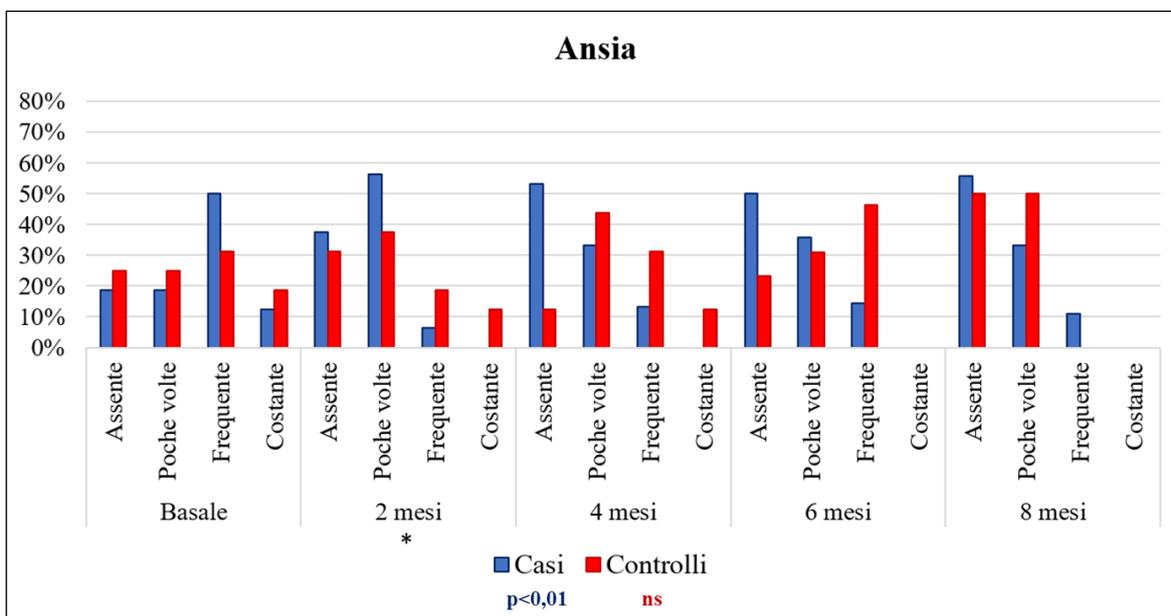
Il p-value e l'abbreviazione ns (non significativo) riportati sotto la legenda sono relativi alle analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (Test Q di Cochran).

**Figura 21.** Prevalenza del sintomo sbalzi d'umore nei due gruppi e nei diversi tempi.



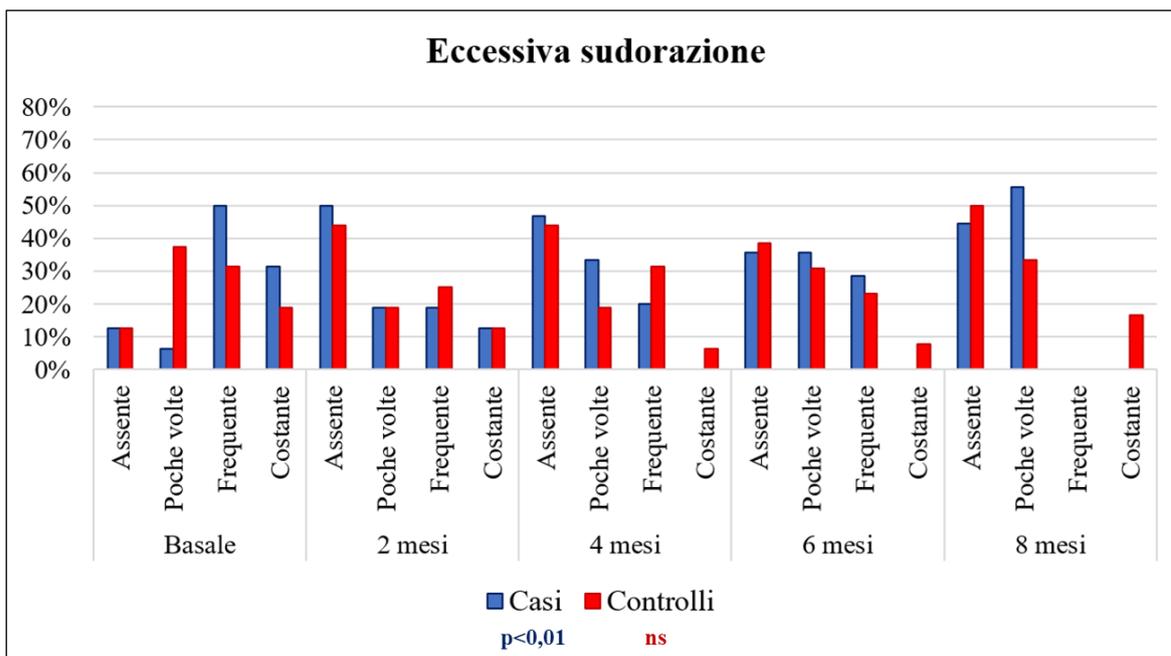
L'abbreviazione *ns* (non significativo) riportata sotto la legenda è relativa all'analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (Test Q di Cochran).

**Figura 22.** Prevalenza del sintomo ansia nei due gruppi e nei diversi tempi.



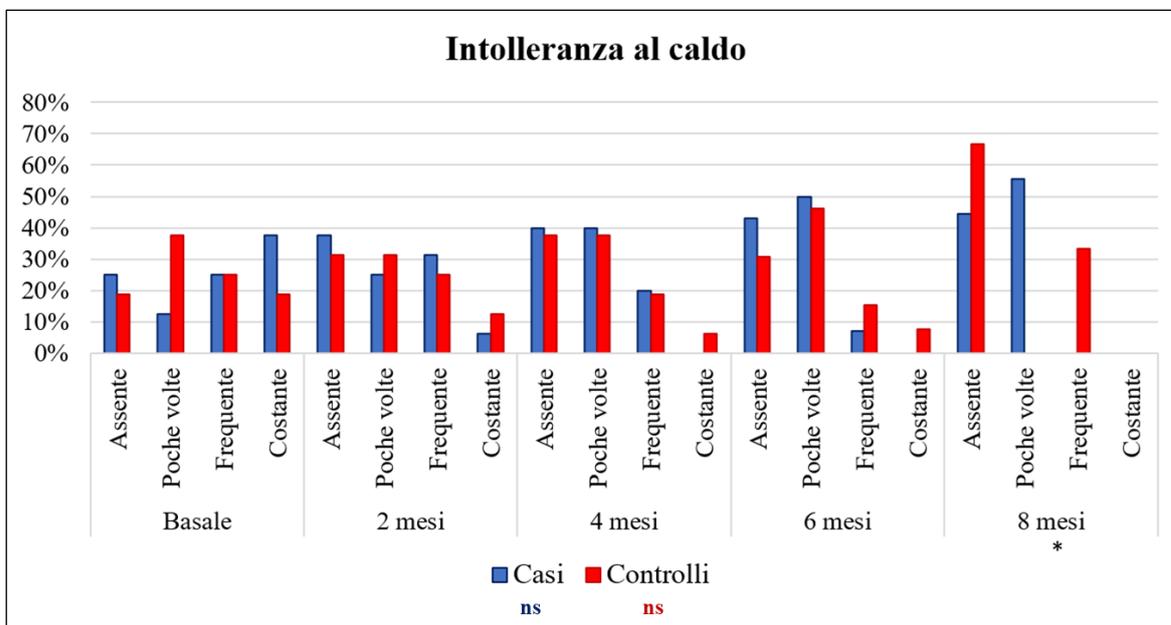
\* $p < 0,05$  (confronto tra i due gruppi, test del  $\chi^2$ ). Il p-value e l'abbreviazione *ns* (non significativo) riportati sotto la legenda sono relativi alle analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (Test Q di Cochran).

**Figura 23.** Prevalenza del sintomo eccessiva sudorazione nei due gruppi e nei diversi tempi.



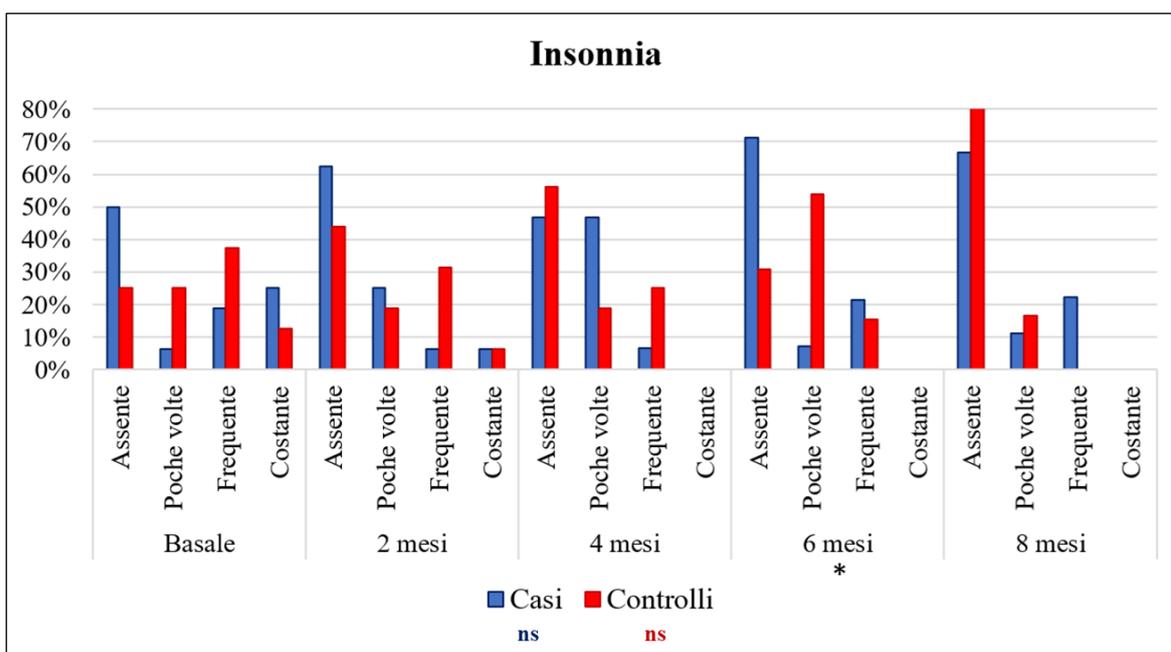
Il p-value e l'abbreviazione ns (non significativo) riportati sotto la legenda sono relativi alle analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (Test Q di Cochran).

