

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACVLTADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

ESTVDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS
EN TIROIDITIS AVTOINMUNE

ROSA ANA IGLESIAS LÓPEZ

2015

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACVLTADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

ESTVDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS
EN TIROIDITIS AVTOINMUNE

ROSA ANA IGLESIAS LÓPEZ

DIRECTORES

PROF. D. JOSÉ MANVEL MIRALLES GARCÍA

CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

PROF. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO

CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

PROF. D. JOSÉ MANUEL MIRALLES GARCÍA
CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

PROF. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO
CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Estudio de polimorfismos genéticos en tiroiditis autoinmune” que presenta la Licenciada en Medicina Dña. Rosa Ana Iglesias López, ha sido realizado bajo su dirección y reúne, a su juicio, todos los requisitos necesarios para ser presentado ante el tribunal correspondiente, a fin de optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, se expide el presente certificado, en Salamanca, a 9 de Diciembre de 2015.

Prof. D. José Manuel Miralles García

Prof. D. Rogelio González Sarmiento

A mis padres

Me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han hecho posible la realización de este trabajo.

A los Profesores José Manuel Miralles García y Rogelio González Sarmiento que me confiaron la realización del estudio, por todo el tiempo y el esfuerzo que me han dedicado y por todo lo que he aprendido de ellos.

Al Servicio de Endocrinología del Hospital Clínico de Salamanca, por ser una parte indispensable de mi formación. A mis “resis”, por el apoyo que siempre me han ofrecido sin necesidad de pedirlo.

A todo el personal del Laboratorio de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca y, sobre todo, a Javier Fernández y Ricardo Usategui, por su inestimable contribución a este trabajo y su disponibilidad total.

A Mercedes Sánchez Barba, por su ayuda con el análisis estadístico.

A pacientes y controles, por su colaboración desinteresada.

A mis amigos, por los ánimos.

A Fabi y María, por su apoyo incondicional y por todos sus consejos. A mis sobrinos, por saber hacerme desconectar cuando era necesario.

A Santi, por su inagotable optimismo y por la inmensa paciencia de la que ha tenido que hacer acopio.

Y finalmente a mis padres, por su dedicación y entrega, porque todo lo que diga nunca podrá expresar todo el agradecimiento que siento.

ABREVIATURAS

Ala:	Aminoácido alanina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ARNsa:	Ribucleasa
ATG/Atg:	Relacionados con la autofagia (genes/proteínas)
ATP:	Adenosín trifosfato
CIAA:	Cloroformo alcohol isoamílico
CD:	Cúmulo de diferenciación, molécula de superficie de células T
CTLA-4:	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
ddH ₂ O:	Agua bidestilada
dNTPs:	Nucleótidos fosfatados
DM:	Diabetes mellitus
D.O.:	Densidad óptica
DUOX:	Dual oxidasa
EDTA:	Ácido etilendiamino-tetraacético
FOXP3:	Forkhead box P3
g:	Medida de aceleración en centrifugación
Gln:	Aminoácido glutamina
Glu:	Aminoácido ácido glutámico
HCl:	Ácido clorhídrico
HLA:	Antígenos leucocitarios humanos (en relación al complejo mayor de histocompatibilidad)
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
ICAM:	Molécula de adhesión intracelular
IFN:	Interferón
Ig:	Inmunoglobulina

IL:	Interleucinas
IMC:	Índice de masa corporal
KCl:	Cloruro potásico
L:	Litro
LES:	Lupus eritematoso sistémico
M:	Moles
Met:	Aminoácido metionina
MgCl ₂ :	Cloruro magnésico
ml:	Mililitro
mM:	Milimoles
mU:	Miliunidades
NCBI:	National Center for Biotechnology
nm:	Nanómetros
OMIM:	Online Mendelian Inheritance in Man (base de datos que cataloga las enfermedades conocidas con un componente genético), desarrollado para la World Wide Web por la National Center for Biotechnology Information
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OR:	Odds Ratio
PAAF:	Punción-aspiración con aguja fina
pb:	Pares de bases
PCR:	Siglas del inglés Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PKR:	Proteína cinasa R
PTPN22:	Tirosina fosfatasa 22
QRT-PCR:	Siglas del inglés Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa), cuantitativa, en tiempo real
rpm:	Revoluciones por minuto
SDS:	Siglas del inglés Sodium Dodecyl Sulfate (dodecilsulfato sódico)
SPN:	Siglas del inglés Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de un

	solo nucleótido)
STAT 6:	Transductor de señal y activador de transcripción 6
TDY:	Trastornos por déficit de yodo
TGF:	Factor de crecimiento transformante
Th:	T helper (colaborador)
Thr:	Aminoácido treonina
TNF:	Factor de necrosis tumoral
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano de fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$
TSH:	Hormona estimulante del tiroides, tirotropina
T3L:	Triyodotironina libre
T4L:	Tiroxina libre
UTR:	Siglas del inglés Untranslated Region (regiones no traducidas de los genes)
λ_{abs} :	Espectro de excitación
λ_{em} :	Espectro de emisión
μg :	Microgramos
$^{\circ}\text{C}$:	Grados centígrados

INTRODUCCIÓN	1
1. TIROIDITIS AUTOINMUNE	3
1.1. Definición.....	3
1.2. Epidemiología	4
1.3. Clínica	5
1.4. Diagnóstico.....	7
1.4.1. Diagnóstico serológico.....	7
1.4.2. Ecografía	8
1.4.3. Pruebas de función tiroidea	8
1.4.4. Histología y citología	8
1.5. Tratamiento	9
1.6. Patogénesis	9
1.7. Etiología	10
1.7.1. Factores genéticos.....	11
1.7.2. Factores ambientales.....	13
2. CITOCINAS INFLAMATORIAS Y SU PAPEL EN LA TIROIDITIS AUTOINMUNE	15
2.1. Introducción	15
2.2. IL-1 β	16
2.3. IL-4.....	17
2.4. IL-6.....	18
2.5. CD-40.....	20
3. AUTOFAGIA Y SU PAPEL EN LA TIROIDITIS AUTOINMUNE	21
3.1. Definición y funciones	21
3.2. Proceso de autofagia.....	22
3.3. Autofagia, sistema inmune y autoinmunidad.....	24
4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y TIROIDITIS AUTOINMUNE	26
4.1. Introducción	26
4.2. Polimorfismos en citocinas	27
4.2.1. Polimorfismos del gen <i>IL1B</i>	27
4.2.2. Polimorfismos del gen <i>IL4</i>	28
4.2.3. Polimorfismos del gen <i>IL6</i>	30
4.2.4. Polimorfismos del gen <i>CD40</i>	32
4.3. Polimorfismos en proteínas reguladoras de autofagia.....	33
4.3.1. Polimorfismos del gen <i>ATG2B</i>	33
4.3.2. Polimorfismos del gen <i>ATG5</i>	33
4.3.3. Polimorfismos del gen <i>ATG10</i>	34
4.3.4. Polimorfismos del gen <i>ATG16L1</i>	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
1. HIPÓTESIS	39

2. OBJETIVOS	40
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. SUJETOS DEL ESTUDIO	43
1.1. Pacientes.....	43
1.2. Controles	44
2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DEL ADN	44
2.1. Obtención de la muestra.....	44
2.2. Obtención de células mononucleadas de sangre periférica.....	45
2.3. Aislamiento del ADN total de alto peso molecular	45
2.4. Purificación del ADN.....	46
2.5. Cuantificación del ADN.....	46
3. ESTUDIO GENÉTICO DE POLIMORFISMOS	47
3.1. Polimorfismos estudiados	47
3.1.1. Polimorfismo -511 C>G del gen <i>IL1B</i> (rs 16944)	47
3.1.2. Polimorfismo -33T>C del gen <i>IL4</i> (rs2070874)	47
3.1.3. Polimorfismo -174 G>C del gen <i>IL6</i> (rs1800795)	48
3.1.4. Polimorfismo -1C>T del gen <i>CD40</i> (rs1883832)	48
3.1.5. Polimorfismo -4147 C>G del gen <i>ATG2B</i> (rs3759601)	48
3.1.6. Polimorfismo 106662741 C>G del gen <i>ATG5</i> (rs2245214).....	49
3.1.7. Polimorfismo -635 C>T del gen <i>ATG10</i> (rs1864183)	49
3.1.8. Polimorfismo +898 A>G del gen <i>ATG16L1</i> (rs2241880)	49
3.2. Estudio de polimorfismos mediante PCR en tiempo real	49
3.2.1. Descripción	49
3.2.2. Proceso.....	53
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
RESULTADOS	61
1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	63
1.1. Descripción de los casos	63
1.1.1. Edad y sexo	63
1.1.2. Antecedentes familiares	63
1.1.3. Consumo de sal yodada	64
1.1.4. Procedencia de zona endémica	64
1.1.5. Presencia de bocio	65
1.1.6. Estudio de anticuerpos antitiroideos	66
1.1.7. Función tiroidea.....	68
1.2. Descripción de los controles	69
2. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS	70
2.1. Polimorfismo -511 C>G del gen <i>IL1B</i> (rs 16944).....	70
2.1.1. Estudio caso-control	70

2.1.2. Estudio según las variables clínicas.....	71
2.2. Polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874)	75
2.2.1. Estudio caso-control.....	75
2.2.2. Estudio según las variables clínicas.....	76
2.3. Polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795).....	80
2.3.1. Estudio caso-control.....	80
2.3.2. Estudio según las variables clínicas.....	81
2.4. Polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832)	84
2.4.1. Estudio caso-control.....	84
2.4.2. Estudio según las variables clínicas.....	85
2.5. Polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601).....	89
2.5.1. Estudio caso-control.....	89
2.5.2. Estudio según las variables clínicas.....	90
2.6. Polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214).....	93
2.6.1. Estudio caso-control.....	93
2.6.2. Estudio según las variables clínicas.....	95
2.7. Polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183).....	98
2.7.1. Estudio caso-control.....	98
2.7.2. Estudio según las variables clínicas.....	99
2.8. Polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880).....	102
2.8.1. Estudio caso-control.....	102
2.8.2. Estudio según las variables clínicas.....	103
3. RESUMEN DE RESULTADOS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS ..	106
3.1. Estudio caso-control	106
3.2. Estudio en subgrupos según las variables clínicas	107
DISCVSIÓN	109
1. ESTUDIO DESCRIPTIVO	111
1.1. Edad.....	111
1.2. Antecedentes familiares	111
1.3. Consumo de sal yodada.....	111
1.4. Procedencia de zona endémica.....	112
1.5. Presencia de bocio	113
1.6. Estudio de anticuerpos antitiroideos	113
1.7. Estudio de funcionalidad tiroidea.....	114
2. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN CITOCINAS	115
2.1. Polimorfismo -511 C>G del gen IL1B (rs 16944).....	115
2.2. Polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874)	116
2.3. Polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795).....	118
2.4. Polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832)	119
2.5. Estudio por subgrupos en función de las variables clínicas	120
2.5.1. Polimorfismo -511 C>G del gen IL1B (rs 16944) y procedencia de zona endémica	120

2.5.2. Polimorfismo -33T>C del gen IL 4 (rs2070874) y consumo de sal yodada	121
3. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN AUTOFAGIA	122
3.1. Polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601)	122
3.2. Polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214)	123
3.3. Polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183)	125
3.4. Polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880)	126
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	133
ANEXOS	153

INTRODVCCIÓN

1. TIROIDITIS AUTOINMUNE

1.1. Definición

La tiroiditis autoinmune es un proceso inflamatorio crónico incluido dentro de los trastornos autoinmunes que afectan a la glándula. Se caracteriza por la presencia de una infiltración linfocítica glandular y de autoanticuerpos específicos del tiroides ^(1,2).

Fue descrita originalmente por Hashimoto en pacientes con agrandamiento de la glándula tiroides (bocio), que es la característica clínica más común, aunque puede presentarse también sin bocio, o con atrofia glandular en su variante atrófica. Clínicamente puede asociar un hipotiroidismo que, de manera habitual, se instaura insidiosa y lentamente.

Actualmente se considera la enfermedad autoinmune órgano-específica más común ^(3,4), una de las patologías endocrinológicas más frecuentes ⁽⁵⁾, así como la causa más habitual de hipotiroidismo ^(6,7).

La tiroiditis autoinmune se engloba en el conjunto de la “enfermedad autoinmune tiroidea”. Este complejo abarca un espectro de patologías que incluyen la tiroiditis autoinmune en sus diferentes variantes, la enfermedad de Graves-Basedow, la tiroiditis postparto y la tiroiditis silente. Todas ellas comparten una base genética que, influida por la exposición a factores ambientales, conlleva el desarrollo de una reacción autoinmune contra antígenos de la glándula tiroidea. Entre las diversas variantes existen diferencias en cuanto a la alteración funcional tiroidea y la afectación estructural glandular, la duración de la patología, y la extensión a otras localizaciones anatómicas ⁽⁸⁾.

Múltiples estudios sugieren que los pacientes con tiroiditis autoinmune presentan un incremento del riesgo de desarrollar un carcinoma papilar de tiroides. Como en la tiroiditis autoinmune, en el carcinoma papilar se objetiva un intenso infiltrado inmune que parece tener un papel esencial en la regulación de la carcinogénesis y en la progresión de la enfermedad; las moléculas proinflamatorias producidas por el infiltrado inmune contribuyen a la regulación de los procesos celulares del inicio y la progresión del tumor, en particular en la proliferación celular, apoptosis, autofagia, angiogénesis y

metástasis ^(9,10). Otra rara pero importante complicación de la tiroiditis autoinmune es el linfoma tiroideo, cuya frecuencia está incrementada en estos pacientes ^(11,12).

La tiroiditis autoinmune puede asociarse frecuentemente a otras enfermedades autoinmunes, endocrinológicas o no, como la gastritis crónica atrófica, la insuficiencia suprarrenal, el vitíligo, la diabetes mellitus tipo 1, el fallo gonadal primario, la esclerodermia, el lupus eritematoso sistémico o el síndrome de Sjögren ^(13,14).

1.2. Epidemiología

Existen diferencias geográficas sustanciales en la incidencia y prevalencia de la tiroiditis autoinmune, probablemente asociadas a las diferencias raciales y a diferencias en los factores ambientales que pueden influir en el desarrollo de la enfermedad ⁽⁴⁾. En estudios españoles se estimó una incidencia de 47,1 casos/100.000 habitantes/año en mujeres y 2,1 casos/100.000 habitante/año en hombres ⁽¹⁵⁾.

Tal y como se ha referido, las mujeres tienen mucho mayor riesgo de presentar esta patología que los hombres ⁽⁴⁾, de manera similar a la epidemiología de otras enfermedades autoinmunes. Se objetiva un predominio en el sexo femenino con una ratio en torno al 10/1.

La presencia de anticuerpos antitiroideos es muy común y su frecuencia aumenta con la edad (10-15% en mujeres y 3% en hombres); se asocia con el desarrollo eventual de hipotiroidismo, que también es más común con el avance de los años ⁽⁴⁾, siendo más frecuente en edades medias de la vida entre los 30 y 50 años.

Existen algunos factores ambientales que desempeñan un papel en la etiopatogenia de la enfermedad; de este modo se ha constatado que las poblaciones yodosuficientes tienen mayor incidencia de tiroiditis e hipotiroidismo ^(16,17). Si la población yododeficiente se desplaza a zonas de yodosuficiencia también se incrementa la prevalencia de anticuerpos antitiroideos y de hipotiroidismo ⁽⁴⁾. Fumar se asocia con una menor prevalencia de anticuerpos antitiroideos positivos, pese a estar relacionado con una mayor incidencia de enfermedad de Graves-Basedow que también forma parte del espectro de la enfermedad autoinmune tiroidea ⁽⁴⁾.

1.3. Clínica

Las características clínicas incluyen manifestaciones locales y sistémicas, con peculiaridades específicas según las diferentes formas de tiroiditis autoinmune.

Las manifestaciones locales de la forma clásica (tiroiditis de Hashimoto) derivan de la existencia de un agrandamiento glandular (bocio) por estimulación crónica por la TSH (hormona estimulante del tiroides), que generalmente se desarrolla de manera muy lenta. Inicialmente los pacientes presentan un bocio difuso que, con los años, puede adquirir un carácter multinodular y de consistencia progresivamente más firme, por la fibrosis que se va desarrollando. En algunos casos puede llegar a comprimir las estructuras cervicales que anatómicamente se localizan junto al tiroides, si éste alcanza gran tamaño. El paciente puede presentar disfonía (por afectación del nervio recurrente laríngeo), disnea (por compresión y disminución del calibre traqueal) y disfagia (por compresión esofágica).

Estas manifestaciones locales no aparecen en la forma atrófica de la tiroiditis autoinmune, en la que la existencia de anticuerpos contra el receptor de TSH que actúan como antagonistas de tirotropina condiciona la ausencia de bocio; los anticuerpos bloqueantes contra el receptor de TSH inhiben la acción de la tirotropina sobre el tiroides ocasionando la atrofia glandular y la pérdida de funcionalidad (hipotiroidismo) de manera más precoz e intensa.

Las manifestaciones sistémicas derivan de la disfunción tiroidea (pérdida de funcionalidad glandular) y el consecuente establecimiento de hipotiroidismo primario. Una pequeña proporción de enfermos con tiroiditis autoinmune pueden presentar un cuadro de hipertiroidismo denominado hashitoxicosis, pero la disfunción tiroidea que acompaña habitualmente a la tiroiditis autoinmune es el hipotiroidismo. Debido a la compleja y extensa acción de las hormonas tiroideas en múltiples órganos y tejidos, los signos y síntomas del hipotiroidismo son numerosos y variables, y presentan diferente intensidad según la severidad del cuadro.