**Figura 24.** Prevalenza del sintomo intolleranza al caldo nei due gruppi e nei diversi tempi.



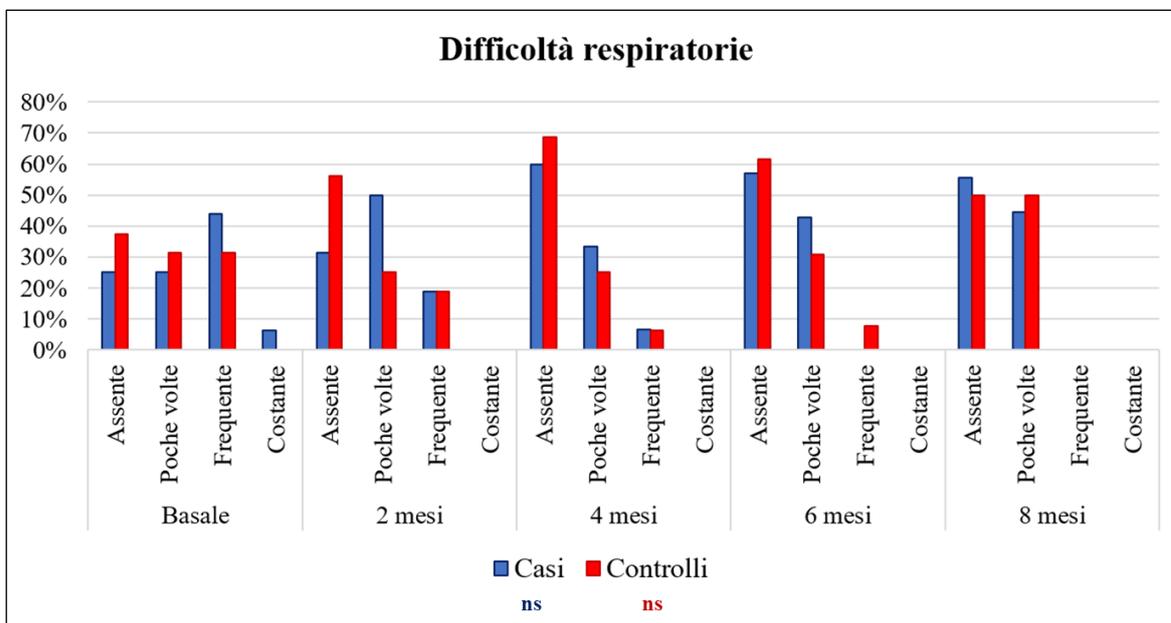
\* $p < 0,05$  (confronto tra i due gruppi, test del  $\chi^2$ ). L'abbreviazione ns (non significativo) riportata sotto la legenda è relativa all'analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (Test Q di Cochran).

**Figura 25.** Prevalenza del sintomo insonnia nei due gruppi e nei diversi tempi.



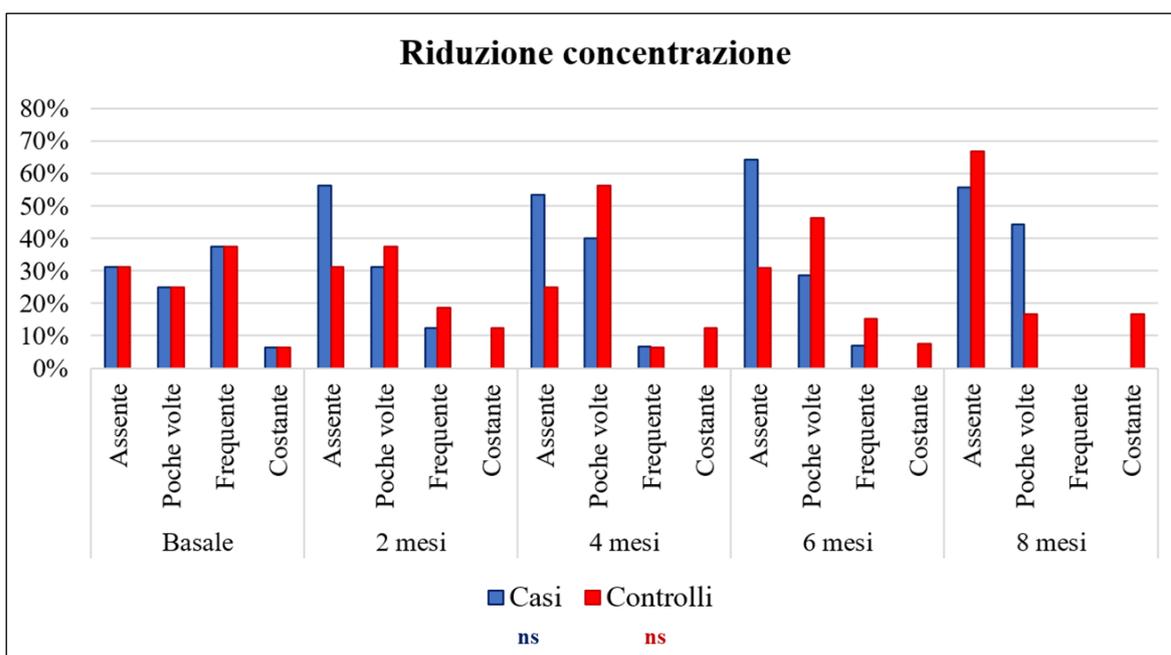
\* $p < 0,05$  (confronto tra i due gruppi, test del Chi Quadrato). L'abbreviazione ns (non significativo) riportata sotto la legenda è relativa all'analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (Test Q di Cochran).

**Figura 26.** Prevalenza del sintomo difficoltà respiratorie nei due gruppi e nei diversi tempi.



L'abbreviazione ns (non significativo) riportata sotto la legenda è relativa all'analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (Test Q di Cochran).

**Figura 27.** Prevalenza del sintomo riduzione della concentrazione nei due gruppi e nei diversi tempi.



L'abbreviazione *ns* (non significativo) riportata sotto la legenda è relativa all'analisi di confronto per dati appaiati in ciascun gruppo (Test Q di Cochran).

## 5. Discussione

Il nostro studio sperimentale è stato finalizzato alla valutazione degli effetti della somministrazione contemporanea di farmaci tireostatici e di un integratore contenente 500 mg di L-Carnitina e 83 µg di Selenio in pazienti affetti da ipertiroidismo secondario a Morbo di Graves. A tale scopo, abbiamo valutato l'efficacia di tale associazione terapeutica nel favorire la remissione di malattia e nel migliorare la sintomatologia e la qualità della vita dei pazienti trattati. I risultati preliminari di questo studio hanno mostrato che i pazienti trattati con L-Carnitina e Selenio in associazione a metimazolo hanno avuto una percentuale di remissione di malattia superiore rispetto al gruppo trattato con solo metimazolo, con un miglioramento della sintomatologia e della qualità di vita più marcato nel primo gruppo.

In Letteratura, diversi studi hanno valutato gli effetti della somministrazione di Selenio e L-Carnitina in pazienti affetti da GD, associata alla terapia con MMI. Gli studi che hanno valutato l'utilizzo della carnitina nella GD hanno dimostrato una risoluzione della sintomatologia nei pazienti trattati, senza alcuna variazione significativa nei test di funzionalità tiroidea o nella riduzione dell'assorbimento di radioiodio a livello tiroideo, sottolineando il ruolo di questa molecola come antagonista periferico degli ormoni tiroidei, piuttosto che come inibitore diretto della funzione della ghiandola [186–189,191,192]. Ulteriori studi hanno poi ulteriormente sottolineato l'importanza della somministrazione di L-Carnitina in questo contesto, avendo dimostrato come l'aumento dei livelli degli ormoni tiroidei sia in grado di determinare il consumo dei depositi tissutali di L-Carnitina, dato confermato dal riscontro di ridotte concentrazioni di carnitina nel muscolo scheletrico dei pazienti affetti da ipertiroidismo, ripristinati in seguito alla normalizzazione della funzione tiroidea [190,195].

Per quanto riguarda il Selenio, la ghiandola tiroidea è l'organo con la più alta concentrazione tissutale di questa sostanza sottoforma di selenoproteine, fondamentali per il corretto metabolismo ormonale. Inoltre, i pazienti con GD di nuova diagnosi presentano livelli di Selenio ridotti [168,169,205]. Sono stati condotti diversi studi sull'integrazione di Selenio associato a terapia tireostatica in pazienti affetti da GD, i quali hanno riportato risultati non univoci, probabilmente attribuibili alle differenze presenti tra i vari studi come durata del periodo di trattamento e follow-up, dimensione del campione, eterogeneità dei pazienti, stadio della malattia e variabilità nello stato del Selenio [168,207–212]. Benché il Selenio non sembri avere effetti sulla sintomatologia percepita [207], associato alla terapia con

metimazolo sembra favorire la riduzione del titolo dei TRAb [210]; questo dato risulta in accordo con i nostri risultati, che hanno mostrato una riduzione dei livelli di TRAb significativamente maggiore nei casi rispetto ai controlli, a 4, 6 e 8 mesi dalla diagnosi.

Livelli mediamente ridotti di Selenio, sono stati osservati in pazienti affetti da GD che presentano anche un quadro di oftalmopatia e la carenza di questo elemento risulta associata ad una forma più grave di tale manifestazione. I meccanismi attraverso cui l'integrazione di Selenio potrebbe contrastare l'insorgenza e la progressione di oftalmopatia sono verosimilmente legati alla sua azione antiossidante, alla riduzione della proliferazione dei fibroblasti orbitali e all'inibizione del rilascio di acido ialuronico e citochine pro-infiammatorie. Tuttavia, anche in questo contesto, sono stati ottenuti risultati contrastanti nei diversi studi [196,213–217].

Per quanto riguarda l'integrazione combinata di L-Carnitina e Selenio, uno studio pilota del 2017 ha messo in evidenza come questa sia in grado di ridurre i sintomi e migliorare la QoL in pazienti affetti da ipertiroidismo subclinico, senza modifiche significative del loro profilo endocrino, grazie soprattutto alla L-Carnitina che agisce bloccando l'up-take nucleare di T3 e T4 [194]. I nostri dati hanno, invece, mostrato un miglioramento del profilo tiroideo più marcato nel gruppo trattato con metimazolo in associazione a Selenio e L-Carnitina, con una percentuale di remissione di malattia significativamente superiore rispetto al gruppo trattato con solo metimazolo. Inoltre, i pazienti che hanno assunto Selenio ed L-Carnitina, hanno avuto necessità di una dose significativamente inferiore di metimazolo rispetto ai pazienti in sola terapia tireostatica. In merito alla sintomatologia e alla qualità della vita, un miglioramento significativo di alcuni sintomi quali tremori, ansia ed eccessiva sudorazione è stata evidenziata esclusivamente nel gruppo trattato con Selenio e L-Carnitina in associazione a metimazolo. In merito al sintomo palpitazioni, si è osservato un miglioramento in entrambi i gruppi in studio; tuttavia, tale miglioramento è risultato più marcato nei casi rispetto ai controlli.

## **5.1. Limiti e punti di forza dello studio**

Il nostro studio presenta diversi limiti. Tra questi, l'attuale numerosità campionaria rappresenta il limite principale e l'ampliamento della casistica consentirebbe di confermare i risultati ottenuti. Un ulteriore limite è costituito dalla durata del follow-up, che al momento non consente una valutazione completa degli effetti a lungo termine del trattamento combinato di L-Carnitina e Selenio.

Il punto di forza principale del nostro studio è rappresentato dal disegno sperimentale e dalla randomizzazione, in cui l'assegnazione casuale dei pazienti ai diversi gruppi di trattamento riduce il rischio di bias di selezione e aumenta la validità interna dello studio. Infine, trattandosi di un disegno multicentrico, lo studio include una più ampia varietà di pazienti provenienti da contesti clinici differenti, migliorando la rappresentatività della popolazione in analisi e aumentando la possibilità di generalizzare i risultati ottenuti.

## **6. Conclusione**

In conclusione, i risultati preliminari del nostro studio sperimentale hanno mostrato come la somministrazione di L-Carnitina e Selenio in associazione alla terapia standard per l'ipertiroidismo contribuisca a ripristinare un corretto quadro ormonale, a ridurre il titolo anticorpale dei TRAb e a migliorare la qualità della vita dei pazienti trattati. Tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini con un campione più ampio e un follow-up più lungo per confermare questi risultati e comprendere pienamente il potenziale beneficio di questa combinazione terapeutica.

## 7. Bibliografia

- [1] Smith TJ, Hegedüs L. Graves' Disease. *New England Journal of Medicine* 2016;375:1552–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1510030>.
- [2] Antonelli A, Fallahi P, Elia G, Ragusa F, Paparo SR, Ruffilli I, et al. Graves' disease: Clinical manifestations, immune pathogenesis (cytokines and chemokines) and therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2020;34. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101388>.
- [3] Kahaly GJ, Bartalena L, Hegedüs L, Leenhardt L, Poppe K, Pearce SH. 2018 European thyroid association guideline for the management of graves' hyperthyroidism. *Eur Thyroid J* 2018;7:167–86. <https://doi.org/10.1159/000490384>.
- [4] Kahaly GJ. Management of graves thyroidal and extrathyroidal disease: An update. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2020;105. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa646>.
- [5] Antonelli A, Ferrari SM, Ragusa F, Elia G, Paparo SR, Ruffilli I, et al. Graves' disease: Epidemiology, genetic and environmental risk factors and viruses. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2020;34. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101387>.
- [6] Bartalena L, Piantanida E, Gallo D, Ippolito S, Tanda ML. Management of Graves' hyperthyroidism: present and future. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism* 2022;17:153–66. <https://doi.org/10.1080/17446651.2022.2052044>.
- [7] Wémeau J, Klein M, Sadoul J-L, Briet C, Vélayoudom-Céphise F-L. Graves' disease: Introduction, epidemiology, endogenous and environmental pathogenic factors. *Annales d' Endocrinologie (Paris)* 2018;79:599–607. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2018.09.002>.
- [8] MacFarland SP, Bauer AJ, Adzick NS, Surrey LF, Noyes J, Kazahaya K, et al. Disease burden and outcome in children and young adults with concurrent graves disease and differentiated thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2018;103:2918–25. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00026>.
- [9] Smith TJ, Hegedüs L. Graves' Disease. *New England Journal of Medicine* 2016;375:1552–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1510030>.
- [10] Tomer Y. Mechanisms of autoimmune thyroid diseases: From genetics to epigenetics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2014;9:147–56. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104713>.
- [11] Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, Hegedüs L, Hegedüs H. Evidence for a Major Role of Heredity in Graves' Disease: A Population-Based Study of Two Danish Twin Cohorts\* 2001. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001;86(2):930-4. doi: 10.1210/jcem.86.2.7242.
- [12] Limbach M, Saare M, Tserel L, Kisand K, Eglit T, Sauer S, et al. Epigenetic profiling in CD4+ and CD8+ T cells from Graves' disease patients reveals changes in genes associated with T cell receptor signaling. *Journal of Autoimmunity* 2016;67:46–56. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.09.006>.
- [13] Brix TH, Hegedüs L. Twin studies as a model for exploring the aetiology of autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012;76:457–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04318.x>.

- [14] Rapoport B, McLachlan SM. Graves' hyperthyroidism is antibody-mediated but is predominantly a Th1-type cytokine disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2014;99:4060–1. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3011>.
- [15] Dechairo BM, Zabaneh D, Collins J, Brand O, Dawson GJ, Green AP, et al. Association of the TSHR gene with Graves' disease: the first disease specific locus. *European Journal of Human Genetics* 2005;13:1223–30. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201485>.
- [16] Vita R, Lapa D, Trimarchi F, Vita G, Fallahi P, Antonelli A, et al. Certain HLA alleles are associated with stress-triggered Graves' disease and influence its course. *Endocrine* 2017;55:93–100. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0909-6>.
- [17] Jacobson EM, Huber A, Tomer Y. The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: From epidemiology to etiology. *Journal of Autoimmunity* 2008;30:58–62. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.11.010>.
- [18] Okada Y, Momozawa Y, Ashikawa K, Kanai M, Matsuda K, Kamatani Y, et al. Construction of a population-specific HLA imputation reference panel and its application to Graves' disease risk in Japanese. *Nat Genet* 2015;47:798–802. <https://doi.org/10.1038/ng.3310>.
- [19] Jacobson EM, Tomer Y. The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor, and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: Back to the future. *Journal of Autoimmunity* 2007;28:85–98. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.02.006>.
- [20] Kavvoura FK, Akamizu T, Awata T, Ban Y, Chistiakov DA, Frydecka I, et al. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: A meta-analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007;92:3162–70. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0147>.
- [21] Takahashi M, Kimura A. HLA and CTLA4 polymorphisms may confer a synergistic risk in the susceptibility to Graves' disease. *Journal of Human Genetics* 2010;55:323–6. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.20>.
- [22] Jacobson EM, Concepcion E, Oashi T, Tomer Y. A Graves' Disease-Associated Kozak Sequence Single-Nucleotide Polymorphism Enhances the Efficiency of CD40 Gene Translation: A Case for Translational Pathophysiology. *Endocrinology* 2005;146:2684–91. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1617>.
- [23] Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, Gonzales B, Novitzke J, Kern M, et al. Analysis of Families in the Multiple Autoimmune Disease Genetics Consortium (MADGC) Collection: the PTPN22 620W Allele Associates with Multiple Autoimmune Phenotypes. *The American Journal of Human Genetics* 2005;76:561–71. <https://doi.org/10.1086/429096>.
- [24] Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, Owen CJ, Herington S, Donaldson PT, et al. The Codon 620 Tryptophan Allele of the Lymphoid Tyrosine Phosphatase (LYP) Gene Is a Major Determinant of Graves' Disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004;89:5862–5. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1108>.
- [25] Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orrú V, Zavattari P, et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nature Genetics* 2005;37:1317–9. <https://doi.org/10.1038/ng1673>.
- [26] Brand OJ, Lowe CE, Heward JM, Franklyn JA, Cooper JD, Todd JA, et al. Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2Ralpha)/CD25 gene region with Graves' disease using a multilocus test and tag SNPs. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2007;0:070208104737001-12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.02762.x>.