En el sistema gastrointestinal destaca como manifestación clínica el estreñimiento. La peristalsis intestinal está disminuida y ocasionalmente pueden desarrollarse cuadros de pseudo-obstrucción intestinal e íleo. La hipotonía de la vesícula

y las alteraciones en la composición de la bilis pueden conllevar un aumento en la formación de cálculos biliares.

La piel está seca, amarillenta, fría y engrosada debido al depósito subcutáneo de mucopolisacáridos y a la atrofia de las glándulas sudoríparas; el cabello es quebradizo y aumenta su caída, y las uñas son delgadas y frágiles.

Afecta al sistema cardiovascular provocando bradicardia y reducción del gasto cardíaco. Puede aparecer cardiomegalia por infiltración mixoide. La enfermedad coronaria es común en pacientes hipotiroideos debido al efecto de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo lipídico, con aumento de los niveles de colesterol (factor aterogénico).

Pueden aparecer calambres y molestias musculares por infiltración mixedematosa del tejido conectivo.

La anemia es común en el hipotiroidismo. También puede haber alteración en factores de coagulación y adhesividad plaquetaria.

Existe afectación neuro-psiquiátrica con incapacidad de concentración, pérdida de memoria y depresión. También se ha descrito el cuadro de encefalopatía de Hashimoto, complicación muy infrecuente, relacionada con la elevación de los anticuerpos antitiroideos y sin presencia de alteración funcional tiroidea.

Puede afectar al sistema reproductor, siendo frecuente la aparición de oligomenorrea o de metrorragia en las mujeres y de disfunción eréctil y disminución de libido en hombres.

En la actualidad, y debido a la realización de exploraciones analíticas de rutina en las consultas médicas, la mayoría de los pacientes que presentan tiroiditis autoinmune están asintomáticos u oligosintomáticos, siendo diagnosticados únicamente por la positividad de los anticuerpos y/o por disfunciones tiroideas subclínicas leves. Los estudios reflejan una demora en el diagnóstico desde la instauración de la patología de un mínimo de 7 años ⁽¹⁸⁾.

1.4. Diagnóstico

El diagnóstico actual de la tiroiditis autoinmune se establece por la combinación de características clínicas, presencia en el suero de anticuerpos contra antígenos tiroideos (contra tiroglobulina y peroxidasa) y valoración de imagen en ecografía.

La gammagrafía tiroidea no se emplea de manera habitual en la clínica. En la forma atrófica no hay (o es muy débil) imagen glandular y en la bociosa el patrón es inespecífico, como el que se observa en los bocios multinodulares.

La PAAF (punción aspiración con aguja fina) con examen citológico de aspirado tiroideo se realiza en caso de duda diagnóstica, o si existen nódulos tiroideos con signos ecográficos que precisen la prueba.

1.4.1. Diagnóstico serológico

La detección de anticuerpos contra la peroxidasa tiroidea se considera actualmente el mejor marcador serológico para establecer el diagnóstico de tiroiditis autoinmune. Se encuentran en el 95% de pacientes y son raros en controles sanos (aunque pueden aparecer a títulos bajos en personas de edad avanzada, principalmente mujeres). El título de anticuerpos antiperoxidasa se correlaciona bien con el número de linfocitos auto-reactivos que infiltran el tiroides ⁽¹⁹⁾.

Los anticuerpos contra la tiroglobulina, la proteína más abundante de la glándula tiroidea, son menos sensibles (positivos solo en el 60-80% de pacientes con la enfermedad) y menos específicos que los anticuerpos antiperoxidasa ⁽²⁰⁾.

Existe una pobre correlación entre ambos anticuerpos; diferentes estudios sugieren que representan dos aspectos distintos de la respuesta autoinmune contra la glándula tiroidea: los antitiroglobulina la respuesta innata inicial y los antiperoxidasa la respuesta inmune adaptativa posterior, a modo de escalada de inmunidad. Según esto, es esperable que los anticuerpos antiperoxidasa sean más prevalentes y a títulos más altos en estos pacientes, ya que el diagnóstico de la enfermedad suele ser tardío por la latencia en la presencia de clínica ⁽²¹⁾.

1.4.2. Ecografía

En la tiroiditis autoinmune se observa característicamente una disminución de la ecogenicidad, que representa la destrucción folicular y su reemplazamiento por infiltrado linfocítico ⁽²²⁾.

En la tiroiditis de Hashimoto se puede objetivar la desestructuración y heterogeneidad del parénquima tiroideo, que puede evolucionar a la multinodularidad con la visualización de estructuras nodulares sólidas y mixtas (sólido-quísticas).

En las formas atróficas puede observarse ecográficamente una fibrosis intersticial en bandas, que ocasiona la tendencia a la retracción e hipoplasia glandular, y que aparece como bandas claras sobre el fondo oscuro del tiroides hipoecogénico habitual en las tiroiditis crónicas.

1.4.3. Pruebas de función tiroidea

La función tiroidea se evalúa mediante la determinación de niveles séricos de tirotropina, triyodotironina libre (T3L) y tiroxina libre (T4L) principalmente. La TSH es el marcador fundamental para monitorizar la función tiroidea ya que sus niveles se ajustan de manera precisa incluso a variaciones mínimas en los niveles circulantes de hormonas tiroideas.

1.4.4. Histología y citología

Si realizamos un estudio histológico de la glándula con tiroiditis autoinmune, podemos encontrar un infiltrado difuso linfo-plasmático (principalmente de células T, aunque también hay presencia de células B y plasmáticas), y formación de folículos linfoides, muchos de los cuales presentan centros germinales bien desarrollados. Existe también fibrosis de extensión variable, pero no se considera un criterio diagnóstico. Otra característica distintiva es la presencia de células foliculares oxifílicas alargadas con abundantes gránulos eosinofílicos en su citoplasma, conocidas como células de Hürtle que pueden considerarse como una respuesta metaplásica del epitelio cúbico normal en el curso del daño por la tiroiditis ⁽²³⁾.

La punción aspiración con aguja fina se realiza principalmente en el estudio de

nódulos tiroideos, que aparecen de manera frecuente en el contexto de la tiroiditis autoinmune.

El análisis citológico del aspirado muestra habitualmente una población polimórfica de células linfoides acompañado de células de Hürtle. Estos linfocitos están habitualmente en contacto con grupos de células del epitelio folicular tiroideo.

1.5. Tratamiento

El tratamiento de la tiroiditis autoinmune es el de sus síntomas locales y sistémicos, y es habitualmente médico.

El tratamiento quirúrgico con tiroidectomía se reserva para aquellos casos de compresión cervical severa, o citologías sospechosas de malignidad en las que se precisa descartar la existencia concomitante de un cáncer de tiroides.

El tratamiento del hipotiroidismo primario consiste en la administración diaria y continuada por vía oral de levotiroxina sintética. Constituye un tratamiento sintomático no dirigido a la patogénesis de la enfermedad.

Se precisarían estudios que investigasen en las diferentes vías etiopatogénicas en la búsqueda de soluciones de larga duración y libres de medicación y que por tanto desembocasen en una cura de la enfermedad y no en un simple reemplazo de hormonas deficitarias en una patología crónica e incurable ⁽¹⁾.

1.6. Patogénesis

Las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, presentan epitopos inmunogénicos de tiroglobulina a las células T en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II. Se requiere también la presencia de señales coestimuladoras que pueden realizar estimulación o regulación a la baja de las células T.

En función del tipo de citocinas secretadas por estas células dendríticas, se puede iniciar una respuesta inmune tipo célula T helper 1, célula T helper 2 o célula T helper 17. Las células Th1 segregan principalmente IFN- γ (interferón gamma) e IL-12

(interleucina 12) que son citocinas proinflamatorias, mientras que las células Th2 segregan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que son citocinas antiinflamatorias. Se ha demostrado que las células Th1 y Th17 infiltran el tiroides resultando en una inflamación crónica y en la muerte de las células epiteliales tiroideas ⁽²⁾. La ratio periférica de células Th1 frente a Th2 se relaciona con la severidad de la enfermedad, objetivándose proporción de células Th1 más elevada y de células Th2 más baja en los pacientes con formas más agresivas y de peor evolución clínica ⁽²⁴⁾.

El mecanismo de daño celular en la autoinmunidad tiroidea incluye citotoxicidad dependiente de anticuerpos, apoptosis de células tiroideas mediada por Fas/fas-ligando, efecto citotóxico directo de las células T con moléculas de superficie CD8+ y CD4+ y la vía de exocitosis de gránulos ⁽²⁵⁾. También están implicadas células Natural Killer activadas por linfoquinas. El mecanismo humoral responde al efecto citotóxico mediado por complemento de los anticuerpos antiperoxidasa tiroidea ⁽²⁶⁾.

El desarrollo del hipotiroidismo se debe a la destrucción del epitelio folicular y, según modelos más actuales de patogenia, también al efecto inhibitorio de la función tiroidea por la exposición a citocinas proinflamatorias (IFN- γ , factor de necrosis tumoral TNF- α).

1.7. Etiología

La principal cuestión a resolver es el porqué de la pérdida de auto-tolerancia y el inicio de la respuesta autoinmune. De manera similar a otras enfermedades autoinmunes, la pérdida de tolerancia a antígenos tiroideos envuelve una compleja interrelación entre factores ambientales y genéticos.

La elevada frecuencia con que las enfermedades autoinmunes afectan a miembros de la misma familia y la concordancia significativamente mayor de esta patología en gemelos monocigóticos que en dicigóticos ^(27,28) sugieren la existencia de un componente genético en la etiología de la enfermedad. El hecho de que la concordancia en gemelos monocigóticos sea menor del 100% indica que los factores ambientales también tienen una importancia esencial en la etiología de las enfermedades autoinmunes tiroideas. De este modo, se asume que la tiroiditis autoinmune está

causada por los efectos combinados de múltiples genes de susceptibilidad y factores ambientales que pueden afectar tanto a la glándula tiroidea como al sistema inmune ⁽²⁸⁻³⁰⁾.

1.7.1. Factores genéticos

La investigación para identificar los genes que influyen en el desarrollo de enfermedades complejas como la tiroiditis autoinmune se desarrolla en cuatro pasos.

El primero es el estudio de genes candidatos, que son aquellos genes que, basándose en su función biológica, podrían estar implicados en la patogénesis de la enfermedad. El primer candidato estudiado en la tiroiditis autoinmune fue el gen HLA-DR (antígeno leucocitario humano) que se confirmó como gen de susceptibilidad para la enfermedad. También se identificó así el gen CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico).

El segundo método es el rastreo de ligamiento del conjunto del genoma, que permite escanear el genoma completo sin asumir *a priori* genes implicados en la patogénesis de la enfermedad; se realiza testando un panel de marcadores que abarcan todo el genoma para intentar asociarlos con la enfermedad, en familias de pacientes con importante agregación de la patología; los marcadores que se emplean son polimorfismos que incluyen micro-satélites y polimorfismos de un solo nucleótido. Se han identificado así loci emparentados con la tiroiditis autoinmune y algunos de ellos se han podido secuenciar e identificar, como el gen CTLA-4 en el cromosoma 2q, o el gen de tiroglobulina en el cromosoma 8q.

El tercer método es el estudio de asociación de genoma completo, muy sensible para detectar genes que aportan menos del 5 % al total de la contribución genética de la enfermedad; realiza un análisis de asociación comparando la frecuencia del alelo estudiado en un conjunto de datos de pacientes y con controles apareados, estimando el riesgo relativo de presentar la enfermedad en un individuo que posee ese alelo frente a un individuo negativo.

El cuarto método y más reciente es la secuenciación del genoma completo. Se prevé que con su desarrollo en los próximos años será un método robusto para analizar

la secuencia de datos y diferenciar las variaciones normales entre individuos de aquéllas responsables de la susceptibilidad a enfermedades complejas.

Los hallazgos más destacados en el estudio del componente genético de la tiroiditis autoinmune pueden dividirse en varios grupos:

Genes de la sinapsis inmunológica:

Se trata de la interconexión entre la célula presentadora de antígenos y la célula T que se forma durante la activación de dicha célula, y que incluye péptidos antígenos, moléculas HLA clase II, el receptor de células T, moléculas coestimuladoras, integrinas y otras moléculas ⁽³¹⁾. Varios genes de susceptibilidad participan en este proceso sugiriendo que anomalías en la presentación del antígeno son mecanismos importantes para el desarrollo de la tiroiditis autoinmune.

Se han identificado varios genes:

El gen HLA-DR, región del complejo mayor de histocompatibilidad que codifica las glicoproteínas HLA y que es una región altamente polimórfica localizada en el cromosoma 6p21 ⁽³²⁾. Varios HLA-DR se han asociado a la tiroiditis autoinmune ^(33,34).

El gen CTLA-4, supresor de la activación de células T, del que se postula que polimorfismos que reducen su expresión y/o su funcionalidad podrían predisponer a la autoinmunidad por el desarrollo de células T más reactivas ^(2,29,35).

El gen de la tirosina fosfatasa 22 (PTPN22), que codifica la tirosina fosfatasa linfocítica y que es un regulador negativo de la activación de células T. Se ha asociado con la tiroiditis autoinmune el polimorfismo de un solo nucleótido constituido por una variación triptófano/arginina en la posición 620 ⁽³⁶⁾.

Genes de regulación de células T y genes de citocinas:

Los genes que regulan la acción de las células T tienen un papel esencial en la tolerancia a autoantígenos. Los genes FOXP3 (Forkhead box P3) y CD-25 se postulan como candidatos asociados a la enfermedad autoinmune tiroidea, por el momento con diferencias significativas en la vertiente de la enfermedad de Graves-Basedow. El gen FOXP3 es un factor regulador de la transcripción, que participa directamente en la

función de las células reguladoras T CD4+ humanas y murinas. CD-25 es la cadena alfa del receptor de IL-2.

Se han estudiado varios genes que codifican citocinas inflamatorias y cuyas alteraciones parecen influir en la severidad de la patología ⁽³⁷⁾.

El alelo T del polimorfismo +874 A>T en el gen IFN ocasiona un incremento en la producción de IFN por las células T Th1, asociándose con la severidad del hipotiroidismo en los pacientes con tiroiditis autoinmune ⁽³⁸⁾.

Se ha observado una mayor frecuencia de hipotiroidismo severo en los pacientes portadores del genotipo CC del polimorfismo -590 C>T en el gen IL4, consecuente con una menor producción de esta citocina Th2 que suprime la autoinmunidad celular ⁽³⁹⁾.

Los polimorfismos en el gen que codifica TGF (factor de crecimiento transformante), inhibidor de la producción de citocinas, se asocian también a la tiroiditis autoinmune. Ser portador del alelo T del polimorfismo +369 T>C conlleva una disminución en la secreción de TGF y se da de manera más frecuente en pacientes con formas severas de hipotiroidismo ⁽⁴⁰⁾.

Los portadores del alelo C del polimorfismo -1031 T>C en el gen TNF presentan una mayor concentración de esta citocina que estimula la producción de IFN, relacionándose así con el desarrollo de la tiroiditis autoinmune ⁽⁴¹⁾.

Genes específicos tiroideos:

La tiroglobulina es una de las principales dianas en la respuesta inmune que se produce en las enfermedades autoinmunes tiroideas ⁽⁴²⁾. Diferentes alelos de varios marcadores de microsatélites y polimorfismos de un solo nucleótido del gen de tiroglobulina se han relacionado con la tiroiditis autoinmune, ocasionando modificaciones en su expresión, capacidad antigénica, yodación, y unión a HLA ⁽³⁷⁾.

1.7.2. Factores ambientales

Los últimos estudios parecen demostrar un efecto protector del tabaco contra la enfermedad, disminuyendo el riesgo de desarrollo de anticuerpos antitiroideos y de hipotiroidismo de etiología autoinmune ^(4,43).

Los estudios realizados sobre el papel del selenio en la tiroiditis autoinmune han arrojado resultados controvertidos y por el momento no existe evidencia suficiente para recomendar la suplementación en los pacientes ^(43,44).

La vitamina D posee propiedades inmunomodulatorias y su deficiencia se ha identificado como factor de riesgo de varias enfermedades autoinmunes, como la DM (diabetes mellitus) tipo 1, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple o la enfermedad de Crohn. Sin embargo la situación respecto a la tiroiditis autoinmune aún no es clara ^(43,45).

La presencia de anticuerpos antitiroideos y de hipotiroidismo de etiología autoinmune es más frecuente en áreas de yodosuficiencia que en áreas de yododeficiencia. La ingesta dietética de yodo parece ser el factor ambiental más importante para desencadenar la reacción autoinmune en la enfermedad. La molécula de tiroglobulina altamente yodada es más inmunogénica que la pobremente yodada debido a la capacidad del yodo de modificar la accesibilidad de algunos de sus epitopos; de este modo, puede facilitar la absorción del antígeno y su procesamiento por las células presentadoras de antígeno ⁽⁴⁶⁾. Además de ello, altas dosis de yodo estimulan la funcionalidad de los macrófagos y las células dendríticas, e incrementan el número de células T circulantes y la producción de Ig (inmunoglobulina) G por las células B ^(2,4). El procesamiento del exceso de yodo en las células epiteliales tiroideas puede también desencadenar niveles elevados de estrés oxidativo que conllevan una oxidación dañina de los lípidos y daños en el tejido tiroideo ⁽⁴⁷⁾.