- [27] Kisiel B, Bednarczuk T, Kostrzewa G, Kosinska J, Mi2kiewicz P, Plazinska MT, et al. Polymorphism of the oestrogen receptor beta gene ( *ESR2* ) is associated with susceptibility to Graves' disease. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2008;68:429–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.03060.x>.
- [28] Brooks WH. X Chromosome Inactivation and Autoimmunity. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 2010;39:20–9. <https://doi.org/10.1007/s12016-009-8167-5>.
- [29] Brix TH, Knudsen GPS, Kristiansen M, Kyvik KO, Ørstavik KH, Hegedüs L. High Frequency of Skewed X-Chromosome Inactivation in Females with Autoimmune Thyroid Disease: A Possible Explanation for the Female Predisposition to Thyroid Autoimmunity. *J Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005;90:5949–53. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1366>.
- [30] Ferrari SM, Fallahi P, Antonelli A, Benvenga S. Environmental issues in thyroid diseases. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00050>.
- [31] Dittmar M, Libich C, Brenzel T, Kahaly GJ. Increased Familial Clustering of Autoimmune Thyroid Diseases. *Hormone and Metabolic Research* 2011;43:200–4. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1271619>.
- [32] Roti E, Uberti ED. Iodine Excess and Hyperthyroidism. *Thyroid* 2001;11:493–500. <https://doi.org/10.1089/105072501300176453>.
- [33] Nagata K, Nakayama Y, Higaki K, Ochi M, Kanai K, Matsushita M, et al. Reactivation of persistent Epstein–Barr virus (EBV) causes secretion of thyrotropin receptor antibodies (TRAbs) in EBV-infected B lymphocytes with TRAbs on their surface. *Autoimmunity* 2015;48:328–35. <https://doi.org/10.3109/08916934.2015.1022163>.
- [34] Virili C, Centanni M. Does microbiota composition affect thyroid homeostasis? *Endocrine* 2015;49:583–7. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0509-2>.
- [35] Kotwal A, Stan M. Thyrotropin Receptor Antibodies—An Overview. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2018;34:S20–7. <https://doi.org/10.1097/IOP.0000000000001052>.
- [36] Morshed SA, Latif R, Davies TF. Characterization of thyrotropin receptor antibody-induced signaling cascades. *Endocrinology* 2009;150:519. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0878>.
- [37] Rapoport B, Aliesky HA, Chen CR, McLachlan SM. Evidence that TSH receptor A-subunit multimers, not monomers, drive antibody affinity maturation in Graves' disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2015;100:E871–5. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1528>.
- [38] Kahal GJ, Diana T, Kanitz M, Frommer L, Oliv PD. Prospective trial of functional thyrotropin receptor antibodies in graves disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2020;105:E1006–14. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz292>.
- [39] 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 1. vol. 170. 2003.
- [40] Martin A, Schwartz AE, Friedman EW, Davies TF. Successful Production of Intrathyroidal Human T Cell Hybridomas: Evidence for Intact Helper T Cell Function in Graves' Disease\*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1989;69:1104–8. <https://doi.org/10.1210/jcem-69-6-1104>.
- [41] Hanafusa T, Chiovato L, Doniach D, Pujol-Borrell R, Russell RCG, Bottazzo GF. Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: relevance

- for autoimmunity. *The Lancet* 1983;322:1111–5. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)90628-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)90628-1).
- [42] 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. <https://doi.org/10.1089/thy.1999.9.749>.
- [43] Faure GC, Bensoussan-Lejzerowicz D, Bene MC, Aubert V, Leclere J. Coexpression of CD40 and Class II Antigen HLA-DR in Graves' Disease Thyroid Epithelial Cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84:212–5. <https://doi.org/10.1006/clin.1997.4391>.
- [44] Boelaert K, Torlinska B, Holder RL, Franklyn JA. Older Subjects with Hyperthyroidism Present with a Paucity of Symptoms and Signs: A Large Cross-Sectional Study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010;95:2715–26. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2495>.
- [45] Bel Lassen P, Kyrilli A, Lytrivi M, Corvilain B. Graves' disease, multinodular goiter and subclinical hyperthyroidism. *Annales d'Endocrinologie (Paris)* 2019;80:240–9. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2018.09.004>.
- [46] Lane LC, Cheetham TD, Perros P, Pearce SHS. New therapeutic horizons for graves' hyperthyroidism. *Endocrine Reviews* 2020;41:873–84. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa022>.
- [47] Bartalena L, Masiello E, Magri F, Veronesi G, Bianconi E, Zerbini F, et al. The phenotype of newly diagnosed Graves' disease in Italy in recent years is milder than in the past: results of a large observational longitudinal study. *Journal of Endocrinological Investigation* 2016;39:1445–51. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0516-7>.
- [48] Cooper DS, Biondi B. Seminar Subclinical thyroid disease. *The Lancet* 2012;379:1142–54. <https://doi.org/10.1016/S0140>.
- [49] Wiersinga WM. Guidance in Subclinical Hyperthyroidism and Subclinical Hypothyroidism: Are We Making Progress? *European Thyroid Journal* 2015;4:143–8. <https://doi.org/10.1159/000438909>.
- [50] Boelaert K, Torlinska B, Holder RL, Franklyn JA. Older subjects with hyperthyroidism present with a paucity of symptoms and signs: A large cross-sectional study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010;95:2715–26. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2495>.
- [51] Mosekilde L, Eriksen EF, Charles P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 1990;19:35–63.
- [52] Földes J, Tarján G, Szathmari M, Varga F, Krasznai I, Horvath Cs. Bone mineral density in patients with endogenous subclinical hyperthyroidism: Is this thyroid status a risk factor for osteoporosis? *Clinical Endocrinology (Oxf)* 1993;39:521–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1993.tb02403.x>.
- [53] Gürlek A, Gedik O. Effect of Endogenous Subclinical Hyperthyroidism on Bone Metabolism and Bone Mineral Density in Premenopausal Women. *Thyroid* 1999;9:539–43. <https://doi.org/10.1089/thy.1999.9.539>.
- [54] Blum MR, Bauer DC, Collet T-H, Fink HA, Cappola AR, da Costa BR, et al. Subclinical Thyroid Dysfunction and Fracture Risk. *JAMA* 2015;313:2055. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.5161>.

- [55] Chang C-C, Cheng C-J, Sung C-C, Chiueh T-S, Lee C-H, Chau T, et al. A 10-year analysis of thyrotoxic periodic paralysis in 135 patients: focus on symptomatology and precipitants. *European Journal of Endocrinology* 2013;169:529–36. <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0381>.
- [56] Akamizu T, Satoh T, Isozaki O, Suzuki A, Wakino S, Ihuri T, et al. Diagnostic Criteria, Clinical Features, and Incidence of Thyroid Storm Based on Nationwide Surveys. *Thyroid* 2012;22:661–79. <https://doi.org/10.1089/thy.2011.0334>.
- [57] Vaidya B, Pearce SHS. Diagnosis and management of thyrotoxicosis. *BMJ* 2014;349:g5128–g5128. <https://doi.org/10.1136/bmj.g5128>.
- [58] Bartalena L, Kahaly GJ, Baldeschi L, Dayan CM, Eckstein A, Marcocci C, et al. The 2021 European Group on Graves’ orbitopathy (EUGOGO) clinical practice guidelines for the medical management of Graves’ orbitopathy. *European Journal of Endocrinology* 2021;185:G43–67. <https://doi.org/10.1530/EJE-21-0479>.
- [59] Bartalena L, Piantanida E, Gallo D, Lai A, Tanda ML. Epidemiology, Natural History, Risk Factors, and Prevention of Graves’ Orbitopathy. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.615993>.
- [60] Mourits MP, Koornneef L, Wiersinga WM, Prummel MF, Berghout A, V D Gaag R. Clinical criteria for the assessment of disease activity in Graves’ ophthalmopathy: A novel approach. *British Journal of Ophthalmology* 1989;73:639–44. <https://doi.org/10.1136/bjo.73.8.639>.
- [61] Rundle FF, Wilson CW. Development and course of exophthalmos and ophthalmoplegia in Graves’ disease with special reference to the effect of thyroidectomy. *Clinical Science* 1945;5:177–94.
- [62] Selva D, Chen C, King G. Late reactivation of thyroid orbitopathy. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 2004;32:46–50. <https://doi.org/10.1046/j.1442-9071.2004.00756.x>.
- [63] Bartley GB, Fatourehchi V, Kadrmas EF, Jacobsen SJ, Ilstrup DM, Garrity JA, et al. Clinical Features of Graves’ Ophthalmopathy in an Incidence Cohort. *Am J Ophthalmol* 1996 Mar;121(3):284-90. doi: 10.1016/s0002-9394(14)70276-4.
- [64] Eckstein AK, Losch C, Glowacka D, Schott M, Mann K, Esser J, et al. Euthyroid and primarily hypothyroid patients develop milder and significantly more asymmetrical Graves ophthalmopathy. *British Journal of Ophthalmology* 2009;93:1052–6. <https://doi.org/10.1136/bjo.2007.137265>.
- [65] Zhang L, Baker G, Janus D, Paddon CA, Fuhrer D, Ludgate M. Biological Effects of Thyrotropin Receptor Activation on Human Orbital Preadipocytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006;47:5197. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0596>.
- [66] Wang Y, Smith TJ. Current Concepts in the Molecular Pathogenesis of Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2014;55:1735. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14002>.
- [67] Weightman DR, Perros P, Sherif IH, Kendall-Taylor P. Autoantibodies to Igf-1 Binding Sites in Thyroid Associated Ophthalmopathy. *Autoimmunity* 1993;16:251–7. <https://doi.org/10.3109/08916939309014643>.
- [68] Krieger CC, Place RF, Bevilacqua C, Marcus-Samuels B, Abel BS, Skarulis MC, et al. TSH/IGF-1 Receptor Cross Talk in Graves’ Ophthalmopathy Pathogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2016;101:2340–7. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1315>.

- [69] Smith TJ, Kahaly GJ, Ezra DG, Fleming JC, Dailey RA, Tang RA, et al. Teprotumumab for Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *New England Journal of Medicine* 2017;376:1748–61. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614949>.
- [70] Fatourehchi V. Thyroid dermopathy and acropachy. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012;26:553–65. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.10.001>.
- [71] Fatourehchi V, Ahmed DDF, Schwartz KM. Thyroid acropachy: Report of 40 patients treated at a single institution in a 26-year period. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002;87:5435–41. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020746>.
- [72] Batal O, Hatem SF. Thyroid acropachy. *Orthopedics* 2008;31:98–100. <https://doi.org/10.3928/01477447-20080101-38>.
- [73] Ferrari SM, Fallahi P, Ruffilli I, Elia G, Ragusa F, Benvenga S, et al. The association of other autoimmune diseases in patients with Graves' disease (with or without ophthalmopathy): Review of the literature and report of a large series. *Autoimmunity Reviews* 2019;18:287–92. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.10.001>.
- [74] Goichot B, Leenhardt L, Massart C, Raverot V, Tramalloni J, Iraqi H. Diagnostic procedure in suspected Graves' disease. *Annales d' Endocrinologie (Paris)* 2018;79:608–17. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2018.08.002>.
- [75] De Leo S, Lee SY, Braverman LE. Hyperthyroidism. *The Lancet* 2016;388:906–18. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00278-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00278-6).
- [76] Ross DS, Burch HB, Cooper DS, Greenlee MC, Laurberg P, Maia AL, et al. 2016 American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis. *Thyroid* 2016;26:1343–421. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0229>.
- [77] Tozzoli R, Bagnasco M, Giavarina D, Bizzaro N. TSH receptor autoantibody immunoassay in patients with Graves' disease: Improvement of diagnostic accuracy over different generations of methods. *Systematic review and meta-analysis. Autoimmunity Reviews* 2012;12:107–13. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.07.003>.
- [78] Di Maria C, Allen J, Dickinson J, Neoh C, Perros P. Novel Thermal Imaging Analysis Technique for Detecting Inflammation in Thyroid Eye Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2014;99:4600–6. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1957>.
- [79] Kahaly GJ, Diana T. TSH Receptor Antibody Functionality and Nomenclature. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00028>.
- [80] Kampmann E, Diana T, Kanitz M, Hoppe D, Kahaly GJ. Thyroid Stimulating but Not Blocking Autoantibodies Are Highly Prevalent in Severe and Active Thyroid-Associated Orbitopathy: A Prospective Study. *International Journal of Endocrinology* 2015;2015:1–5. <https://doi.org/10.1155/2015/678194>.
- [81] McKee A, Peyerl F. TSI assay utilization: impact on costs of Graves' hyperthyroidism diagnosis. *The American journal of managed care* 2012;18:e1-14.
- [82] Kahaly GJ, Bartalena L, Hegedüs L. The American Thyroid Association/American Association of Clinical Endocrinologists Guidelines for Hyperthyroidism and other causes of Thyrotoxicosis: A European perspective. *Thyroid* 2011;21:585–91. <https://doi.org/10.1089/thy.2011.2106.ed3>.

- [83] Burch HB, Cooper DS. Management of graves disease a review. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 2015;314:2544–54. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.16535>.
- [84] Corvilain B, Hamy A, Brunaud L, Borson-Chazot F, Orgiazzi J, Bensalem Hachmi L, et al. Treatment of adult Graves' disease. *Annales d' Endocrinologie (Paris)* 2018;79:618–35. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2018.08.003>.
- [85] Brito JP, Castaneda-Guarderas A, Gionfriddo MR, Ospina NS, Maraka S, Dean DS, et al. Development and Pilot Testing of an Encounter Tool for Shared Decision Making about the Treatment of Graves' Disease. *Thyroid* 2015;25:1191–8. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0277>.
- [86] Törring O, Tallstedt L, Wallin G, Lundell G, Ljunggren JG, Taube A, et al. Graves' hyperthyroidism: treatment with antithyroid drugs, surgery, or radioiodine--a prospective, randomized study. *Thyroid Study Group. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996;81:2986–93. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.8.8768863>.
- [87] Sundaresh V, Brito JP, Wang Z, Prokop LJ, Stan MN, Murad MH, et al. Comparative Effectiveness of Therapies for Graves' Hyperthyroidism: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013;98:3671–7. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1954>.
- [88] Gallo D, Trimarchi F, Piantanida E, Tanda ML, Bartalena L. Terapia farmacologica del morbo di Basedow tra presente e futuro. *L'Endocrinologo* 2023. <https://doi.org/10.1007/s40619-023-01377-5>.
- [89] Laurberg P. Remission of Graves' disease during anti-thyroid drug therapy. Time to reconsider the mechanism? *European Journal of Endocrinology* 2006;155:783–6. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02295>.
- [90] Burch HB, Cooper DS. Antithyroid drug therapy: 70 years later. *European Journal of Endocrinology* 2018;179:R261–74. <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0678>.
- [91] Cooper DS. Antithyroid Drugs. *New England Journal of Medicine* 2005;352:905–17. <https://doi.org/10.1056/NEJMra042972>.
- [92] Volpe R. The Immunomodulatory Effects of Anti-thyroid Drugs are Mediated via Actions on Thyroid Cells, Affecting Thyrocyte-immunocyte Signalling A Review. *Current Pharmaceutical Design* 2001;7:451–60. <https://doi.org/10.2174/1381612013397898>.
- [93] Gallo D, Bianchi FM, Manzella La Barbera F, Clementi I, Lai A, Piantanida E, et al. Gestione clinica dell'ipertiroidismo refrattario. *L'Endocrinologo* 2023;24:167–73. <https://doi.org/10.1007/s40619-023-01238-1>.
- [94] Melander A, Hallengren B, Rosendal-Helgesen S, Sjöberg A-K, Wählin-Boll E. Comparative in vitro effects and in vivo kinetics of antithyroid drugs. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1980;17:295–9. <https://doi.org/10.1007/BF00625803>.
- [95] Li H, Okuda J, Akamizu T, Mori T. A Hyperthyroid Patient with Graves' Disease Who Was Strongly Resistant to Methimazole: Investigation on Possible Mechanisms of the Resistance. *Endocrine Journal* 1995;42:697–704. <https://doi.org/10.1507/endocrj.42.697>.
- [96] Wartofsky L. Low remission after therapy for Graves disease. Possible relation of dietary iodine with antithyroid therapy results. *JAMA* 1973;226:1083–8.

- [97] Huang H, Shi Y, Liang B, Cai H, Cai Q, Lin R. Optimal iodine supplementation during antithyroid drug therapy for Graves' disease is associated with lower recurrence rates than iodine restriction. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2018;88:473–8. <https://doi.org/10.1111/cen.13543>.
- [98] Otsuka F, Noh JY, Chino T, Shimizu T, Mukasa K, Ito K, et al. Hepatotoxicity and cutaneous reactions after antithyroid drug administration. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2012;77:310–5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2012.04365.x>.
- [99] Kim H-J, Kim B-H, Han Y-S, Yang I, Kim K-J, Dong S-H, et al. The incidence and clinical characteristics of symptomatic propylthiouracil-induced hepatic injury in patients with hyperthyroidism: a single-center retrospective study. *The American Journal of Gastroenterology* 2001;96:165–9. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03469.x>.
- [100] Hallberg P, Eriksson N, Ibañez L, Bondon-Guitton E, Kreutz R, Carvajal A, et al. Genetic variants associated with antithyroid drug-induced agranulocytosis: a genome-wide association study in a European population. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2016;4:507–16. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)00113-3).
- [101] Cooper DS, Rivkees SA. Putting Propylthiouracil in Perspective. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009;94:1881–2. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0850>.
- [102] Wang M, Lee W, Huang T, Chu C, Hsieh C. Antithyroid drug-related hepatotoxicity in hyperthyroidism patients: a population-based cohort study. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2014;78:619–29. <https://doi.org/10.1111/bcp.12336>.
- [103] Balavoine A-S, Glinoeur D, Dubucquoi S, Wémeau J-L. Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Positive Small-Vessel Vasculitis Associated with Antithyroid Drug Therapy: How Significant Is the Clinical Problem? *Thyroid* 2015;25:1273–81. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0603>.
- [104] Cho BY, Shong MH, Yi KH, Lee HK, Koh C, MIn HK. Evaluation of serum basal thyrotrophin levels and thyrotrophin receptor antibody activities as prognostic markers for discontinuation of antithyroid drug treatment in patients with Graves' disease. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 1992;36:585–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1992.tb02269.x>.
- [105] Benker G, Reinwein D, Kahaly G, Tegler L, Alexander WD, Faßbinder J, et al. Is there a methimazole dose effect on remission rate in Graves' disease? Results from a long-term prospective study. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 1998;49:451–7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.1998.00554.x>.
- [106] Vitti P, Rago T, Chiovato L, Pallini S, Santini F, Fiore E, et al. Clinical Features of Patients with Graves' Disease Undergoing Remission After Antithyroid Drug Treatment. *Thyroid* 1997;7:369–75. <https://doi.org/10.1089/thy.1997.7.369>.
- [107] Michelangeli V, Poon C, Taft J, Newnham H, Topliss D, Colman P. The Prognostic Value of Thyrotropin Receptor Antibody Measurement in the Early Stages of Treatment of Graves' Disease with Antithyroid Drugs. *Thyroid* 1998;8:119–24. <https://doi.org/10.1089/thy.1998.8.119>.
- [108] Levels of Autoantibodies against Human TSH Receptor Predict Relapse of Hyperthyroidism in Graves' Disease. *Hormone and Metabolic Research* 2004;36:92–6. <https://doi.org/10.1055/s-2004-814217>.
- [109] Feldt-Rasmussen U, Schleusener H, Carayon P. Meta-analysis evaluation of the impact of thyrotropin receptor antibodies on long term remission after medical