Se ha relacionado el desarrollo de algunas infecciones con un incremento de riesgo de tiroiditis autoinmune y, por tanto, pueden estar implicadas en su patogénesis; se ha vinculado la enfermedad con el virus de la hepatitis C ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾, los enterovirus ⁽⁵¹⁾ o con cambios en la microbiota intestinal ⁽⁵²⁾.

Determinados fármacos pueden inducir una tiroiditis autoinmune, como IFN- α ^(53,54).

2. CITOCINAS INFLAMATORIAS Y SU PAPEL EN LA TIROIDITIS AUTOINMUNE

2.1. Introducción

Las citocinas participan en la inducción y en las fases efectoras de la respuesta inmune e inflamatoria y, por lo tanto, juegan un papel esencial en el desarrollo de la autoinmunidad tiroidea.

La producción intracelular de citocinas no se restringe a las células mononucleares que infiltran la glándula, sino que implica también a las propias células del epitelio folicular tiroideo. Las citocinas que éstas producen tienen un papel esencial en estimular a las células T y facilitar su activación⁽⁵⁵⁾. También actúan en la regulación de la presentación del antígeno y la movilización de los linfocitos, mejorando la expresión de moléculas de adhesión y moléculas HLA clase II en las células foliculares tiroideas.

Los linfocitos intratiroideos y las células foliculares tiroideas han demostrado producir una gran variedad de citocinas que incluyen IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, TNF- α e IFN- γ .

El mecanismo de trabajo de las citocinas es una red compleja con funciones diversas y solapadas, incluyendo efectos que son promovidos o inhibidos por otras citocinas. Los perfiles de secreción de las citocinas puede considerarse pro o antiinflamatorio (respuesta de células T helper tipo 1 promoviendo la inmunidad celular como IL-2, TNF e IFN- γ *versus* respuesta de células T helper tipo 2 promoviendo la inmunidad humoral como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13).

A pesar de los intentos por clasificar la enfermedad autoinmune tiroidea como una respuesta clásica tipo Th1 o Th2, no se han obtenido conclusiones claras, y se ha objetivado la existencia de una respuesta mixta en la tiroiditis autoinmune, aunque con predominio de Th1.

A continuación se describe el papel patogénico objetivado en las citocinas implicadas en la etiopatogenia de la enfermedad.

2.2. IL-1 β

La familia de moléculas IL-1 es un componente integral de la compleja comunicación intracelular que se requiere para organizar y controlar la respuesta inmune.

IL-1 induce o mejora la expresión de múltiples moléculas inmunológicamente activas como moléculas de adhesión, otras citocinas, y proteínas reguladoras del complemento en las células epiteliales tiroideas. Por tanto IL-1 tiene un papel en las condiciones fisiopatológicas que contribuyen al desarrollo de la autoinmunidad tiroidea ⁽⁵⁶⁾.

IL-1 β es una citocina proinflamatoria que interviene en la etiopatogenia de la tiroiditis autoinmune mediante varios mecanismos objetivados.

Afecta a la función tiroidea estimulando la secreción de IL-6 y modificando la integridad del epitelio folicular mediante la alteración de las proteínas de unión. IL-1 β provoca un descenso en la expresión y en la redistribución de Claudina y Zo-1 en las células de unión ⁽⁵⁷⁾ de manera que modifica la unión epitelial de los tirocitos e incrementa la expresión de ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular-1) en las células tiroideas. Las moléculas de adhesión tienen un papel importante en el sistema inmune, participando en una variedad de mecanismos inflamatorios e inmunes que incluyen el reclutamiento de linfocitos y la selección de sus dianas. En las células tiroideas puede ser responsable parcial de la adhesión de los linfocitos, que es un paso esencial en el reconocimiento de los antígenos tiroideos por las células T en la tiroiditis autoinmune ⁽⁵⁸⁾.

IL-1 β aumenta la producción del glucosaminoglicano no sulfatado ácido hialurónico en los tirocitos y los fibroblastos. El ácido hialurónico se vuelve más abundante a consecuencia del proceso autoinmune y se acumula en el tejido tiroideo contribuyendo a aumentar el tejido glandular ⁽⁵⁹⁾.

La apoptosis por la vía metabólica de Fas y Fas ligando es un mecanismo potencial para la destrucción del tejido tiroideo que precede al hipotiroidismo clínico en la tiroiditis autoinmune. Existe controversia sobre si IL-1 β podría inducir la expresión

de Fas ⁽⁶⁰⁾.

IL-1 β en moderada o alta concentración inhibe la función de la célula tiroidea de manera reversible, mientras que a baja concentración estimula la funcionalidad tiroidea. Esta influencia bifásica, reversible y no citotóxica juega un papel en la regulación fisiológica de la función de la célula tiroidea. La concentración de IL-1 β está aumentada significativamente en el hipotiroidismo autoinmune frente a individuos sanos, por lo que puede considerarse como un marcador ⁽⁶¹⁾.

2.3. IL-4

IL-4 es una de las citocinas principales de la respuesta Th2, clave en la regulación de la respuesta inmune, que estimula la inmunidad humoral y suprime la producción de citocinas inflamatorias Th1 incluyendo IFN- γ ⁽³⁹⁾. De hecho, IL-4 es considerada como la citocina principal que polariza la respuesta inmune hacia una respuesta Th2 y, aunque el detonante inicial para su producción aún es desconocido, las variaciones genéticas podrían tener un papel importante en su función ^(62,63).

Ya en estudios antiguos (año 1989) se objetivó una reducción de la capacidad de producción de IL-4 en los linfocitos presentes en infiltrados tiroideos de pacientes con tiroiditis autoinmune respecto a pacientes con enfermedad de Graves-Basedow y controles sanos ⁽⁶⁴⁾.

La expresión de IL-4 en linfocitos CD4⁺ periféricos es significativamente menor en pacientes hipotiroideos que en pacientes eutiroideos con tiroiditis autoinmune o en sanos, siendo necesarios más estudios para esclarecer el papel exacto de los linfocitos periféricos en la patología y si pueden tener un papel como marcador fiable de implicación en la enfermedad ⁽⁶⁵⁾.

La citocina IL-4 es producida por las células T, mastocitos y eosinófilos; se han objetivado varios mecanismos que justificarían su influencia en la etiopatogenia de la enfermedad.

Se ha observado que IL-4 produce efectos relacionados con el crecimiento y la proliferación de células B y la producción de IgG e IgE sérica; además de ello puede

mejorar la producción de algunos precursores de células T citotóxicas y su subsecuente diferenciación en células T citotóxicas activas, dos sucesos que tienen un papel esencial en el desarrollo de la tiroiditis autoinmune ⁽⁶⁶⁾.

También estimula la expresión de antígenos de HLA clase II vía STAT6 (transductor de señal y activador de transcripción 6) ⁽⁶⁷⁾.

IL-4 bloquea la influencia que ejerce IFN- γ en la expresión de DUOX (dual oxidasa) y tioperoxidasa y en la secreción de tiroglobulina, de manera que puede anular la acción inhibitoria de las citocinas Th1 sobre la función tiroidea ⁽⁶⁸⁾. Las DUOX 1 y 2 constituyen los componentes mayores del sistema generador de H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) tiroideo que se requiere para la síntesis de hormona tiroidea. Los estudios revelan que se requiere IL-4 para la inducción de estos componentes ⁽⁶⁹⁾.

En cambio, la expresión de IL-4 está claramente incrementada en aquellos pacientes con tiroiditis autoinmune que asocian además otras patologías autoinmunes no endocrinológicas. Se postula que este hallazgo puede representar una herramienta de detección inicial de pacientes con tiroiditis autoinmune en los que es esperable el desarrollo de otras enfermedades autoinmunes ⁽⁷⁰⁾.

2.4. IL-6

La citocina IL-6 y su receptor forman parte del sistema que integra la respuesta inmune tipo 2 (son citocinas Th2). IL-6 es producida por fagocitos mononucleares, células dendríticas y células B y, siguiendo a su liberación por los monocitos, ejerce su efecto inflamatorio, resultando en la inducción de fiebre y en la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado. Además, es un factor de crecimiento y diferenciación importante para las células B y T y es capaz de modular la inmunidad tanto humoral como celular ⁽⁷¹⁾. De este modo, IL-6 tiene una importante labor en la inflamación y los procesos autoinmunes.

En estudios antiguos (1995) ya se objetivó la presencia de IL-6 en las células foliculares epiteliales de pacientes con tiroiditis autoinmune, relacionándose su presencia con estadios tempranos del proceso autoinmune ⁽⁷²⁾. La producción intracelular de citocinas no se restringe a las células mononucleares que infiltran la

glándula, sino que implica también a las propias células del epitelio folicular tiroideo⁽⁵⁵⁾. Las células foliculares tiroideas expresan IL-6 y esta expresión puede ser modulada por IL-1 e IFN- γ que la incrementan^(73,74).

La tiroiditis autoinmune se caracteriza por un incremento en la producción de IL-6, habiéndose encontrado un aumento significativo de IL-6 en suero de pacientes con tiroiditis autoinmune^(75,76). La expresión de IL-6 en los tirocitos se correlaciona con el grado de infiltración linfocítica^(76,77).

Varios mecanismos se han postulado como responsables de la influencia de IL-6 en la patogenia de la enfermedad.

La citocina IL-6 regula al alza la expresión de ICAM-1 en las células tiroideas. Las moléculas de adhesión tienen un papel importante en el sistema inmune, participando en una variedad de mecanismos inflamatorios e inmunes que incluyen el reclutamiento de linfocitos y la selección de sus dianas. En las células tiroideas puede ser responsable parcial de la adhesión de los linfocitos, que es un paso esencial en el reconocimiento de los antígenos tiroideos por las células T en la tiroiditis autoinmune y, por tanto, en las fases iniciales de su activación⁽⁵⁸⁾.

La producción intratiroidea de IL-6 tiene un papel esencial en la expresión de ciertos autoanticuerpos como antiperoxidasa⁽⁷⁸⁾. Cualquier alteración en la síntesis de IL-6 podría interferir con la autoinmunidad tiroidea y el desarrollo de la enfermedad.

Se ha objetivado en pacientes con bocio endémico la existencia de una correlación entre la presencia de valores elevados de IL-6 y presencia de IL-2 y anticuerpos antiperoxidasa, así como una correlación negativa con los niveles de T3 libre; en estos enfermos, IL-6 actúa estimulando la secreción de anticuerpos antitiroideos, incrementando así el riesgo de tiroiditis autoinmune⁽⁷⁹⁾.

Como curiosidad, se han encontrado correlaciones positivas entre niveles de IL-6, IMC (índice de masa corporal), índice cintura-cadera y leptina en estos pacientes⁽⁸⁰⁾. En un estudio realizado sobre mujeres obesas, aquéllas con tiroiditis autoinmune e hipotiroidismo subclínico tienen una mayor prevalencia de síndrome metabólico que las que presentan autoinmunidad negativa. Parece que el aumento en la secreción de

citocinas proinflamatorias, como IL-6, es el mecanismo subyacente en la relación entre el hipotiroidismo subclínico y el síndrome metabólico en estas pacientes ⁽⁸¹⁾.

2.5. CD-40

CD-40 es un miembro de la súper-familia del receptor de TNF que se expresa en gran variedad de tipos celulares, tanto inmunitarios como no inmunitarios. Es una molécula de activación crucial que se expresa por los linfocitos y otras células de la médula ósea y también en otros tipos celulares como fibroblastos, endotelio y células epiteliales. La interacción con su ligando media la respuesta de célula B dependiente de célula T y una activación eficiente de la célula T. Por tanto CD-40 es un candidato para ejercer un papel en enfermedades autoinmunes en que las células B y T activadas causen patología ⁽⁸²⁾.

En los pacientes con tiroiditis autoinmune las concentraciones séricas de CD-40 están elevadas. CD-40 podría ser útil como marcador del estado de actividad de la enfermedad autoinmune tiroidea ⁽⁸³⁾. Su expresión está aumentada en el tejido tiroideo de los pacientes con enfermedad de Graves-Basedow ⁽⁸⁴⁾. La interacción de CD-40 y CD-154 es indispensable para inducir tiroiditis autoinmune experimental, lo que indica su relación con la tiroiditis autoinmune ^(85,86).

Se ha objetivado la capacidad de expresión de CD-40 en células no linfoides de la glándula tiroidea: en fibroblastos de la glándula tiroidea ^(87,88) y especialmente en células foliculares tiroideas ^(87,89). Esto implicaría la potencial participación de CD-40 y su ligando en el diálogo entre las células tiroideas y las células linfoides reclutadas por la glándula ⁽⁸⁷⁾.

Así, la célula tiroidea parece tener por sí misma un importante papel en la progresión de la enfermedad, interactuando con el sistema inmune mediante la expresión de moléculas inmunológicamente activas como CD-40 ⁽⁹⁰⁾. De este modo, en las enfermedades autoinmunes tiroideas la presentación de antígenos puede realizarse mediante células presentadoras de antígenos “profesionales” como las células dendríticas o “no profesionales” como las células del epitelio folicular, en las que se ha demostrado la expresión de CD-40 ⁽⁹¹⁾.

Entre los mecanismos de influencia de CD-40 en la etiopatogenia de la tiroiditis autoinmune se encuentra la apoptosis. Este proceso es responsable de la pérdida de células epiteliales foliculares en la enfermedad. Investigaciones sobre la patogénesis de la apoptosis han revelado el importante papel de la expresión de moléculas de suicidio tanto en las células tiroideas como en los linfocitos T citotóxicos. Se ha observado una correlación entre la expresión de CD-40 y Fas ligando en tirocitos; las células T CD-4 activadas secretan el ligando de CD-40 que interactúa con el receptor de la superficie de las células B, protegiéndolas de la apoptosis mediada por Fas y, por tanto, desempeñando una labor importante en la regulación de la respuesta autoinmune humoral. Existe una expresión más intensa de estas moléculas en los tirocitos próximos a los infiltrados inflamatorios en la tiroiditis autoinmune y parecen mediar en la apoptosis de dichas células, que podría ser un proceso incluso más importante que la citotoxicidad mediada por células T ⁽⁹²⁾.

CD-40 tiene un papel patogénico en varias enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple ^(93,94), la artritis reumatoide y el LES (lupus eritematoso sistémico) ⁽⁸²⁾. Puede actuar como factor de riesgo o protector en enfermedades mediadas por la inmunidad y diferentes mecanismos moleculares envuelven la etiología de estos problemas.

3. AUTOFAGIA Y SU PAPEL EN LA TIROIDITIS AUTOINMUNE

3.1. Definición y funciones

La autofagia es un proceso homeostático fundamental por el cual las células digieren porciones de su interior para reciclar nutrientes, remodelarse y deshacerse de constituyentes citoplásmicos indeseados. Presenta un amplio espectro de funciones que se asocian de manera compleja a una gran gama de estados tanto de salud como de enfermedad.

El proceso de autofagia tiene múltiples papeles fisiológicos y es empleado por las células de manera habitual para eliminar organelas dañadas o sobrantes. La autofagia provee a la célula de sustratos metabólicos obtenidos de la degradación citoplásmica

que permiten mantener la síntesis de macromoléculas y la producción de ATP (adenosín trifosfato, nucleótido fundamental en la obtención de energía) en etapas de falta de nutrientes celulares.

Tiene un papel protector frente a diversas patologías a través de su capacidad de limpieza de constituyentes citoplasmáticos tóxicos o dañados, ofreciendo así protección frente a las enfermedades neurodegenerativas. La degradación de mitocondrias dañadas y otras organelas justifica el efecto antienvjecimiento y de supresión de tumores de la autofagia, mediante la reducción de estrés genotóxico y la prevención de daño de ADN (ácido desoxirribonucleico) e inestabilidad genómica.

La autofagia también tiene capacidad para eliminar microorganismos intracelulares, protegiendo así contra las enfermedades causadas por estos patógenos. Además, puede entregar material genético de los microorganismos y proporcionar antígenos a los sistemas inmunes innato y adaptativo, ejerciendo efectos de inmunoregulación ⁽⁹⁵⁾.

Los defectos en la autofagia también pueden contribuir al desarrollo de enfermedades metabólicas que se asocian a la inflamación, como la obesidad y la diabetes, ambas emparentadas a través de la insulinoresistencia ⁽⁹⁶⁾. El proceso de autofagia ejerce protección de las células sometidas a estrés isquémico o metabólico, por lo que también tiene un papel en la patología cardiovascular ⁽⁹⁷⁾.

3.2. Proceso de autofagia

El proceso de autofagia se desarrolla en tres fases:

- La formación del autofagosoma, en la que una membrana de separación envuelve porciones del citoplasma para formar una organela de doble membrana.
- El elongamiento, con el crecimiento y cierre de la doble membrana del autofagosoma.
- La maduración a autolisosoma, en que el material citoplásmico englobado en el autofagosoma es degradado tras su fusión con endosomas o lisosomas.

Mediante este proceso las células aíslan y eliminan constituyentes del citosol como organelas dañadas o sobrantes; del mismo modo pueden eliminar bacterias, virus y parásitos, tal y como se muestra en la figura 1 ⁽⁹⁸⁾.