- therapy of Graves' disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1994;78:98–102. <https://doi.org/10.1210/jcem.78.1.8288723>.
- [110] Teng CS, Yeung RTT. Changes in Thyroid-Stimulating Antibody Activity in Graves' Disease Treated with Antithyroid Drug and Its Relationship to Relapse: A Prospective Study\*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1980;50:144–7. <https://doi.org/10.1210/jcem-50-1-144>.
- [111] Laurberg P, Krejbjerg A, Andersen SL. Relapse following antithyroid drug therapy for Graves' hyperthyroidism. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* 2014;21:415–21. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000088>.
- [112] Azizi F, Abdi H, Amouzegar A, Habibi Moeini AS. Long-term thionamide antithyroid treatment of Graves' disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2023;37:101631. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2022.101631>.
- [113] Andrade VA, Gross JL, Maia AL. Effect of Methimazole Pretreatment on Serum Thyroid Hormone Levels after Radioactive Treatment in Graves' Hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4012–6. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.11.6149>.
- [114] Burch HB, Solomon BL, Cooper DS, Ferguson P, Walpert N, Howard R. The Effect of Antithyroid Drug Pretreatment on Acute Changes in Thyroid Hormone Levels after <sup>131</sup>I Ablation for Graves' Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001;86:3016–21. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.7.7639>.
- [115] Lee S-W, Lee J, Bae J-H, Seo J-H, Kang S-M, Ahn B-C, et al. Paradoxical exacerbation of preexisting Graves' disease induced by insufficient radioiodine treatment: a report of five patients. *Nuclear Medicine Communications* 2009;30:275–80. <https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e328324b447>.
- [116] Walter MA, Briel M, Christ-Crain M, Bonnema SJ, Connell J, Cooper DS, et al. Effects of antithyroid drugs on radioiodine treatment: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2007;334:514. <https://doi.org/10.1136/bmj.39114.670150.BE>.
- [117] Subramanian M, Baby MK, Seshadri KG. The effect of prior antithyroid drug use on delaying remission in high uptake Graves' disease following radioiodine ablation. *Endocrine Connections* 2016;5:34–40. <https://doi.org/10.1530/EC-15-0119>.
- [118] Bonnema SJ, Bennedbæk FN, Veje A, Marving J, Hegedüs L. Continuous Methimazole Therapy and Its Effect on the Cure Rate of Hyperthyroidism Using Radioactive Iodine: An Evaluation by a Randomized Trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006;91:2946–51. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0226>.
- [119] Bogazzi F, Giovannetti C, Fessehatsion R, Tanda ML, Campomori A, Compri E, et al. Impact of Lithium on Efficacy of Radioactive Iodine Therapy for Graves' Disease: A Cohort Study on Cure Rate, Time to Cure, and Frequency of Increased Serum Thyroxine After Antithyroid Drug Withdrawal. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010;95:201–8. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1655>.
- [120] Weetman AP. Radioiodine treatment for benign thyroid diseases. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2007;66:757–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.02841.x>.
- [121] Leslie WD, Ward L, Salamon EA, Ludwig S, Rowe RC, Cowden EA. A Randomized Comparison of Radioiodine Doses in Graves' Hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:978–83. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020805>.

- [122] de Rooij A, Vandenbroucke JP, Smit JWA, Stokkel MPM, Dekkers OM. Clinical outcomes after estimated versus calculated activity of radioiodine for the treatment of hyperthyroidism: systematic review and meta-analysis. *European Journal of Endocrinology* 2009;161:771–7. <https://doi.org/10.1530/EJE-09-0286>.
- [123] Boelaert K, Syed AA, Manji N, Sheppard MC, Holder RL, Gough SC, et al. Prediction of cure and risk of hypothyroidism in patients receiving <sup>131</sup>I for hyperthyroidism. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2009;70:129–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03291.x>.
- [124] Alexander EK, Larsen PR. High Dose <sup>131</sup>I Therapy for the Treatment of Hyperthyroidism Caused by Graves' Disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002;87:1073–7. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.3.8333>.
- [125] Nwatsock J, Taieb D, Tessonier L, Mancini J, Dong-A-Zok F, Mundler O. Radioiodine Thyroid Ablation in Graves' Hyperthyroidism: Merits and Pitfalls. *World Journal of Nuclear Medicine* 2012;11:7–11. <https://doi.org/10.4103/1450-1147.98731>.
- [126] Jaeschke R, Guyatt G, Cook D, Harper S, Gerstein HC. Spectrum of quality of life impairment in hypothyroidism. *Quality of Life Research* 1994;3:323–7. <https://doi.org/10.1007/BF00451724>.
- [127] Träisk F, Tallstedt L, Abraham-Nordling M, Andersson T, Berg G, Calissendorff J, et al. Thyroid-Associated Ophthalmopathy after Treatment for Graves' Hyperthyroidism with Antithyroid Drugs or Iodine-131. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3700–7. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0747>.
- [128] Tallstedt L, Lundell G, Tørring O, Wallin G, Ljunggren J-G, Blomgren H, et al. Occurrence of Ophthalmopathy after Treatment for Graves' Hyperthyroidism. *New England Journal of Medicine* 1992;326:1733–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM199206253262603>.
- [129] Ponto KA, Zang S, Kahaly GJ. The Tale of Radioiodine and Graves' Orbitopathy. *Thyroid* 2010;20:785–93. <https://doi.org/10.1089/thy.2010.1640>.
- [130] Bartalena L, Marcocci C, Bogazzi F, Manetti L, Tanda ML, Dell'Unto E, et al. Relation between Therapy for Hyperthyroidism and the Course of Graves' Ophthalmopathy. *New England Journal of Medicine* 1998;338:73–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM199801083380201>.
- [131] Acharya SH, Avenell A, Philip S, Burr J, Bevan JS, Abraham P. Radioiodine therapy (RAI) for Graves' disease (GD) and the effect on ophthalmopathy: a systematic review\*. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2008;69:943–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03279.x>.
- [132] Ma C, Xie J, Wang H, Li J, Chen S. Radioiodine therapy versus antithyroid medications for Graves' disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016;2016. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010094.pub2>.
- [133] Vannucchi G, Campi I, Covelli D, Dazzi D, Currò N, Simonetta S, et al. Graves' Orbitopathy Activation after Radioactive Iodine Therapy with and without Steroid Prophylaxis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009;94:3381–6. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0506>.
- [134] Bartalena L, Tanda ML, Piantanida E, Lai A. Glucocorticoids and outcome of radioactive iodine therapy for Graves' hyperthyroidism. *European Journal of Endocrinology* 2005;153:13–4. <https://doi.org/10.1530/eje.1.01938>.

- [135] Burch HB, Cooper DS. Management of Graves Disease. *JAMA* 2015;314:2544. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.16535>.
- [136] Lane LC, Cheetham TD, Perros P, Pearce SHS. New Therapeutic Horizons for Graves' Hyperthyroidism. *Endocr Rev* 2020;41:873–84. <https://doi.org/10.1210/edrev/bnaa022>.
- [137] Bartalena L, Piantanida E, Gallo D, Ippolito S, Tanda ML. Management of Graves' hyperthyroidism: present and future. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism* 2022;17:153–66. <https://doi.org/10.1080/17446651.2022.2052044>.
- [138] Jansson L, Vrolix K, Jahraus A, Martin KF, Wraith DC. Immunotherapy With Apitopes Blocks the Immune Response to TSH Receptor in HLA-DR Transgenic Mice. *Endocrinology* 2018;159:3446–57. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00306>.
- [139] Pearce SHS, Dayan C, Wraith DC, Barrell K, Olive N, Jansson L, et al. Antigen-Specific Immunotherapy with Thyrotropin Receptor Peptides in Graves' Hyperthyroidism: A Phase I Study. *Thyroid* 2019;29:1003–11. <https://doi.org/10.1089/thy.2019.0036>.
- [140] Furmaniak J, Sanders J, Sanders P, Li Y, Rees Smith B. TSH receptor specific monoclonal autoantibody K1-70TM targeting of the TSH receptor in subjects with Graves' disease and Graves' orbitopathy—Results from a phase I clinical trial. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2022;96:878–87. <https://doi.org/10.1111/cen.14681>.
- [141] Cheetham TD, Cole M, Abinun M, Allahabadia A, Barratt T, Davies JH, et al. Adjuvant Rituximab—Exploratory Trial in Young People With Graves Disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2022;107:743–54. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab763>.
- [142] Vannucchi G, Covelli D, Currò N, Dazzi D, Maffini A, Campi I, et al. Serum BAFF Concentrations in Patients with Graves' Disease and Orbitopathy before and after Immunosuppressive Therapy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012;97:E755–9. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2614>.
- [143] Kahaly GJ, Stan MN, Frommer L, Gergely P, Colin L, Amer A, et al. A Novel Anti-CD40 Monoclonal Antibody, Iscalimab, for Control of Graves Hyperthyroidism—A Proof-of-Concept Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;105:696–704. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz013>.
- [144] Pkala J, Patkowska-Sokoa B, Bodkowski R, Jamroz D, Nowakowski P, Lochyski S, et al. L-Carnitine-Metabolic Functions and Meaning in Humans Life. vol. 12. 2011.
- [145] Eichler K, Seim H, Kleber H-P. L-Carnitine and Its Precursor, gamma-Butyrobetaine. *Nutraceuticals in Health and Disease Prevention*, CRC Press; 2001. <https://doi.org/10.1201/9780203908174.ch12>.
- [146] Demarquoy J, Georges B, Rigault C, Royer M-C, Clairet A, Soty M, et al. Radioisotopic determination of l-carnitine content in foods commonly eaten in Western countries. *Food Chemistry* 2004;86:137–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.023>.
- [147] Vaz FM, Wanders RJA. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochemical Journal* 2002;361:417. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3610417>.
- [148] Bahl J, Navin T, Manian AA, Bressler R. Carnitine transport in isolated adult rat heart myocytes and the effect of 7,8-diOH chlorpromazine. *Circulation Research* 1981;48:378–85. <https://doi.org/10.1161/01.RES.48.3.378>.
- [149] Berardi S, Stieger B, Hagenbuch B, Carafoli E, Krähenbühl S. Characterization of L-carnitine transport into rat skeletal muscle plasma membrane vesicles. *European*

- Journal of Biochemistry 2000;267:1985–94. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01198.x>.
- [150] Nacz K. Carnitine: transport and physiological functions in the brain. *Molecular Aspects of Medicine* 2004;25:551–67. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.06.001>.
- [151] Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, et al. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nature Genetics* 1999;21:91–4. <https://doi.org/10.1038/5030>.
- [152] Karlic H, Lohninger A, Laschan C, Lapin A, Böhmer F, Huemer M, et al. Downregulation of carnitine acyltransferases and organic cation transporter OCTN2 in mononuclear cells in healthy elderly and patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of Molecular Medicine* 2003;81:435–42. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0447-6>.
- [153] Roger Brown H, Hong Ni, Benavides G, Yoon L, Hyder K, Giridhar J, et al. Correlation of Simultaneous Differential Gene Expression in the Blood and Heart with Known Mechanisms of Adriamycin-Induced Cardiomyopathy in the Rat. *Toxicologic Pathology* 2002;30:452–69. <https://doi.org/10.1080/01926230290105604>.
- [154] Evans AM, Fornasini G. *Pharmacokinetics of L-Carnitine*. vol. 42. 2003.
- [155] Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 2001;1546:21–43. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00147-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00147-9).
- [156] Seline K, Johein H. The determination of l-carnitine in several food samples. *Food Chemistry* 2007;105:793–804. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.058>.
- [157] Rebouche CJ, Chenard CA. Metabolic Fate of Dietary Carnitine in Human Adults: Identification and Quantification of Urinary and Fecal Metabolites. *The Journal of Nutrition* 1991;121:539–46. <https://doi.org/10.1093/jn/121.4.539>.
- [158] Ramsay RR. The carnitine acyltransferases: modulators of acyl-CoA-dependent reactions. *Biochemical Society Transactions* 2000;28:182–6. <https://doi.org/10.1042/bst0280182>.
- [159] van der Leij FR, Huijkman NCA, Boomsma C, Kuipers JRG, Bartelds B. Genomics of the Human Carnitine Acyltransferase Genes. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000;71:139–53. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3055>.
- [160] Mojadadi A, Au A, Salah W, Witting P, Ahmad G. Role for selenium in metabolic homeostasis and human reproduction. *Nutrients* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/nu13093256>.
- [161] Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2012;16:705–43. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4145>.
- [162] Mangiapane E, Pessione A, Pessione E. Selenium and Selenoproteins: An Overview on Different Biological Systems. *Current Protein & Peptide Science* 2014;15:598–607. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140608151134>.
- [163] Combs GF. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition* 2001;85:517–47. <https://doi.org/10.1079/BJN2000280>.
- [164] Finley JW. Bioavailability of Selenium from Foods. *Nutrition Reviews* 2006;64:146–51. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2006.tb00198.x>.

- [165] Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA Journal* 2014;12. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3846>.
- [166] Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, D.C.: National Academies Press; 2000. <https://doi.org/10.17226/9810>.
- [167] Guidelines for Drinking-water Quality THIRD EDITION INCORPORATING THE FIRST AND SECOND ADDENDA Volume 1 Recommendations Geneva 2008 WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2008.
- [168] Gorini F, Sabatino L, Pingitore A, Vassalle C. Selenium: An element of life essential for thyroid function. *Molecules* 2021;26. <https://doi.org/10.3390/molecules26237084>.
- [169] Ventura M, Melo M, Carrilho F. Selenium and thyroid disease: From pathophysiology to treatment. *International Journal of Endocrinology* 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1297658>.
- [170] Yang G, Zhou R, Yin S, Gu L, Yan B, Liu Y, et al. Studies of safe maximal daily dietary selenium intake in a seleniferous area in China. I. Selenium intake and tissue selenium levels of the inhabitants. *Journal of trace elements and electrolytes in health and disease* 1989;3:77–87.
- [171] Yang G, Yin S, Zhou R, Gu L, Yan B, Liu Y, et al. Studies of safe maximal daily dietary Se-intake in a seleniferous area in China. Part II: Relation between Se-intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. *Journal of trace elements and electrolytes in health and disease* 1989;3:123–30.
- [172] Yang G, Zhou R. Further observations on the human maximum safe dietary selenium intake in a seleniferous area of China. *human maximum safe dietary selenium intake in a seleniferous area of China. J Trace Elem Electrolytes Health* 1994;8:159–65.
- [173] Fairweather-Tait SJ, Collings R, Hurst R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2010;91:1484S-1491S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674J>.
- [174] Wastney ME, Combs GF, Canfield WK, Taylor PR, Patterson KY, Hill AD, et al. A Human Model of Selenium that Integrates Metabolism from Selenite and Selenomethionine1–3. *The Journal of Nutrition* 2011;141:708–17. <https://doi.org/10.3945/jn.110.129049>.
- [175] Schrauzer GN. Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. *The Journal of Nutrition* 2000;130:1653–6. <https://doi.org/10.1093/jn/130.7.1653>.
- [176] Holben DH, Smith AM, Ilich JZ, Landoll JD, Holcomb JP, Matkovic V. Selenium Intakes, Absorption, Retention, and Status in Adolescent Girls. *Journal of the American Dietetic Association* 2002;102:1082–7. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(02\)90244-0](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(02)90244-0).
- [177] Hawkes WC, Alkan FZ, Oehler L. Absorption, Distribution and Excretion of Selenium from Beef and Rice in Healthy North American Men. *Journal of Nutrition* 2003;133:3434–42. <https://doi.org/10.1093/jn/133.11.3434>.
- [178] Bügel SH, Sandström B, Larsen EH. Absorption and retention of selenium from shrimps in man. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2001;14:198–204. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(01\)80002-X](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(01)80002-X).

- [179] Bügel S, Sandström B, Skibsted LH. Pork meat: A good source of selenium? *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2004;17:307–11. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(04\)80033-6](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(04)80033-6).
- [180] Burk RF, Norsworthy BK, Hill KE, Motley AK, Byrne DW. Effects of Chemical Form of Selenium on Plasma Biomarkers in a High-Dose Human Supplementation Trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2006;15:804–10. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0950>.
- [181] Gammelgaard B, Bendahl L. Selenium speciation in human urine samples by LC- and CE-ICP-MS—separation and identification of selenosugars. *J Anal At Spectrom* 2004;19:135–42. <https://doi.org/10.1039/B307539G>.
- [182] Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P—Expression, functions, and roles in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2009;1790:1441–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.026>.
- [183] Rayman MP. The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society* 2002;61:203–15. <https://doi.org/10.1079/PNS2002153>.
- [184] Stadtman TC. Selenocysteine. *Annual Review of Biochemistry* 1996;65:83–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.000503>.
- [185] Kryukov G V., Castellano S, Novoselov S V., Lobanov A V., Zehtab O, Guigó R, et al. Characterization of Mammalian Selenoproteomes. *Science* (1979) 2003;300:1439–43. <https://doi.org/10.1126/science.1083516>.
- [186] Benvenga S, Lakshmanan M, Trimarchi F. Carnitine Is a Naturally Occurring Inhibitor of Thyroid Hormone Nuclear Uptake. *Thyroid* 2000;10:1043–50. <https://doi.org/10.1089/thy.2000.10.1043>.
- [187] Benvenga S, Ruggeri RM, Russo A, Lapa D, Campenni A, Trimarchi F. Usefulness of l-Carnitine, A Naturally Occurring Peripheral Antagonist of Thyroid Hormone Action, in Iatrogenic Hyperthyroidism: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001;86:3579–94. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.8.7747>.
- [188] Benvenga S, Amato A, Calvani M, Trimarchi F. Effects of carnitine on thyroid hormone action. *Ann NY Acad Sci*, vol. 1033, New York Academy of Sciences; 2004, p. 158–67. <https://doi.org/10.1196/annals.1320.015>.
- [189] Strack E, Woratz G, Rotzsch W. Effects of carnitine in hyperfunction of the thyroid gland. *Endokrinologie* 1959;38:218–25.
- [190] Benvenga S, Feldt-Rasmussen U, Bonofiglio D, Asamoah E. Nutraceutical supplements in the thyroid setting: Health benefits beyond basic nutrition. *Nutrients* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/nu11092214>.
- [191] Gilgore SG, DeFelice SL. Evaluation of Carnitine—An Antagonist of Thyroid Hormone. *Clinical Pharmacology Report. The Journal of New Drugs* 1966;6:349–50. <https://doi.org/10.1177/009127006600600606>.
- [192] DeFelice SL, Gilgore SG. The Antagonistic Effect of Carnitine In Hyperthyroidism. *Preliminary Report. The Journal of New Drugs* 1966;6:351–3. <https://doi.org/10.1177/009127006600600607>.
- [193] Benvenga S, Lapa D, Cannavò S, Trimarchi F. Successive thyroid storms treated with L-carnitine and low doses of Methimazole. *The American Journal of Medicine* 2003;115:417–8. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(03\)00399-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(03)00399-1).