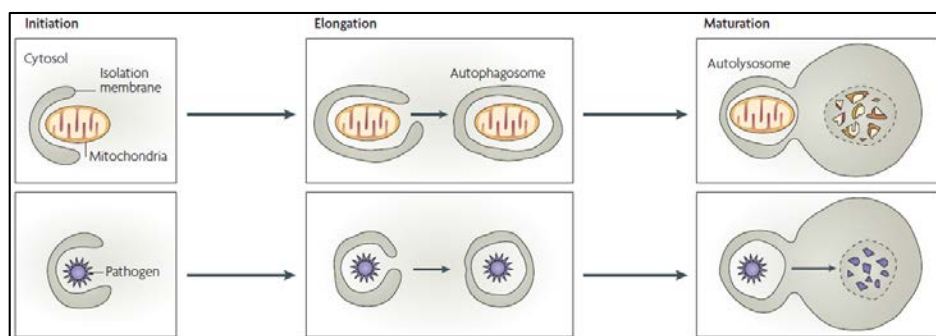


Figura 1: Eventos celulares en el proceso de autofagia

La autofagia es regulada por un conjunto de genes relacionados (ATG genes) que codifican las Atg proteínas (31 proteínas relacionadas con autofagia). Cada una de ellas ejerce una función específica en el complejo proceso, tal y como se observa en la figura 2, que representa los eventos moleculares en la autofagia ⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾.

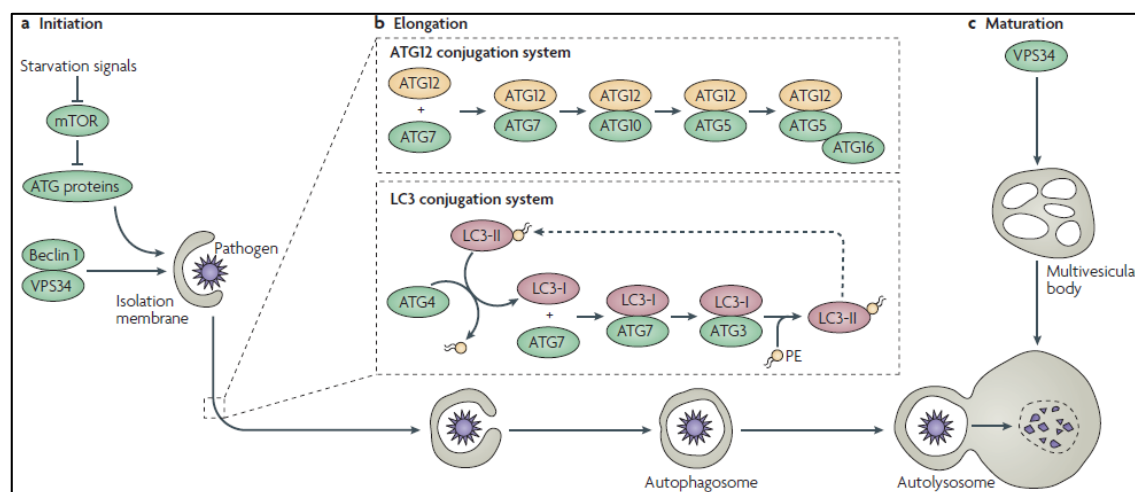


Figura 2: Eventos moleculares en el proceso de autofagia

Las proteínas cuyos polimorfismos son objeto de estudio en este trabajo realizan las siguientes funciones ⁽⁹⁶⁾:

- Atg2B: Participa en la fase de formación del autofagosoma (en el cierre de las membranas de separación que se produce tras su elongamiento); ejerce funciones de defensa antiviral.

- Atg5: Participa en el elongamiento del autofagosoma mediante su conjugación con Atg12, en un proceso regulado por Atg10 y Atg7; ejerce funciones de defensa antiviral, antibacteriana, antiparasitaria, de presentación de antígenos, maduración del fagosoma, limpieza de restos de apoptosis, mantenimiento del número de células B y T, funcionalidad de las células del epitelio inmune intestinal y regulación de la producción de IFN.
- Atg10: Participa en el elongamiento del autofagosoma en forma de homodímero regulando el proceso de conjugación de Atg12 y Atg5; sus funciones aún son poco conocidas.
- Atg16L1: Participa en el elongamiento del autofagosoma uniéndose al conjugado proteico de Atg12-Atg5 para formar complejos mayores; ejerce funciones de defensa antibacteriana, presentación de antígenos, funcionalidad de las células del epitelio inmune intestinal e inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias.

3.3. Autofagia, sistema inmune y autoinmunidad

El sistema inmune, responsable de la vigilancia y la comunicación entre diferentes órganos y tipos celulares, es un sistema en el cual la autofagia y las consecuencias de sus defectos van más allá del papel en la degradación en la vía. La figura 3 muestra los papeles potenciales de la autofagia en los sistemas inmunes innatos y adaptativos, que podrían modular el establecimiento y desarrollo de las enfermedades autoinmunes ⁽¹⁰²⁾.

La relación entre autofagia e inmunidad es bidireccional. No sólo la autofagia (al menos en ciertos contextos) mejora la respuesta inmune innata y adaptativa, sino que, en paralelo, las citocinas y sus receptores envueltos en la respuesta inmune pueden influir sobre el desarrollo de la autofagia y viceversa.

Las moléculas de señalización inmune que se han mostrado como reguladoras en positivo de autofagia son PKR (proteína cinasa R), IFN- γ , TNF y la interacción CD-40/CD-40 ligando. Al contrario, la autofagia es regulada negativamente por las citocinas de la respuesta T helper tipo 2 como IL-4 e IL-13 ⁽⁹⁸⁾.

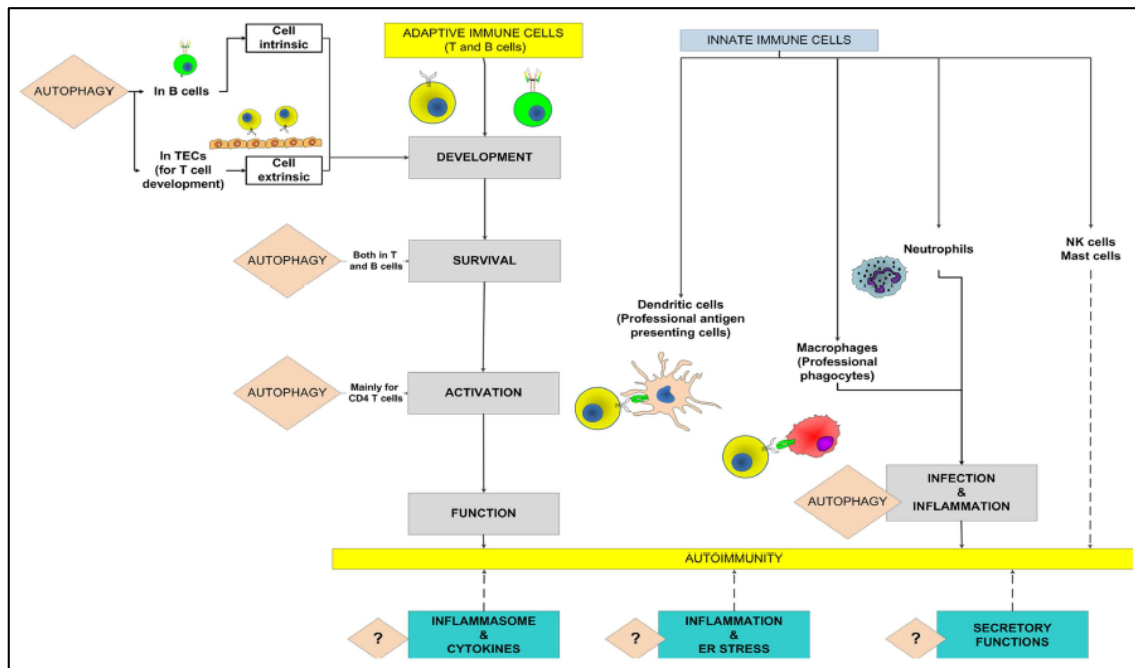


Figura 3: Papeles potenciales de la autofagia en el sistema inmune

La autofagia podría afectar al desarrollo de las enfermedades autoinmunes mediante la modulación de la producción de IL-1 β (una deficiente autofagia deriva en un incremento de su producción) y otras citocinas (IL-18, INF, TNF) ⁽¹⁰³⁾, lo que podría explicar el ambiente deletéreo de citocinas patogénicas usualmente observado en enfermedades infecciosas y autoinmunes ⁽¹⁰²⁾. Especialmente destacable en los últimos estudios es el descubrimiento de la implicación de la autofagia en la producción de IL-1 β , que podría tener un papel importante para inducir enfermedad en personas con defectos en la vía de la autofagia a través de un incremento en liberación de esta citocina ⁽¹⁰⁴⁾.

Se ha observado la existencia de un vínculo entre la autofagia y la eliminación de los restos de células apoptóticas, lo que ayudaría a explicar un posible papel de la autofagia en la prevención de la inflamación y la autoinmunidad. La autofagia provee a las células apoptóticas de señales para asegurar su eliminación durante la muerte celular programada; la eliminación rápida de los restos de las estas células es crucial para la prevención de la inflamación tisular y, por tanto, un defecto en esta función altera la tolerancia a los autoantígenos y conduce a enfermedades autoinmunes. De este modo una autofagia defectuosa podría contribuir a la patogénesis de enfermedades

autoinmunes, como se ha demostrado en el caso del LES ⁽⁹⁸⁾.

Hipótesis recientes proponen que puede inducirse la autoinmunidad en el contexto de una exacerbación de la autofagia a través del aumento de la supervivencia de linfocitos auto-reactivos por reducción de la apoptosis ⁽¹⁰⁵⁾.

Existen múltiples evidencias que confirman la implicación de la autofagia en varias enfermedades autoinmunes (LES, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, psoriasis, vitíligo, y esclerosis múltiple), incluyendo el descubrimiento de polimorfismos en genes relacionados con la autofagia ⁽¹⁰⁶⁾.

4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y TIROIDITIS AUTOINMUNE

4.1. Introducción

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SPN, del inglés Single Nucleotide Polymorphism) son cambios únicos de una base por otra en el ADN cuyas diferentes alternativas en la secuencia del genoma (alelos) existen en individuos normales (al menos en un 1% de la población). Su importancia radica en el hecho de que muchos tienen el potencial de cambiar la secuencia de aminoácidos que codifican y, de este modo, están implicados directamente en la susceptibilidad a patologías complejas ya que ocasionan cambios en la función del gen ⁽³⁰⁾.

Según su localización los polimorfismos pueden incumbir a regiones codificantes o no codificantes del ADN.

Aquéllos que producen un cambio de aminoácido en las regiones codificantes se denominan no sinónimos y son los que alteran la función de la proteína en mayor proporción y, por tanto, los más estudiados. Si este cambio introduce un codón de parada se denomina mutación nonsense, mientras que si codifica un nuevo aminoácido será una mutación de cambio de sentido (missense).

Si la mutación al traducirse no produce ningún cambio en la secuencia aminoacídica se dice que es sinónima o silente. Las mutaciones de las zonas no

codificantes también son importantes porque pueden producir una alteración del corte y empalme del ARN (ácido ribonucleico) o impedir la unión de factores de transcripción.

En los polimorfismos por cambio de un solo nucleótido serán dos los posibles alelos en un locus o posición concreta del genoma: por ejemplo, el cambio de C por T. Si el locus corresponde a un cromosoma autosómico (del 1 al 22), cada individuo es portador de dos alelos, uno en cada copia del cromosoma, que se heredan del padre y de la madre de manera independiente. Así, las tres posibilidades de parejas de alelos o genotipos para el SNP del ejemplo serían TT, CT y CC. Los individuos con los dos alelos idénticos son homocigotos y los que tienen diferentes alelos, heterocigotos. En general se considera variante al alelo menos frecuente, pero esto puede diferir de una población a otra.

4.2. Polimorfismos en citocinas

Los polimorfismos en los genes que codifican las citocinas, moléculas inmunomoduladoras cruciales, pueden resultar en alteraciones en los niveles de su expresión y, por lo tanto, deben considerarse como genes candidatos esenciales en la susceptibilidad y la severidad de las enfermedades autoinmunes. Las citocinas están implicadas en la patogénesis de la tiroiditis autoinmune y por tanto ciertos polimorfismos en sus genes podrían ser marcadores de susceptibilidad individual para dicha patología.

4.2.1. Polimorfismos del gen IL1B

El gen IL1B se localiza en el brazo largo del cromosoma 2 ⁽¹⁰⁷⁾.

Polimorfismos del gen IL1B en tiroidopatía:

El polimorfismo de un solo nucleótido -511 C>T en la región promotora del gen IL1B se relaciona con un aumento relativo de la susceptibilidad a padecer enfermedad de Graves-Basedow en pacientes chinos ⁽¹⁰⁸⁾.

Se han realizado múltiples estudios que no han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con tiroiditis autoinmune: polimorfismo IL1B +3962 T>C ⁽⁶³⁾, polimorfismo IL1B -511 C>T en pacientes europeos ⁽⁶³⁾,

polimorfismo IL1B -511 C>T en pacientes chinos ⁽¹⁰⁹⁾ y polimorfismo E1/E2 en el exón 5 del gen IL1B en pacientes chinos ⁽¹⁰⁹⁾.

Recientemente un estudio en población polaca sí ha conseguido objetivar una relación significativa entre polimorfismos en el gen IL1B y susceptibilidad a presentar la enfermedad. La frecuencia del alelo C y del genotipo CC del polimorfismo -511 C>T fue mayor en pacientes que en sanos. La frecuencia del alelo C y del genotipo CC del polimorfismo +3953 C>T fue mayor en enfermos que en controles ⁽¹¹⁰⁾.

Polimorfismos del gen IL B en otras patologías:

El polimorfismo de IL 1B (exón 5, +3962 C>T) se ha asociado con DM tipo 1 ^(111,112).

4.2.2. Polimorfismos del gen IL4

El gen IL4 se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 ⁽¹¹³⁾. Es altamente polimórfico, tal y como se demuestra en las secuencias de nucleótidos depositadas en las bases de datos de los catálogos de polimorfismos comunes y polimorfismos de nucleótido simple. El polimorfismo más estudiado (rs2243250) es una sustitución de T por C en la posición 590 de la región promotora de IL4 (-590 T>C). Otros polimorfismos identificados son rs2070874, rs2234248, rs2243288, rs2243289 y rs2243290.

Polimorfismos del gen IL4 en tiroidopatía:

La variante alélica T en el polimorfismo en la región promotora -590 T>C puede conferir una modesta protección contra el desarrollo de la enfermedad de Graves-Basedow, aunque existe controversia dada la diversidad de los datos obtenidos hasta la actualidad ^(63,114). No se objetiva significación en otros estudios ⁽⁶⁶⁾. Estas discrepancias podrían obedecer a diferencias en los estudios en cuanto a tamaño muestral, estratificación de la población y/o artefactos estadísticos, así como a la diferencia racial entre las poblaciones estudiadas ⁽⁶⁶⁾.

Se ha observado una diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia del genotipo -590 CC en el gen IL4 entre pacientes japoneses con formas clínicamente

severas o leves de tiroiditis autoinmune, de modo que dicho genotipo parece ser un fuerte factor predictivo para el desarrollo de hipotiroidismo en estos enfermos. El posible mecanismo de explicación de este fenómeno subyace en un déficit de producción de IL-4 por los linfocitos T helper tipo 2. Los polimorfismos de IL4 vinculados con una menor producción de esta citocina se relacionan con una mayor severidad de la enfermedad (mayor y más precoz desarrollo de hipotiroidismo). La proporción de células Th2 es menor en pacientes con formas más intensas de tiroiditis autoinmune, mientras que la proporción de células Th1 es mayor en estos mismos pacientes, ocasionando una ratio Th1/Th2 más alta en estas formas de peor evolución clínica ⁽²⁴⁾. De este modo, en los pacientes portadores de este genotipo, la proporción de células T helper productoras de IL-4 es más baja que en los pacientes con los genotipos -590 TT o -590 CT; esto resultaría en una mayor actividad inflamatoria de citocinas Th1 y, con ello, en una progresión más rápida de la destrucción tiroidea, seguida por un desarrollo precoz de hipotiroidismo. En cambio, los individuos portadores del alelo T en los polimorfismos -590 C>T de IL4 tienen una mayor proporción de células T helper productoras de IL-4 ⁽³⁹⁾.

Sin embargo otros trabajos no han encontrado diferencias significativas en la investigación del polimorfismo -590 C>T de IL4 ⁽⁶³⁾. En el estudio en población Taiwanesa de polimorfismos del gen IL4 (promotor -590 y regiones del intron 3) y su posible relación con la tiroiditis autoinmune no se observan diferencias estadísticamente significativas ⁽⁶⁶⁾.

En el metaanálisis realizado por Xiaokun et al ⁽¹¹⁵⁾, detectan asociación de los polimorfismos de IL4 (rs2243250, rs2070874, rs2243289) con la enfermedad de Graves-Basedow. Integrando y analizando los datos de las publicaciones disponibles que han estudiado la asociación entre polimorfismos del gen IL4 y enfermedad autoinmune tiroidea, los autores demuestran una relación de riesgo, pero mantienen la controversia en el caso concreto de la tiroiditis autoinmune; por ello se necesitan más estudios que incluyan diferentes poblaciones.

El polimorfismo RP1-RP2 en la región del intron 3 del gen IL4 tiene aún una función poco conocida, pero parece que podría afectar a la actividad de transcripción del gen. No se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas en los estudios

realizados para valorar su influencia sobre la tiroiditis autoinmune ⁽⁶⁶⁾.

Los individuos con el genotipo ILe/ILe en el polimorfismo ILe50Val (rs1805010) del receptor α de IL-4 tienen una mayor actividad dicho receptor en comparación con los individuos con el genotipo ILe/Val o Val/Val; pese a esta diferencia en la actividad del receptor no se han objetivado diferencias significativas en relación con la severidad de la tiroiditis autoinmune en estos pacientes ⁽³⁹⁾.

Polimorfismos del gen IL4 en otras patologías:

El polimorfismo en la región promotora -590 podría interferir con la expresión genética normal y contribuir así al desarrollo de desórdenes inmunológicos. Se ha observado que está asociado a un aumento de IgE total en suero y con ello a asma y a dermatitis atópica ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾. Se sugiere que es un importante inductor y mediador en enfermedades alérgicas ^(117,118).

El polimorfismo RP1-RP2 en la región del intron 3 del gen IL4 guarda relación con la artritis reumatoide y la púrpura trombocitopénica inmune ^(119,120).

4.2.3. Polimorfismos del gen IL6

El gen IL6 se localiza en el brazo corto del cromosoma 7 ⁽¹²¹⁾.

Polimorfismos del gen IL6 en tiroidopatía:

Se ha objetivado en pacientes japoneses que el alelo G (genotipos CG y GG) del polimorfismo del gen IL6 -572 C>G (rs1800796) se correlaciona con una mayor capacidad de producción de IL-6, que es significativamente más frecuente en pacientes con tiroiditis autoinmune severa que en controles sanos ⁽¹²²⁾. Estos hallazgos sugieren que dicho polimorfismo es funcional y puede relacionarse con el pronóstico de la enfermedad y representar un potencial marcador genético predictor de susceptibilidad individual. No se observa asociación entre cada alelo del polimorfismo estudiado y los títulos de anticuerpos o el tamaño del bocio. Los datos en pacientes chinos demuestran un incremento de la ratio de genotipo CG y un decremento de la ratio de genotipos CC y GG en el promotor del gen IL6 en los pacientes con tiroiditis autoinmune, en comparación con controles sanos ⁽¹⁰⁹⁾. También se ha observado que el alelo G

(genotipos CG y GG) del polimorfismo de IL6 -572 C>G es más frecuente en pacientes con enfermedad de Graves-Basedow que en controles ⁽¹²²⁾.

El estudio del polimorfismo de IL6 +3247 A>G no presenta diferencias con significación estadística entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos ⁽⁶³⁾.

No se ha observado influencia sobre el desarrollo de tiroiditis autoinmune en el estudio del polimorfismo de IL6 -174 G>C (rs1800795). Sí demuestra aparentes interacciones entre alelos polimórficos diferentes, de manera que la presencia concomitante de las mutaciones IL 10-1082 G>A y de IL6 -174 G>C aumenta el riesgo de presentar la enfermedad. En estos pacientes parece observarse una mayor producción de IL-6 (inflamatoria) y menor producción de IL-10 (antiinflamatoria); de este modo, se desequilibraría el balance entre citocinas pro/antiinflamatorias, lo que conduciría a una acentuación de la respuesta inflamatoria y a una propagación del proceso autoinmune. Por tanto, los efectos combinados de las variantes alélicas definidas podrían ser decisivos para inducir diferencias funcionales y modificar el riesgo de presentar la patología ⁽¹²³⁾.

Polimorfismos del gen IL6 en otras patologías:

El alelo G del polimorfismo de IL6 -572 C>G (rs1800796) se ha relacionado en pacientes diabéticos japoneses con un incremento en la producción de IL-6 por las células mononucleares de sangre periférica ⁽¹²⁴⁾.

En cuanto al polimorfismo del gen IL6 -174 G>C, se ha objetivado una menor incidencia del genotipo GG y mayor del alelo C en pacientes diabéticos tipo 1 respecto a controles sanos ⁽¹²⁵⁾. En cambio en DM tipo 2 el alelo G parece tener un papel protector ⁽¹²⁶⁾. También han observado diferencias estadísticamente significativas los estudios de asociación con la concomitancia de DM tipo 1 y enfermedad celiaca en niños ⁽¹²⁷⁾.

Las variaciones en la región promotora del gen IL6 (rs1800795) se han asociado con otras múltiples patologías: artritis reumatoide juvenil ⁽¹²⁸⁾, aterosclerosis carotídea ^(128,129), defectos en el crecimiento en niños enfermedad de Crohn ⁽¹³⁰⁾, obesidad en adultos ⁽¹³¹⁾, síndrome metabólico ⁽¹³²⁾, oclusión de la arteria central de la retina ⁽¹³³⁾,

cambios en la tolerancia a la glucosa inducidos por el ejercicio ⁽¹³⁴⁾, o alteraciones en la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas ⁽¹³⁵⁾.

4.2.4. Polimorfismos del gen CD40

El gen CD40 se localiza en el brazo largo del cromosoma 20 ⁽¹³⁶⁾.

Polimorfismos del gen CD40 en tiroidopatía:

El polimorfismo de un solo nucleótido C>T en la secuencia Kozak (tramo de nucleótidos que flanquean el codón de inicio ATG en genes de vertebrados) del gen CD40 (rs1883832) ha sido analizado en múltiples estudios. No se ha encontrado asociación entre el polimorfismo CD40 -1C>T y tiroiditis autoinmune ⁽¹³⁷⁾. Tampoco se ha encontrado asociación con la gravedad de la patología ⁽¹³⁸⁾. Este polimorfismo ha sido objeto de estudio en un metaanálisis que recopiló 4 estudios previos que no habían obtenido significación estadística. Ni en el análisis por genotipos ni por frecuencia alélica se observa una asociación estadísticamente significativa con un mayor riesgo de presentar la enfermedad ⁽¹³⁷⁾. Sí que se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre el polimorfismo -1 C>T de CD40 y el riesgo de enfermedad de Graves-Basedow en múltiples poblaciones ^(137,139-145), así como con la severidad y dificultad de tratamiento de la misma ⁽¹³⁸⁾. Por lo tanto, este polimorfismo tiene un papel diferente en la patogenia de las dos enfermedades autoinmunes tiroideas y puede ser específico para enfermedad de Graves-Basedow, aunque la base para esta especificidad es aún desconocida ⁽¹⁴⁶⁾.

Polimorfismos del gen CD40 en otras patologías:

El polimorfismo CD40 (-1 C>T) se ha asociado con otras muchas patologías como esclerosis múltiple ⁽¹⁴⁷⁾, enfermedad pulmonar obstructiva crónica ⁽¹⁴⁸⁾, enfermedad de Behçet ⁽¹⁴⁹⁾, cáncer de mama ⁽¹⁵⁰⁾, riesgo de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas ⁽¹⁵¹⁾, artritis reumatoide ⁽¹⁵²⁾, o esclerosis múltiple ⁽¹⁵³⁾. También con ictus isquémico ^(154,155), infarto agudo de miocardio ⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁸⁾ y enfermedad de Kawasaki en población china ^(159,160).

También existe asociación entre otros polimorfismos en el gen CD40 y diversas enfermedades: polimorfismo rs6074022 y esclerosis múltiple ⁽¹⁵³⁾; rs3765456 y LES

⁽¹⁶¹⁾; rs4810485 y enfermedad de Behçet ⁽¹⁴⁹⁾, LES ⁽¹⁶²⁾ y cáncer de mama ⁽¹⁵⁰⁾; rs3765459 y cáncer de mama ⁽¹⁵⁰⁾.

4.3. Polimorfismos en proteínas reguladoras de autofagia

4.3.1. Polimorfismos del gen ATG2B

El gen ATG2B se localiza en el brazo largo del cromosoma 14 ⁽¹⁶³⁾.

Hasta el momento no se ha encontrado evidencia de influencia de polimorfismos de ATG2B sobre diferentes patologías en las que se ha realizado el estudio, como enfermedad de Paget ⁽¹⁶⁴⁾ o tuberculosis ⁽¹⁶⁵⁾.

4.3.2. Polimorfismos del gen ATG5

El gen ATG5 se localiza en el brazo largo del cromosoma 6 ⁽¹⁶⁶⁾.

Polimorfismos del gen ATG5 en tiroidopatía:

Los pacientes portadores del polimorfismo de ATG5 rs2245214 tienen una mayor probabilidad de desarrollar carcinoma folicular de tiroides ⁽¹⁶⁷⁾. El alelo G del polimorfismo se ha asociado con un aumento de la susceptibilidad a dicha enfermedad.

Polimorfismos del gen ATG5 en otras patologías:

Estudios genéticos han objetivado la relación entre polimorfismos del gen ATG5 y susceptibilidad a LES ^(168,169). Se han identificado dos polimorfismos que se asocian con el inicio y/o el desarrollo de LES en poblaciones caucásicas: rs6568431 en población de Reino Unido y rs2245214 en población de Estados Unidos y Suecia ^(170,171).

Ser portador del alelo G del polimorfismo de ATG5 rs2245214 se ha asociado con un incremento de riesgo de desarrollo de enfermedad de Paget ⁽¹⁶⁴⁾.

El genotipo CC del polimorfismo de ATG5 rs648234 incrementa la susceptibilidad al desarrollo de neuromielitis óptica en la población china ⁽¹⁷²⁾.

Dos polimorfismos de ATG5 (rs12201458 y rs510432) se han asociado con el

diagnóstico de asma. El alelo A del polimorfismo rs12201458 confiere un efecto protector frente a la enfermedad mientras que el alelo G del polimorfismo rs510432 aumenta la susceptibilidad a la misma ⁽¹⁷³⁾.

El polimorfismo de ATG5 rs548234 se ha asociado con artritis reumatoide en estudios efectuados en población caucásica. En cambio no se han obtenido resultados significativos en los estudios de población china ⁽¹⁷⁴⁾.

4.3.3. Polimorfismos del gen ATG10

El gen ATG10 se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 ⁽¹⁷⁵⁾.

Se han realizado escasos estudios sobre la influencia de polimorfismos en el gen ATG10 sobre diferentes patologías. Se precisan aún estudios más complejos que confirmen los hallazgos obtenidos.

El polimorfismo de ATG10 rs1864183 se ha asociado con el desarrollo de enfermedad de Paget. Se portador del alelo T confiere un efecto protector frente a la enfermedad ⁽¹⁶⁴⁾.

El polimorfismo de ATG10 rs1864183 se ha asociado con un incremento de la producción de IL-8 en estudios sobre inducción de citocinas en pacientes afectos de tuberculosis ⁽¹⁶⁵⁾.

En estudios en población china los polimorfismos rs1864182 y rs10514231 se han asociado con un decremento del riesgo de presentar cáncer de mama ⁽¹⁷⁶⁾.

4.3.4. Polimorfismos del gen ATG16L1

El gen ATG16L1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 2 ⁽¹⁷⁷⁾.

La variante ATG16L1 +898 A>G (rs2241880), caracterizada por la sustitución del aminoácido treonina por alanina en la posición 300, tiene una elevada frecuencia en la población humana, alcanzando el 55% de alelos en los ancestros de la población europea y entre el 20 y 40% en otras poblaciones. Esta elevada frecuencia podría ser debida al papel protector de esta variante frente a infecciones por patógenos intracelulares, aunque la presencia de este polimorfismo podría conferir un riesgo

elevado de desarrollo de enfermedades autoinmunes ⁽¹⁷⁸⁾.

Polimorfismos del gen ATG16L1 en tiroidopatía:

El polimorfismo ATG16L1 rs2241880 se ha asociado con un descenso del riesgo de presentar carcinoma tiroideo del epitelio folicular. Además, se ha objetivado que ser portador del alelo A se asocia con una mayor sensibilidad al tratamiento con radioyodo y menor probabilidad de persistencia de la enfermedad tras la tiroidectomía y el tratamiento ablativo. Aunque por sí mismo no podemos considerar el genotipo de ATG16L1 como un marcador pronóstico único, este polimorfismo sí puede constituir un nuevo marcador que podría añadirse a un modelo complejo multifactorial para predecir la respuesta del carcinoma de tiroides al tratamiento con radioyodo, si se confirma en futuras investigaciones. El mecanismo de acción propuesto es que las variantes genéticas de ATG16L1 pueden influir en el riesgo de cáncer de tiroides a través de la modulación en la producción de IL-1 β ; esta citocina, además de su papel en la respuesta inmune, también influye sobre el crecimiento y la diferenciación de diferentes tipo celulares, habiéndose descrito efecto antiproliferativo en líneas celulares epiteliales tiroideas malignas. No se pueden excluir otros efectos sobre la capacidad de las células epiteliales tiroideas de prevenir la muerte celular mediante inducción de la autofagia ⁽¹⁷⁹⁾.

Polimorfismos del gen ATG16L1 en otras patologías:

Se ha descubierto un fuerte vínculo genético entre autofagia y enfermedad inflamatoria crónica intestinal. Se ha identificado una fuerte asociación entre el polimorfismo de un solo nucleótido en el gen ATG16L1 rs2241880 y susceptibilidad para enfermedad de Crohn ^(50,180-182). El mecanismo por el que este polimorfismo influye sobre la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn parece implicar a la producción de IL-1 β e IL-6 ⁽¹⁸³⁾.

También se ha encontrado una asociación entre colitis ulcerosa y varios polimorfismos de ATG16L1 (rs2241880, rs10210302, rs3828309) ⁽¹⁸⁴⁾.

En el estudio del polimorfismo de ATG16L1 rs2241880 en cáncer colorrectal se ha observado que los sujetos portadores del genotipo GG presentan un mayor riesgo de

desarrollo de la patología, con una evidencia incluso más consistente en el grupo de varones. Se ha demostrado que los polimorfismos en genes de autofagia están relacionados con el desarrollo de lesiones inflamatorias crónicas, que representan un factor de riesgo para tumores colorrectales ⁽¹⁸⁵⁾.

El polimorfismo de ATG16L1 rs2241880 incrementa la susceptibilidad a la infección por *Helicobacter pylori*. Los monocitos de sangre periférica de los sujetos con la variante de riesgo presentan una respuesta de autofagia deficiente a la exposición a la citotoxina producida por la bacteria ⁽¹⁸⁶⁾.

No se ha encontrado significación estadística en el análisis del polimorfismo de ATG16L1 rs2241880 en pacientes con artritis reumatoide ⁽¹⁸⁷⁾.

En el estudio de polimorfismos de un solo nucleótido de ATG16L1 en pacientes con psoriasis vulgar se ha observado significación estadística con una mayor frecuencia de rs10210302 CC, rs12994971 CC, rs2241880 AA, rs2241879 GG y rs13005285 TT ⁽¹⁸⁸⁾. En psoriasis pustulosa se ha encontrado una frecuencia más elevada significativa de los alelos rs2241880G y rs2241879A en los pacientes frente a los controles ⁽¹⁸⁹⁾.

Ser portador del alelo G del polimorfismo rs2241880 del gen ATG16L1 se asocia con un incremento del riesgo de desarrollar enfermedad de Paget ⁽¹⁶⁴⁾.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

La tiroiditis autoinmune, dada su elevada prevalencia, constituye una de las patologías autoinmunes más comunes ^(3,4) y una de las enfermedades endocrinológicas más frecuentes ⁽⁵⁾. Actualmente puede considerarse como la causa más habitual de hipotiroidismo ^(6,7).

Esta enfermedad está causada por los efectos combinados de múltiples genes de susceptibilidad y factores ambientales, que pueden afectar tanto a la glándula tiroidea como al sistema inmune ⁽²⁸⁻³⁰⁾. Su etiopatogenia es compleja y aún se precisan más estudios que investiguen en las diferentes vías causales y en la búsqueda de tratamientos definitivos, para un problema que a día de hoy es crónico e incurable ⁽¹⁾.

Las citocinas participan en la inducción y en las fases efectoras de la respuesta inmune e inflamatoria y por lo tanto tienen un papel esencial en el desarrollo de la autoinmunidad tiroidea. Se han estudiado varios genes que codifican citocinas inflamatorias, cuyas alteraciones parecen influir en la severidad de la enfermedad ⁽³⁷⁾.

La autofagia es un proceso con un amplio espectro de funciones que se asocian de manera compleja a una gran gama de estados tanto de salud como de enfermedad. Existen múltiples evidencias que confirman la implicación de la autofagia en varias enfermedades autoinmunes, y que incluyen la influencia de varios polimorfismos en genes relacionados con la autofagia en el desarrollo de estas entidades clínicas ⁽¹⁰⁶⁾.

Dado que los polimorfismos de un solo nucleótido tienen el potencial de producir cambios en la función del gen y cambiar la secuencia de aminoácidos que codifican, pueden estar implicados directamente en la susceptibilidad a patologías complejas ⁽³⁰⁾.

Se plantea la hipótesis de que ciertos polimorfismos genéticos relacionados con las citocinas y con el proceso de autofagia pueden variar el riesgo de padecer tiroiditis autoinmune. Para comprobar dicha hipótesis, se realiza un estudio epidemiológico caso-control.

2. OBJETIVOS

1. Conocer las características epidemiológicas y clínicas que presentan los pacientes con tiroiditis autoinmune estudiados en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y describir las diferencias respecto a los datos habituales poblacionales.
2. Comparar las distribuciones alélicas y genóticas de los polimorfismos sujetos a estudio entre pacientes con tiroiditis autoinmune y controles sanos, y estudiar los diferentes modelos de herencia, con el fin de determinar una posible relación entre los diferentes genotipos y la predisposición al desarrollo de esta enfermedad.
3. Estudiar las diferencias en las distribuciones genóticas de los polimorfismos entre los grupos de pacientes con tiroiditis autoinmune, segregados según las variables epidemiológicas y clínicas que presentan entre sí, para establecer la posibilidad de interacción entre factores ambientales y genéticos en la etiopatogenia de la enfermedad, y la posible influencia de los polimorfismos en las formas clínicas y la severidad de la patología.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. SUJETOS DEL ESTUDIO

1.1. Pacientes

La muestra a estudio está constituida por pacientes diagnosticados de tiroiditis autoinmune que presentaron positividad de anticuerpos antitiroideos (antitiroglobulina, antiperoxidasa, o ambos).