- [194] Nordio M. A novel treatment for subclinical hyperthyroidism: a pilot study on the beneficial effects of l-carnitine and selenium. *European review for medical and pharmacological sciences* 2017;21:2268–73.
- [195] Maebashi M, Kawamura N, Sato M, Imamura A, Yoshinaga K, Suzuki M. Urinary excretion of carnitine in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism: Augmentation by thyroid hormone. *Metabolism* 1977;26:351–6. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(77\)90101-9](https://doi.org/10.1016/0026-0495(77)90101-9).
- [196] Winther KH, Rayman MP, Bonnema SJ, Hegedüs L. Selenium in thyroid disorders — essential knowledge for clinicians. *Nature Reviews Endocrinology* 2020;16:165–76. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0311-6>.
- [197] Schomburg L, Köhrle J. On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. *Molecular Nutrition & Food Research* 2008;52:1235–46. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700465>.
- [198] Schomburg L. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology* 2012;8:160–71. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.174>.
- [199] Callebaut I, Curcio-Morelli C, Mornon J-P, Gereben B, Buettner C, Huang S, et al. The Iodothyronine Selenodeiodinases Are Thioredoxin-fold Family Proteins Containing a Glycoside Hydrolase Clan GH-A-like Structure. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:36887–96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305725200>.
- [200] Baqui MMA, Gereben B, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. Distinct Subcellular Localization of Transiently Expressed Types 1 and 2 Iodothyronine Deiodinases as Determined by Immunofluorescence Confocal Microscopy. *Endocrinology* 2000;141:4309–12. <https://doi.org/10.1210/endo.141.11.7872>.
- [201] Bianco AC, da Conceição RR. The Deiodinase Trio and Thyroid Hormone Signaling, 2018, p. 67–83. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7902-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7902-8_8).
- [202] Dentice M, Salvatore D. Local impact of thyroid hormone inactivation. *Journal of Endocrinology* 2011;209:273–82. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0002>.
- [203] Curran JE, Jowett JBM, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J, et al. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nature Genetics* 2005;37:1234–41. <https://doi.org/10.1038/ng1655>.
- [204] Wu Q, Rayman MP, Lv H, Schomburg L, Cui B, Gao C, et al. Low Population Selenium Status Is Associated With Increased Prevalence of Thyroid Disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2015;100:4037–47. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2222>.
- [205] Bülow Pedersen I, Knudsen N, Carlé A, Schomburg L, Köhrle J, Jørgensen T, et al. Serum selenium is low in newly diagnosed Graves' disease: a population-based study. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2013;79:584–90. <https://doi.org/10.1111/cen.12185>.
- [206] Wertenbruch T, Willenberg H, Sagert C, Nguyen T-B-T, Bahlo M, Feldkamp J, et al. Serum Selenium Levels in Patients with Remission and Relapse of Graves Disease. *Medicinal Chemistry (Los Angeles)* 2007;3:281–4. <https://doi.org/10.2174/157340607780620662>.
- [207] Calissendorff J, Mikulski E, Larsen EH, Möller M. A Prospective Investigation of Graves' Disease and Selenium: Thyroid Hormones, Auto-Antibodies and Self-Rated Symptoms. *European Thyroid Journal* 2015;4:93–8. <https://doi.org/10.1159/000381768>.

- [208] Leo M, Bartalena L, Rotondo Dottore G, Piantanida E, Premoli P, Ionni I, et al. Effects of selenium on short-term control of hyperthyroidism due to Graves' disease treated with methimazole: results of a randomized clinical trial. *Journal of Endocrinological Investigation* 2017;40:281–7. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0559-9>.
- [209] Kahaly GJ, Riedl M, König J, Diana T, Schomburg L. Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Trial of Selenium in Graves Hyperthyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2017;102:4333–41. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01736>.
- [210] Wang L, Wang B, Chen S, Hou X, Wang X, Zhao S, et al. Effect of Selenium Supplementation on Recurrent Hyperthyroidism Caused by Graves' Disease: A Prospective Pilot Study. *Hormone and Metabolic Research* 2016;48:559–64. <https://doi.org/10.1055/s-0042-110491>.
- [211] Zheng H, Wei J, Wang L, Wang Q, Zhao J, Chen S, et al. Effects of Selenium Supplementation on Graves' Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018;2018:1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/3763565>.
- [212] Wang Y, Zhao F, Rijntjes E, Wu L, Wu Q, Sui J, et al. Role of Selenium Intake for Risk and Development of Hyperthyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2019;104:568–80. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01713>.
- [213] Lanzolla G, Marinò M, Marcocci C. Selenium in the Treatment of Graves' Hyperthyroidism and Eye Disease. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.608428>.
- [214] Lumyongsatien M, Bhaktikamala U, Thongtong P, Sintuwong S, Nimitwongsakul O, Kanokkantapong J, et al. Relative selenium insufficiency is a risk factor for developing severe Graves' orbitopathy: a case–control study. *BMJ Open Ophthalmology* 2021;6:e000713. <https://doi.org/10.1136/bmjophth-2021-000713>.
- [215] Khong JJ, Goldstein RF, Sanders KM, Schneider H, Pope J, Burdon KP, et al. Serum selenium status in Graves' disease with and without orbitopathy: a case–control study. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2014;80:905–10. <https://doi.org/10.1111/cen.12392>.
- [216] Dehina N, Hofmann PJ, Behrends T, Eckstein A, Schomburg L. Lack of Association between Selenium Status and Disease Severity and Activity in Patients with Graves' Ophthalmopathy. *European Thyroid Journal* 2016;5:57–64. <https://doi.org/10.1159/000442440>.
- [217] Rotondo Dottore G, Leo M, Casini G, Latrofa F, Cestari L, Sellari-Franceschini S, et al. Antioxidant Actions of Selenium in Orbital Fibroblasts: A Basis for the Effects of Selenium in Graves' Orbitopathy. *Thyroid* 2017;27:271–8. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0397>.

## ***Ringraziamenti***

*Ringrazio sentitamente il Professor Gianluca Aimaretti, per aver accettato di essere il mio relatore e per avermi accolta nel suo reparto con grande disponibilità.*

*Desidero rivolgere un ringraziamento particolare alla Dottoressa Chiara Mele, che con infinta pazienza e grande professionalità mi ha seguita in ogni passo per il completamento di questo progetto che, senza il suo prezioso apporto, non si sarebbe realizzato.*

*Ringrazio tutto il personale del reparto di Endocrinologia di Novara, per avermi insegnato tantissimo e per avermi fatta sentire a casa in questi ultimi anni.*

*Ringrazio i miei genitori, Cristina e Corrado, che sono sempre stati e sempre saranno i miei più grandi punti di riferimento nella vita; hanno festeggiato con me i miei traguardi e sofferto con me per i miei insuccessi, sostenendomi e facendomi sentire in ogni momento tutto il loro sconfinato amore.*

*A loro devo tutto quello che sono e tutto quello che sarò.*

*Ringrazio le mie nonne, Anna e Laura, per tutto l'appoggio che non mi hanno mai fatto mancare e per il loro infinito affetto, grazie al quale ho sempre saputo trovare la forza e la speranza per affrontare ogni ostacolo lungo la strada.*

*Ringrazio i miei nonni Giulio e Piero, che porto sempre con me, nella parte più bella del mio cuore, e che in questo giorno così speciale riesco a sentire vicini anche se lontani.*

*Ringrazio anche tutto il resto della mia famiglia, i miei zii e le mie cugine, che hanno sempre creduto in me, anche quando io stessa non ci credevo, e che sono certa continueranno a supportarmi lungo tutto il mio cammino.*

*Ringrazio Riccardo, per esserci sempre e per avermi sostenuta, capita e spronata nei momenti in cui ne avevo più bisogno.*

*Ringrazio le mie compagne e, soprattutto, amiche Carola C., Carola M., Giorgia, Greta, Komal e Alessia che sono le compagne di viaggio migliori che potessi incontrare, per le quali sarò per sempre grata.*

*Infine, ringrazio la mia seconda famiglia che sono tutti i miei amici, che per mia immensa fortuna sono tanti e tutti speciali, che mi hanno sempre compresa e appoggiata.*

*In particolare, desidero ringraziare Clara, che mi sopporta da 15 lunghissimi anni, e Alessandra, Chiara, Elisa e Michela, compagne sul campo di pallavolo e amiche nella vita.*