Los enfermos fueron reclutados desde el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Los datos utilizados en el estudio para la caracterización de los pacientes, así como la información necesaria para las variables objeto de análisis, se obtuvieron a través de una consulta activa de los documentos de la historia clínica relativa a los pacientes.

Se incluyen en el estudio un total de 200 casos de pacientes mujeres, excluyéndose los varones, dado que su escasa prevalencia en la muestra revisada podría influir como factor de confusión en el análisis estadístico.

De cada paciente se recogen las siguientes variables:

- Edad al diagnóstico.
- Existencia de antecedentes familiares de tiroidopatía.
- Consumo de sal yodada.
- Procedencia de zona endémica de bocio. Se habla de bocio endémico cuando esta alteración afecta a un número considerable de personas de una zona determinada y, más concretamente, a más del 10% de la población escolar de un área. Patogénicamente, el aumento de tamaño de la glándula tiroides se produce para compensar una captación de yodo inferior a la necesaria y tiende a presentarse en ciertas áreas geográficas con suelos pobres en yodo, normalmente alejadas de la costa marina ⁽¹⁹⁰⁾.
- Presencia coadyuvante de bocio y tamaño del mismo según la clasificación de la OMS (Organización Mundial de la Salud).
 - Grado 0: Glándula no palpable (0a) o palpable pero no visible con el cuello en extensión (0b).
 - Grado I: Bocio palpable y visible con el cuello en extensión.

- Grado II: Bocio palpable y visible con el cuello en posición normal.
- Grado III: Bocio visible a distancia.
- Anticuerpos antitiroglobulina y anticuerpos antiperoxidasa tiroidea. Se recoge el dato como positividad o negatividad sin consignar el valor numérico, dada la heterogeneidad de los estudios de valoración debida a las modificaciones en la técnica de detección del laboratorio en función del año de diagnóstico de los pacientes. Se consideran anticuerpos positivos aquéllos cuyo valor es superior al límite de normalidad propuesto para el ensayo. Se consideran anticuerpos negativos aquellos valores dentro del intervalo de referencia de normalidad de la técnica de detección.
- Función tiroidea en el momento del diagnóstico: Eutiroidismo, hipotiroidismo o hipertiroidismo.

1.2. Controles

Las muestras elegidas como controles fueron las correspondientes a pacientes atendidos por distintas patologías en diferentes Servicios del Hospital, en los que se descartase la presencia de patología tiroidea, tanto tiroiditis autoinmune como otras afecciones tiroideas, así como otras enfermedades autoinmunes.

Se incluyeron en el análisis un total de 166 controles mujeres para el estudio de polimorfismos de CD40 e IL4 y 240 controles mujeres para el estudio del resto de polimorfismos (IL6, IL1B y ATG).

Todas las muestras, tanto de pacientes como de controles, fueron obtenidas previo consentimiento informado, siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DEL ADN

2.1. Obtención de la muestra

Las muestras fueron obtenidas mediante la extracción de sangre periférica

realizada en condiciones estériles en tubos “Venoject” de 10 ml con EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético) y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.

Todas las muestras fueron identificadas con su correspondiente número de laboratorio para mantener la confidencialidad de los datos personales y genéticos, respetando en todo momento los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas.

2.2. Obtención de células mononucleadas de sangre periférica

Las células nucleadas se aislaron mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total en 50 mL de ddH₂O -agua bidestilada- durante 30 minutos, 1500 rpm, a 4°C) dando lugar a la separación de la muestra en tres fases: superior (corresponde al plasma), interfase (contiene las células nucleadas de la sangre y es de aspecto blanquecino) e inferior o fase eritrocitaria (compuesta por este tipo de células).

Tras la recuperación de la interfase creada y la lisis de los glóbulos rojos con agua destilada, se lavaron las células mononucleadas en tampón Fornace (0.25 M Sacarosa, 50 mM Tris-HC -tris(hidroximetil)aminometano ácido clorhídrico- pH: 7,5, 25 mM KCl -cloruro potásico- y 5 mM MgCl₂ -cloruro magnésico-) el cual proporcionó la osmolaridad necesaria para no romper los leucocitos. Se precipitaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos.

2.3. Aislamiento del ADN total de alto peso molecular

El botón de células nucleadas de la sangre se resuspendió en tampón Fornace a una concentración estimada de 5×10^6 células/mL, tras lo cual se añadió EDTA 0,5 M pH 8 (concentración final 10 mM), un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas, SDS (dodecilsulfato sódico, concentración final 1%) para romper las membranas celulares y proteinasa K (Boehringer Mannheim, concentración final 50 µg/mL) para degradar las proteínas. La mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas.

2.4. Purificación del ADN

Tras la incubación, se procedió a la extracción y purificación del ADN tratándolo con una mezcla de fenol tamponado a pH 8 (para prevenir que fuera “atrapado” en la fase intermedia entre la fase acuosa y la orgánica) y de CIAA (cloroformo alcohol isoamílico 24:1).

Tras una centrifugación a 580 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se recuperó la fase acuosa sobrenadante conteniendo el ADN en solución, y se añadió un volumen igual de CIAA con el fin de retirar restos proteicos y fenol; tras mezclarlos hasta su homogeneización, se sometió a una nueva centrifugación en condiciones idénticas, recuperando nuevamente la fase acuosa. Posteriormente, la fase acuosa se transfirió a tubos Corex® estériles, y el ADN de esta solución final se precipitó mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C). El ADN se transfirió a un eppendorf, se lavó con etanol al 70% con una breve centrifugación a 16000 rpm, y se dejó evaporar el etanol residual, para resuspender finalmente en 100 µl de agua bidestilada estéril ⁽¹⁹¹⁾.

2.5. Cuantificación del ADN

La concentración y el grado de contaminación proteica del ADN así obtenido se calcularon, tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm respectivamente, en un espectrofotómetro automático de ADN/ARN (GeneQuant, Pharmacia) por medio de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de ADN/ml} = (\text{D.O.260}) \times (\text{factor de dilución}) \times (50)$$

Nota: 50 es un factor de corrección introducido ya que una unidad de densidad óptica (D.O.) con una luz incidente de 260 nm es el valor de absorbancia que tienen 50 µg de ADN/ml.

El cociente D.O.260/D.O.280 se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerando como valores adecuados un cociente entre 1,65 y 2. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, realizándose en estos casos una nueva purificación del ADN. Valores superiores parecen indicar un exceso de ARN, el cual se eliminó tratando la solución de ADN con ARNasa (ribonucleasa) y purificando nuevamente.

La muestra de ADN con una concentración aproximada entre 1000 y 1500 µg/ml se almacenó en tubos eppendorf a -20 °C con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como su posible contaminación por microorganismos.

3. ESTUDIO GENÉTICO DE POLIMORFISMOS

3.1. Polimorfismos estudiados

Cada polimorfismo se ha identificado por su nombre habitual en la literatura, que suele basarse en la posición de dicha variante alélica con respecto al punto de inicio de la transcripción. Además, se proporciona el número de identificación de cada polimorfismo (rs#) en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

3.1.1. Polimorfismo -511 C>G del gen *IL1B* (rs 16944)

El gen que codifica IL-1β se encuentra en el brazo largo del cromosoma 2, localización 2q14 [OMIM *147720] (Online Mendelian Inheritance in Man).

Se estudia el SNP localizado en la región promotora, en la posición -511, que supone un cambio de C por T. La mutación de C por T destruye un sitio de corte de la enzima Ava I de tal manera que el alelo A1 (C) tiene dos fragmentos de 190 y 114 pb mientras que el alelo A2 (T) sólo tiene un fragmento de 304 pb.

Se trata de una mutación intragénica, en región intrónica, con sustitución de una base mediante transición.

3.1.2. Polimorfismo -33T>C del gen *IL4* (rs2070874)

El gen que codifica IL-4 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 5, localización 5q31.1 [OMIM *147780].

Se estudia el SNP localizado en la posición -33, cuyo cambio es T por C.

Se trata de una mutación en la región UTR 5 (zona no traducida del gen colindante a un marco abierto de lectura) con sustitución de una base mediante

transición.

3.1.3. Polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795)

El gen que codifica IL-6 se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7, localización 7p21 [OMIM *147620].

Se estudia el SNP localizado en la región promotora, en la posición -174 con un cambio de G por C. La mutación de G por C destruye un sitio de corte de la enzima SfaNI (LewI) de tal manera que el genotipo GG tiene dos fragmentos de 140 y 58 pb mientras que el genotipo CC tiene sólo un fragmento de 198 pb.

Se trata de una mutación intragénica, en región intrónica, con sustitución de una base mediante transversión.

3.1.4. Polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832)

El gen que codifica CD-40 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 20, localización (20q12-q13.2) [OMIM *109535].

Se estudia el SNP localizado en la posición 1, cuyo cambio es C por T.

Se trata de una mutación en la región UTR 5 (zona no traducida del gen, colindante a un marco abierto de lectura) con sustitución de una base mediante transición.

3.1.5. Polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601)

El gen que codifica ATG2B se encuentra en el brazo largo del cromosoma 14, localización (14q32.2) [OMIM *616226].

Se estudia el SNP localizado en la posición 4147, cuyo cambio es C por G.

Se trata de una mutación intragénica, con sustitución de una base mediante transversión, ocasionando un cambio de sentido (missense) y un cambio de aminoácido glutamina por ácido glutámico (Gln1382Glu) en la proteína.

3.1.6. Polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214)

El gen que codifica ATG5 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 6, localización (6q21) [OMIM *604261].

Se estudia el SNP intrónico, cuyo cambio es C por G.

Se trata de una mutación intragénica, en región intrónica, con sustitución de una base mediante transversión.

3.1.7. Polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183)

El gen que codifica ATG10 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 5, localización (5q14.1) [OMIM *610800].

Se estudia el SNP localizado en la posición 635, cuyo cambio es C por T.

Se trata de una mutación intragénica, con sustitución de una base mediante transición, ocasionando un cambio de sentido (missense) y un cambio de aminoácido treonina por metionina (Thr212Met) en la proteína.

3.1.8. Polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs2241880)

El gen que codifica ATG16L1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 2, localización (2q37.1) [OMIM *610767].

Se estudia el SNP localizado en la posición 898, cuyo cambio es A por G.

Se trata de una mutación intragénica, con sustitución de una base mediante transición, ocasionando un cambio de sentido (missense) y un cambio de aminoácido treonina por alanina (Thr300Ala) en la proteína.

3.2. Estudio de polimorfismos mediante PCR en tiempo real

3.2.1. Descripción

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction) permite generar una gran cantidad de copias de un

fragmento de ADN. El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción la cantidad fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de ADN.

En la PCR en tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea sobre la misma mezcla sin necesidad de realizarlos por separado ^(192,193). Esta técnica sigue el mismo procedimiento de una PCR convencional, pero la amplificación tiene lugar en presencia de unos componentes capaces de emitir fluorescencia, lo que permite conocer y registrar la cinética de la amplificación en todo momento.

En el estudio de los polimorfismos de genes de citocinas y de genes de autofagia se ha realizado la discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman®, que emiten fluorescencia al hibridar con la secuencia complementaria.

En la PCR con sondas Taqman® los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia, se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado.

Esto permite conocer y registrar durante todo el proceso la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR con sondas Taqman® incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR con sondas Taqman pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

Para la discriminación alélica en nuestro estudio, se emplean sondas específicas marcadas con fluorocromos: un donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (quencher) o apantallador en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En todos nuestros ensayos de discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman® los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM con un espectro de excitación máximo λ_{abs} de 538 nm y 495 nm y un espectro de emisión máximo λ_{em} de 554 nm y 535 nm, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1: Principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la PCR con sondas Taqman®

Fluorocromo	Máx λ_{abs} (nm)	Máx λ_{em} (nm)
Cascade blue (varios)	374-403	422-430
YOYO-1	491	509
Bodipy	503	512
Fluoresceína (FITC)	494	520
SYBR Green I	497	520
TOTO-1	513	532
FAM	495	535
Luciferina	430	540
VIC	538	554
JOE	525	555
HEX	530	560
Cy3	552	565
POPO-3	534	570
Rodamina	540	570
NED	553	575
TAMRA	560	580
Naranja de acridina	460,502	526,650
Cy5	643	667
Quantum Red/Red 670	480,565	670
Bromuro de etidio	526	605
ROX	580	605
Red 613	480,565	613
Rojo de Tejas	596	615
Homodimero de etidio	534	616
Yoduro de propidio	536	617
IRD 700	685	705
Cy7	743	767
IRD 800	795	849

Además de estas sondas, la QRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) precisa de los mismos elementos que una PCR convencional: oligonucleótidos o primers, dNTPs –nucleótidos fosfatados-, Taq polimerasa y solución tampón.

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, la

sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la Taq ADN polimerasa (ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*), que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están en ese momento espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 4) ⁽¹⁹⁴⁾.

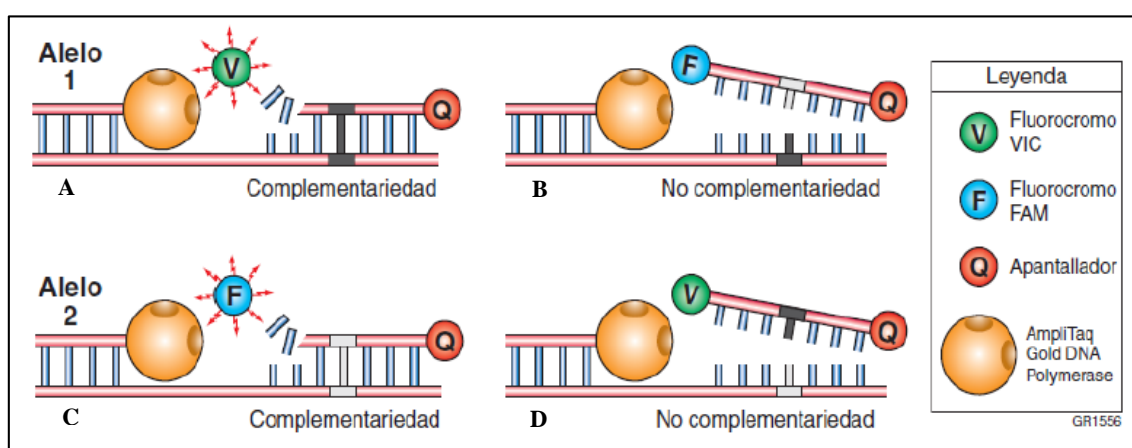


Figura 4: Mecanismo de discriminación alélica mediante sondas Taqman empleando fluorocromos VIC y FAM. Figura tomada de la Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System. A. La sonda TaqMan complementaria de la secuencia de ADN del alelo 1 libera el fluorocromo VIC al hibridarse con su ADN diana. C. La sonda TaqMan complementaria de la secuencia de ADN del alelo 2 libera el fluorocromo FAM al hibridarse con su ADN diana. A y C. La liberación del fluorocromo VIC, del fluorocromo FAM o de ambos determina la detección de la correspondiente fluorescencia, marcando la presencia en la muestra del alelo 1, del alelo 2 o de ambos, respectivamente. B y D. No se produce la liberación del fluorocromo al no hibridarse la sonda TaqMan con el ADN.

El incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida (figura 5). El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

Si sólo se observa fluorescencia para el fluorocromo VIC implica una homocigosidad para el alelo 1; del mismo modo, si sólo se observa fluorescencia para el fluorocromo FAM, implica una homocigosidad para el alelo 2; si ambas señales son fluorescentes significa que existe heterocigosidad.

Nuestro estudio se ha realizado en un termociclador StepOne de Applied Biosystems® que dispone de varios canales de lectura y permite detectar la emisión de

distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar los diferentes alelos descritos en cada uno de los genes estudiados.

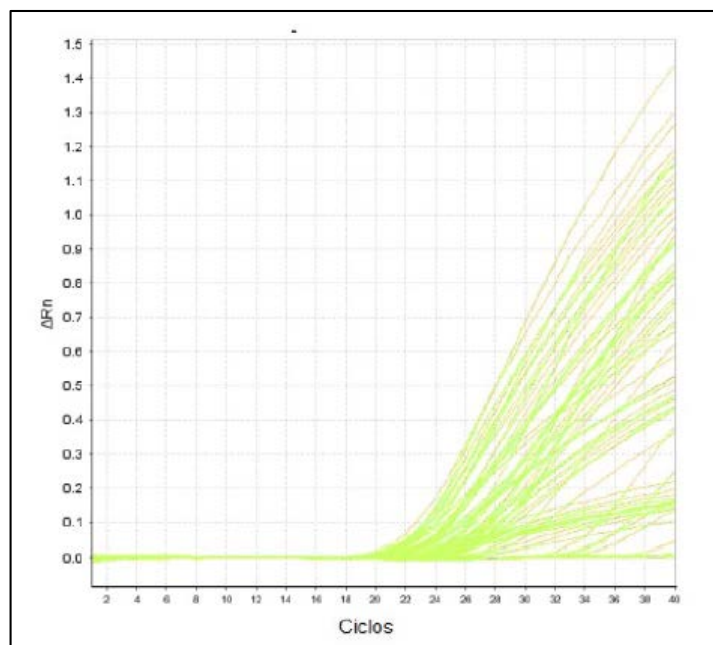


Figura 5: Emisión de fluorescencia en una QRT-PCR a medida que tienen lugar los ciclos de amplificación (StepOne®).

3.2.2. Proceso

La reacción de amplificación se lleva a cabo en el termociclador automático siguiendo el mismo esquema para los distintos SNP's:

a) Realización del sustrato:

Se emplearon placas de 96 pocillos en las que se incluyeron preparaciones que contenían todos los reactivos necesarios para formar el sustrato:

- 5 μ l del compuesto comercial PCR Taqman®, que proporciona la enzima necesaria para la amplificación (polimerasa Taq).
- 0,25 μ l del compuesto comercial que contiene oligonucleótido cebador primer “forward”, oligonucleótido cebador primer “reverse” y las sondas marcadas con fluorocromo de VIC y FAM.
- 4,25 μ l de agua destilada.

MATERIAL Y MÉTODOS

- 1 µl = 10 ng de ADN (concentración = 10 µg/ml).

En el caso de IL6 las reacciones de PCR se realizaron con:

- 5 µl del compuesto comercial PCR TaqMan®, que proporciona el enzima necesaria para la amplificación (polimerasa Taq).
- 0,04 µl de sonda marcada con fluorocromo VIC, 0,04 µl sonda marcada con fluorocromo FAM, 1 µl del oligonucleótido cebador “primer” Forward y 1 µl del oligonucleótido cebador “primer” Reverse.
- 2,42 µl de agua destilada y 1 µl de ADN.

Como control se rellenan ocho celdillas de cada placa con el mismo sustrato, pero sin ADN.

El identificador y secuencia de contexto [VIC/FAM] de las sondas utilizadas se detallan a continuación en la tabla 2:

Tabla 2: Identificador y secuencia de las sondas utilizadas

GEN	IDENTIFICADOR	SECUENCIA DE CONTEXTO [VIC/FAM]
IL1B	C__1839943_10	TACCTTGGGTGCTGTTCTCTGCCTC[G/A]GGAGCTCTCTGTCAATTGCAGGAGC
IL4	C__16176215_10	TTAGCTTCTCCTGATAAACTAATTG[C/T]CTCACATTGTCACTGCAAATCGACA
IL6	C__1839697_20	ACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGC[C/G]ATGCTAAAGGACGTCACATTGCACA
CD40	C__11655919_20	GTCTGCGCCTGGTCTCACCTCGC[C/T]ATGGTTCGTCTGCCTCTGCAGTGCG
ATG2B	C__9690166_10	GCTGACTGTACCTTAGACCTTCTTT[C/G]AAAGGCTCCAGGCTTCATATCTGCC
ATG5	C__3001905_20	ATTTTATATGAACTTATCAGTAGA[C/G]TAGCCAAAAAAGAAGCTTCATATAA
ATG10	C__11953871_20	CTACCTCTGAGTTATGCCAAAGCAA[C/T]GTCTCAGGATGAACGAAATGTCCCT
ATG16L1	C__9095577_20	CCCAGTCCCCCAGGACAATGTGGAT[A/G]CTCATCCTGGTCTGGTAAAGAAGT

b) Fases del programa:

Se coloca la placa realizada en el termociclador Step one ® de Applied Biosystems ® en el que las muestras pasan por las siguientes fases (figura 6):

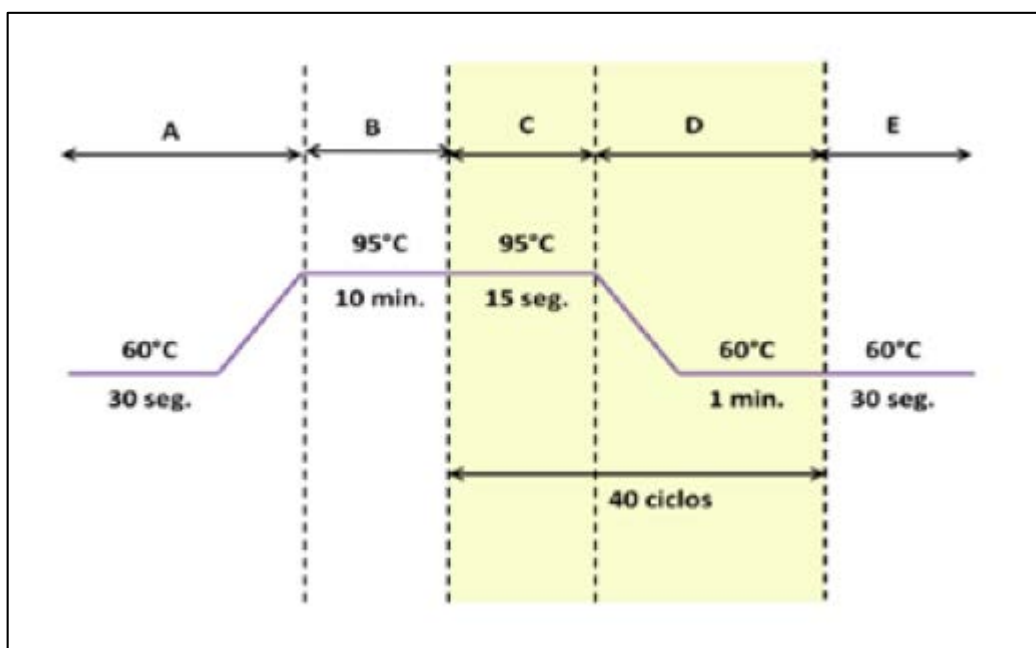


Figura 6: Esquema representativo del programa del termociclador para la realización del genotipado de los polimorfismos en nuestro estudio mediante PCR a tiempo real, donde B es el tiempo de desnaturalización previa, C es el tramo de desnaturalización y anillamiento de los oligonucleótidos y las sonda y D el de elongación. C y D se repiten 40 ciclos. E es el tiempo de extensión final. Se incluyen las respectivas temperaturas de cada tramo.

c) Análisis:

La lectura de fluorescencia se realizó antes y después de la amplificación mediante el sistema StepOne® (Applied Biosystem, Foster City, CA) utilizando el software Allelic Discrimination Program (Applied Biosystem, Foster City, CA) para la determinación del alelo presente en cada una de las muestras. Se realiza un análisis de la detección de fluorescencia que nos ofrece una representación gráfica que muestra los resultados de la discriminación alélica realizada y su distribución en nuestros tres grupos de estudio.

Las gráficas de puntos resultantes, en que cada uno de los puntos es una muestra estudiada, permiten la discriminación alélica en cada uno de los pacientes para el polimorfismo estudiado (figura 7).

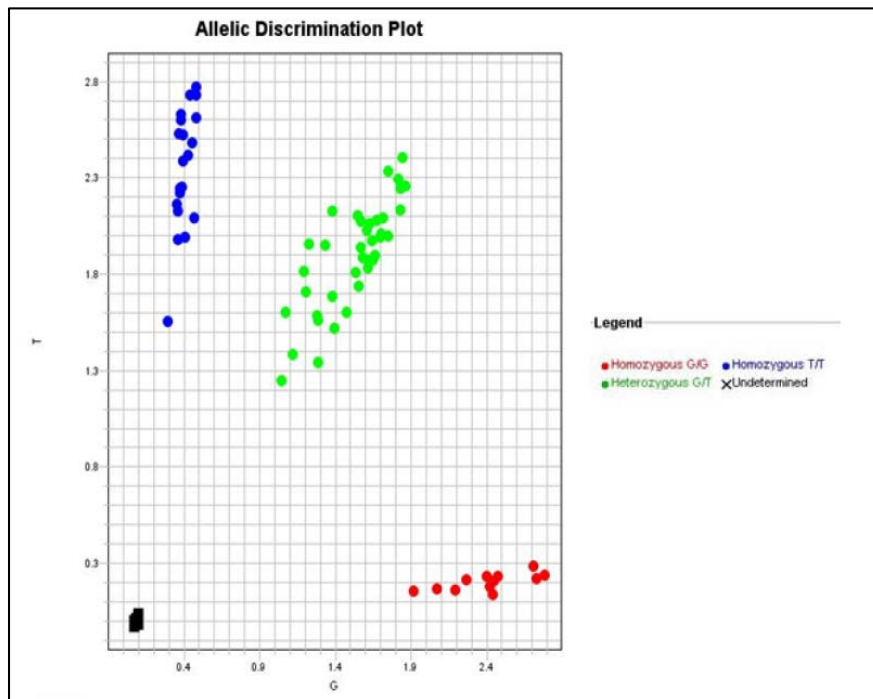


Figura 7: Gráfico de discriminación alélica en el que cada nube de puntos representa a un genotipo: los dos tipos de homocigotos en los extremos y los heterocigotos en el centro. Los cuadrados negros se corresponden con los controles negativos.

En la figura 8 se resume el proceso de discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman®.

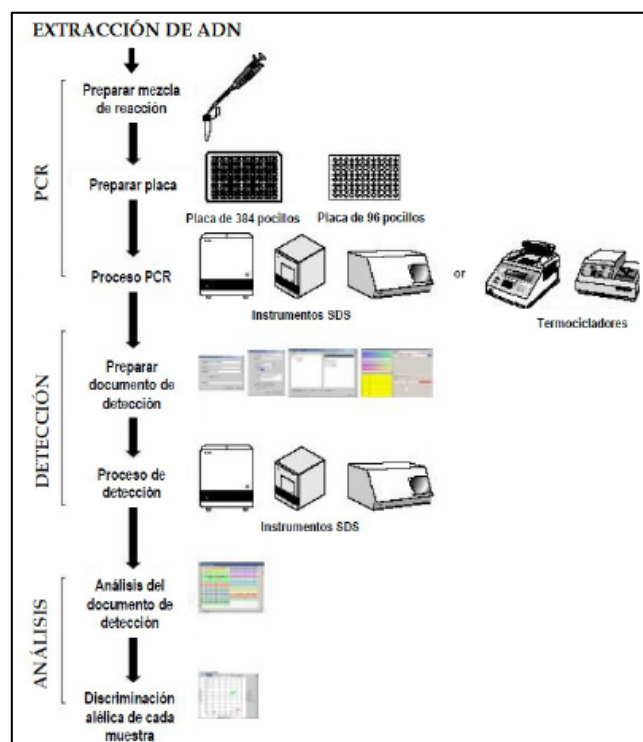


Figura 8: Proceso de discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman®

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar se ha realizado un análisis descriptivo para conocer las características de los sujetos a estudio en lo referente a las variables clínicas recogidas. Para la variable cuantitativa se calculan la media, la mediana y la desviación típica. En el caso de las variables categóricas nominales y ordinales se calcula la proporción de pacientes en cada categoría.

Se completa el estudio estadístico con un apartado de estadística inferencial donde se realizan distintas comparaciones entre variables.

Para poder realizar el análisis de asociación, previamente es necesario comprobar que se cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg. El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones normales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar un determinado genotipo depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo ⁽¹⁹⁵⁾. El método más sencillo para comprobar la existencia de equilibrio Hardy-Weinberg se basa en el test de chi-cuadrado, que compara las frecuencias observadas con las esperadas. Si el test no es estadísticamente significativo implica que no se puede rechazar la hipótesis nula (frecuencias observadas = frecuencias esperadas) y, por lo tanto, se cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg. Si se observara una desviación del equilibrio se debería revisar el método de genotipificación ya que se pueden producir sesgos al interpretar los resultados por ser más fácil de detectar un genotipo que otros. En la muestra de casos es posible que no se cumpla el equilibrio de Hardy-Weinberg, pudiendo indicar una asociación del polimorfismo con la enfermedad.

Para valorar si existe asociación entre alguno de los genotipos o alelos estudiados y la enfermedad, así como en los diferentes grupos en función de las variables clínicas, se han realizado tablas de contingencia conteniendo las frecuencias de cada uno de los genotipos en los grupos de comparación. De este modo, se comparan los valores observados de cada genotipo con los valores esperados, asumiendo que

ambos grupos tienen frecuencias genotípicas idénticas. La existencia de diferencias en las frecuencias genotípicas entre ambos grupos puede indicar la asociación de un genotipo determinado con uno de ellos. Para valorar si las diferencias en la distribución genotípica entre los dos grupos son estadísticamente significativas y no se deben simplemente al azar, se realiza la prueba de chi-cuadrado (χ^2) o test exacto de Fisher.

Para poder conocer la magnitud del riesgo que cada genotipo aporta al desarrollo de la enfermedad según los diferentes modelos de herencia (ver más adelante), se ha realizado un modelo de regresión logística binaria que nos aporta el Odds Ratio (OR) y su intervalo de confianza del 95% de cada genotipo (o suma de genotipos) respecto al de referencia. Los intervalos de confianza del 95% de los OR que no contienen el 1 indican que el resultado es estadísticamente significativo, es decir, que ese genotipo aumenta ($OR > 1$) o disminuye ($OR < 1$), de una manera significativa, el riesgo de padecer la enfermedad respecto al genotipo de referencia.

Todos los análisis estadísticos se han realizado con el programa informático SPSS, (versión 21.0; SPSS Inc., Chicago, IL). Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor asociado a la prueba es menor a 0,05.

Para establecer los modelos de herencia, consideramos que el alelo variante de cada polimorfismo modifica el riesgo para padecer la enfermedad. Ya que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado con cada genotipo puede depender del número de copias de dicho alelo variante.

Los principales modelos de herencia son ⁽¹⁹⁵⁾:

- Modelo codominante: Es el más general; cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente. Se comparan heterocigotos y homocigotos variantes por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente.
- Modelo dominante: Supone que una única copia del alelo variante es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de dos copias lo modifica en igual magnitud, es decir, heterocigotos y homocigotos variantes tienen el mismo riesgo. Se puede comparar la combinación de estos dos genotipos respecto a los homocigotos del alelo más frecuente.
- Modelo recesivo: Supone que son necesarias 2 copias del alelo variante para

modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos y homocigotos del alelo más frecuente tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo variante.

RESVLTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

1.1. Descripción de los casos

1.1.1. Edad y sexo

Se estudian un total de 200 casos de tiroiditis autoinmune, con una mediana de edad de 41 años, una media de 42,96 años y una desviación estándar de 13,27 años. En el momento del diagnóstico, la paciente más joven tenía 19 años y la de mayor edad 79 años.

Se han eliminado de la muestra inicial los varones dado el escaso número de casos disponibles que, en caso de incluirse, podrían afectar al análisis como factor de confusión.

1.1.2. Antecedentes familiares

La distribución de los pacientes respecto a la presencia de antecedentes familiares de tiroidopatía se muestra en la figura 9 y en la tabla 3.

Más de la mitad de los pacientes refirieron en la anamnesis tener familiares portadores de tiroidopatía. No se pudo determinar de manera fiable el tipo de enfermedad tiroidea ante la falta de datos ofrecidos por los enfermos.

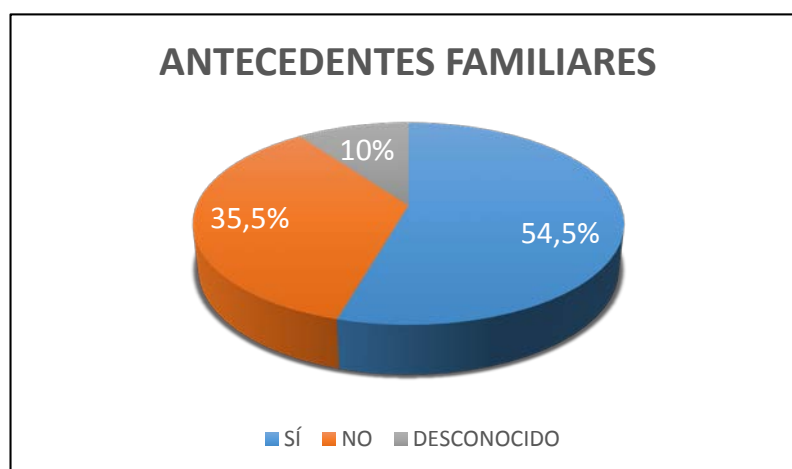


Figura 7: Distribución de pacientes respecto a la presencia de antecedentes familiares de tiroidopatía

RESVLTADOS

Tabla 3: Distribución de pacientes respecto a la presencia de antecedentes familiares de tiroidopatía

ANTECEDENTES FAMILIARES	n	PORCENTAJE (%)
SÍ	109	54,5
NO	71	35,5
DESCONOCIDO	20	10

1.1.3. Consumo de sal yodada

En la figura 10 y en la tabla 4 se pueden observar los datos obtenidos en cuanto al consumo de sal yodada por los pacientes con tiroiditis autoinmune.

Hay un alto volumen de datos perdidos al no constatarse esta información al realizar la historia clínica a los enfermos.

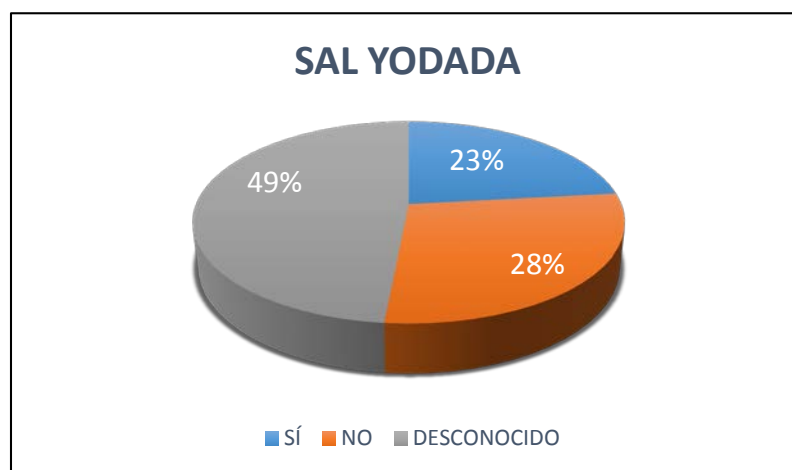


Figura 8: Distribución de pacientes respecto al consumo de sal yodada.

Tabla 4: Distribución de pacientes respecto al consumo de sal yodada

SAL YODADA	n	PORCENTAJE (%)
SÍ	46	23
NO	56	28
DESCONOCIDO	98	49

1.1.4. Procedencia de zona endémica

La distribución de los enfermos en función de la procedencia o no de una zona endémica de bocio y, por tanto, de yododeficiencia, se refleja en la figura 11 y en la tabla 5.

La mayor parte de los pacientes no procedían o residían en zonas pobres en yodo, aunque hay un alto porcentaje en los que no se recogió este dato a la anamnesis.

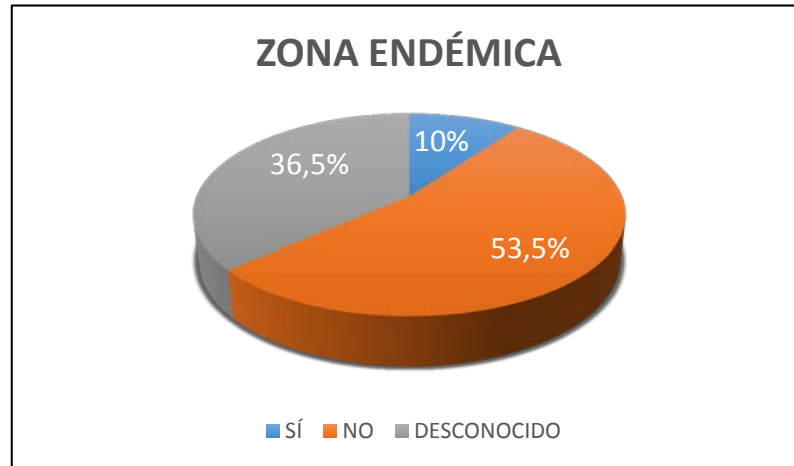


Figura 9: Distribución de pacientes respecto a la procedencia de zona endémica de bocio

Tabla 5: Distribución de pacientes respecto a la procedencia de zona endémica de bocio

ZONA ENDÉMICA	n	PORCENTAJE (%)
SÍ	20	10
NO	107	53,5
DESCONOCIDO	73	36,5

1.1.5. Presencia de bocio

En lo que respecta a la presencia de bocio a la exploración cervical, se observa una pequeña inclinación hacia la ausencia de crecimiento glandular (0a y 0b), predominando por tanto las formas no bociosas. Los datos encontrados se presentan en las figuras 12 y 13 y en las tablas 6 y 7.

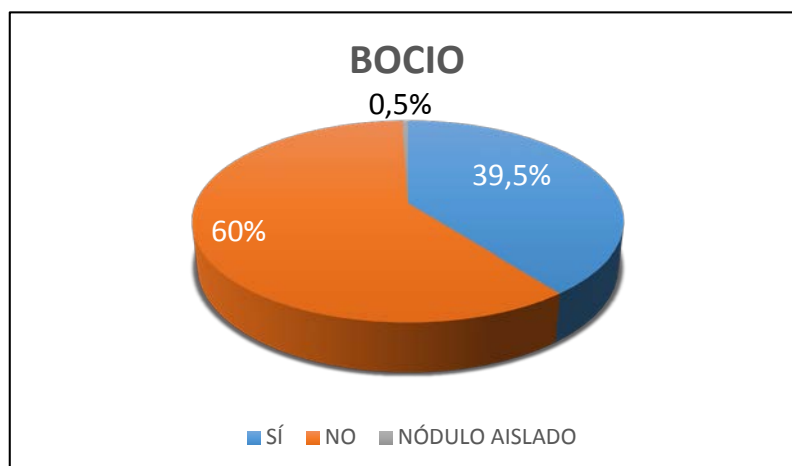


Figura 10: Distribución de pacientes respecto a la presencia de bocio

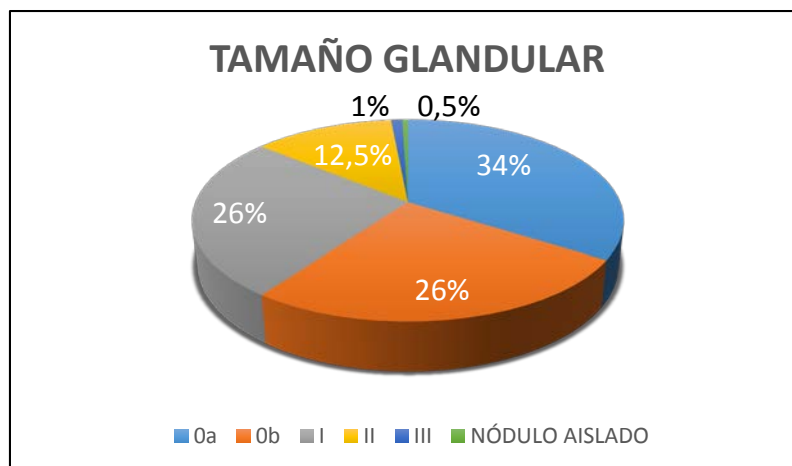


Figura 11: Distribución de pacientes respecto al tamaño glandular tiroideo

Tabla 6: Distribución de pacientes respecto a la presencia de bocio

BOCIO	n	PORCENTAJE (%)
SÍ	79	39,5
NO	120	60
NÓDULO AISLADO	1	0,5

Tabla 7: Distribución de pacientes respecto al tamaño glandular tiroideo

TAMAÑO GLANDULAR	n	PORCENTAJE (%)
0a	68	34
0b	52	26
I	52	26
II	25	12,5
III	2	1
NÓDULO AISLADO	1	0,5

1.1.6. Estudio de anticuerpos antitiroideos

Los pacientes presentaban, como condición diagnóstica, positividad de anticuerpos antitiroideos. Se ha valorado la positividad de anticuerpos antitiroglobulina y antiperoxidasa de manera independiente, y también las diferentes posibilidades de combinación de ambos. Se recogen los datos en las figuras 14 a 16 y en las tablas 8 a 10.

Se puede observar una mayor prevalencia de títulos positivos de anticuerpos antiperoxidasa, que presentan casi la totalidad de los enfermos. Más de la mitad de los pacientes con tiroiditis autoinmune son portadores de ambos anticuerpos antitiroideos.

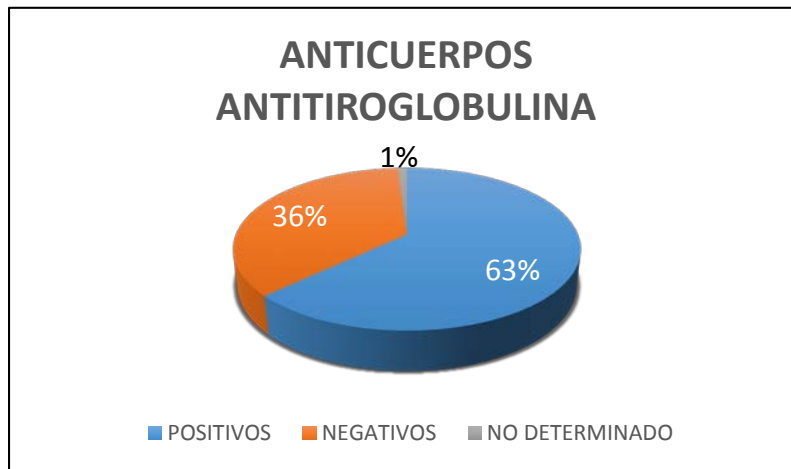


Figura 14: Distribución de pacientes respecto a la positividad de anticuerpos antitiroglobulina



Figura 12: Distribución de pacientes respecto a la positividad de anticuerpos antiperoxidasa

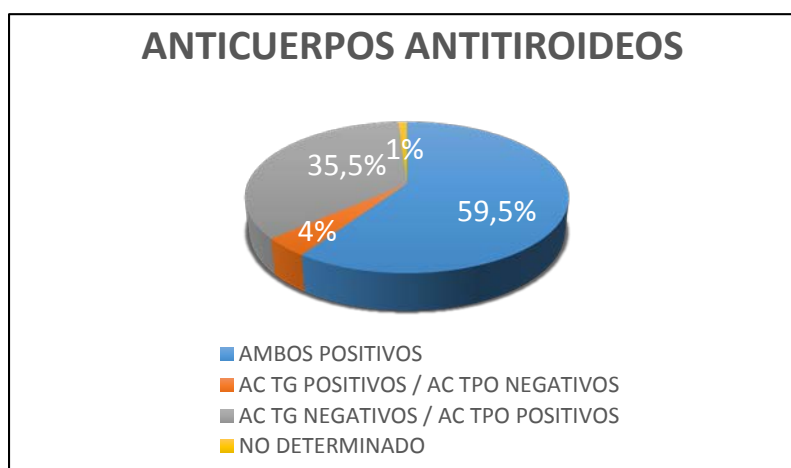


Figura 13: Distribución de pacientes respecto a la positividad de anticuerpos antitiroideos

RESVLTADOS

Tabla 8: Distribución de pacientes respecto a la positividad de anticuerpos antitiroglobulina

ANTICUERPOS ANTITIROGLOBULINA	n	PORCENTAJE (%)
POSITIVOS	126	63
NEGATIVOS	72	36
NO DETERMINADO	2	1

Tabla 9: Distribución de pacientes respecto a la positividad de anticuerpos antiperoxidasa

ANTICUERPOS ANTIPEROXIDASA	n	PORCENTAJE (%)
POSITIVOS	193	96,5
NEGATIVOS	7	3,5

Tabla 10: Distribución de pacientes respecto a la positividad de anticuerpos antitiroideos

ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS	n	PORCENTAJE (%)
AMBOS POSITIVOS	119	59,5
AC. TG POSITIVOS / AC. TPO NEGATIVOS	8	4
AC. TG NEGATIVOS / AC. TPO POSITIVOS	71	35,5
NO DETERMINADO	2	1

1.1.7. Función tiroidea

En la tabla 11 y en la figura 17 se muestran los grupos de pacientes según la funcionalidad tiroidea en el momento del diagnóstico. Casi la totalidad de los pacientes presentaban hipotiroidismo y un pequeño porcentaje permanecían eutiroideos. Sólo hubo casos aislados de hipertiroidismo en el contexto de hashitoxicosis o de coadyuvancia de enfermedad de Graves-Basedow.

Entre los pacientes hipotiroideos, el 70% presentaban un defecto funcional leve con valores de hormonas tiroideas mantenidos en límites normales (hipotiroidismo subclínico), mientras que el 30% restante ya habían desarrollado un hipotiroidismo clínico con déficit de T4L.

Tabla 11: Distribución de pacientes respecto a la funcionalidad tiroidea

FUNCIÓN TIROIDEA	n	PORCENTAJE (%)
EUTIROIDISMO	21	10,5
HIPOTIROIDISMO	174	87
HIPERTIROIDISMO	2	1
HIPERTIROIDISMO POR EGB	3	1,5

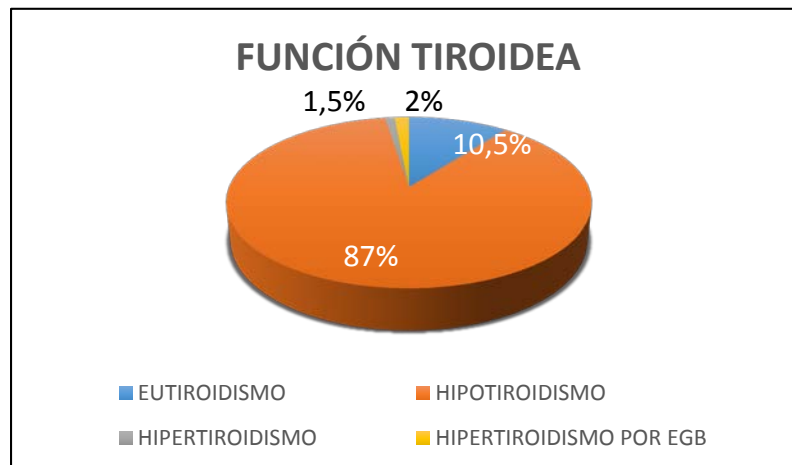


Figura 15: Distribución de pacientes respecto a la funcionalidad tiroidea

1.2. Descripción de los controles

Se incluyen un total de 166 controles mujeres para el estudio de polimorfismos de CD40 e IL4 y 240 controles mujeres para el estudio del resto de polimorfismos IL6, IL1B y ATG. Los datos de edad se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Datos de edad de los controles

POLIMORFISMOS	CD40 – IL4	IL6	IL1B	ATG
MEDIA DE EDAD	49,32	45,03	49,07	53,51
MEDIANA	48,5	47	49	53
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	17,35	11,66	12,31	15,71
EDAD MÍNIMA	14	14	19	22
EDAD MÁXIMA	91	62	81	83

Se calcula la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en los controles por medio del test χ^2 para cada polimorfismo. La distribución de los genotipos de cada polimorfismo en los controles sanos cumple el equilibrio en todos los casos, con p valor $>0,01$, tal y como se refleja en la tabla 13.

Tabla 13: Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg en los controles

POLIMORFISMO	χ^2	P VALOR
IL1B (rs 16944)	4,8	0,028
IL4 (rs2070874)	2,21	0,137
IL6 (rs1800795)	5,99	0,014
CD40 (rs1883832)	0,68	0,409
ATG2B (rs3759601)	0,871	0,351

POLIMORFISMO	χ^2	P VALOR
ATG5 (rs2245214)	0,377	0,539
ATG10 (rs1864183)	0,813	0,367
ATG16L1 (rs 2241880)	0,07	0,797

2. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS

2.1. Polimorfismo -511 C>G del gen IL1B (rs 16944)

2.1.1. Estudio caso-control

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 14.

En el análisis de riesgo del polimorfismo en función del modelo de herencia tampoco se observan diferencias significativas. En la tabla 15 se reflejan los datos del estudio.

Tabla 14: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -511 C>G del gen IL1B (rs 16944) estudiadas en pacientes con tiroiditis autoinmune (casos) e individuos sanos (controles)

IL1B	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	OR (IC AL 95%)	P
ALELO G	271 (67,8%)	307 (64%)	1,184 (0,894;1,567) 1	0,238
ALELO A	129 (32,2%)	173 (36%)		
HOMOCIGOTO GG	97 (48,5%)	106 (44,2%)		0,533
HETEROCIGOTO AG	77 (38,5%)	95 (39,6%)		
HOMOCIGOTO AA	26 (13%)	39 (16,2%)		

Tabla 15: Análisis del riesgo de polimorfismo -511 C>G del gen IL1B (rs 16944) en función del modelo de herencia

MODELO	GENOTIPO IL1B	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	OR	IC 95 %	P
CODOMINANTE	GG	106 (44,2%)	97 (48,5%)	1		
	AG	95 (39,6%)	77 (38,5%)	0,886	0,589-1,331	0,560
	AA	39 (16,2%)	26 (13%)	0,729	0,413-1,285	0,274
DOMINANTE	GG	106 (44,2%)	97 (48,5%)	1		
	AG+AA	134 (55,8%)	103 (51,5%)	0,840	0,576-1,224	0,364
RECESIVO	AA	39 (16,2%)	26 (13%)	1		
	AG+GG	201 (83,8%)	174 (87%)	1,299	0,760-2,220	0,340

2.1.2. Estudio según las variables clínicas

Se realiza también el estudio de distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo 511 C>G del gen IL1B (rs 16944) en los distintos grupos de pacientes, estratificados en función de las variables clínicas recogidas en la revisión de datos: antecedentes familiares de tiroidopatía, consumo de sal yodada, procedencia de zona endémica de bocio, presencia de bocio y tamaño glandular, positividad de anticuerpos antitiroideos de manera individual y combinados, y función tiroidea. Se reflejan los resultados obtenidos en las tablas 16 a 24.

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la procedencia de zona endémica, positividad o negatividad de anticuerpos antiperoxidasa, y estudio de ambos anticuerpos antitiroideos.

En el primer caso (procedencia de zona endémica) se completa el estudio con el análisis según modelos de herencia, confirmándose la existencia de diferencias. Los resultados se muestran en la tabla 25. Los pacientes que no proceden de zona endémica de yodo presentan de manera más frecuente, en el modelo de herencia codominante, un genotipo heterocigoto (un alelo habitual y un alelo variante) que aquéllos que proceden de zona endémica. No hay significación en el resto de modelos de herencia.

En el segundo caso (positividad o negatividad de anticuerpos antiperoxidasa), no se observan diferencias estadísticamente significativas en el análisis según modelos de herencia (tabla 26).

En el estudio de las combinaciones de anticuerpos antitiroideos no se ha realizado el análisis según modelos de herencia ya que en la agrupación de las variables (ambos anticuerpos positivos, frente a solo uno de los anticuerpos positivo) se pierde la significación en la distribución de las frecuencias genotípicas ($p=0,72$).

RESVLTADOS

Tabla 16: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 511 C>G del gen IL1B (rs 16944) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la existencia de antecedentes familiares de tiroidopatía

			ANTECEDENTES FAMILIARES	
			SÍ	NO
IL1B p=0,319	GG	n	47	38
		%	43,1%	53,5%
	AG	n	45	26
		%	41,3%	36,6%
	AA	n	17	7
		%	15,6%	9,9%

Tabla 17: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 511 C>G del gen IL1B (rs 16944) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del consumo de sal yodada

			SAL YODADA	
			SÍ	NO
IL1B p=0,964	GG	n	25	29
		%	54,4%	51,8%
	AG	n	15	19
		%	32,6%	33,9%
	AA	n	6	8
		%	13%	14,3%

Tabla 18: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 511 C>G del gen IL1B (rs 16944) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la procedencia de zona endémica de bocio (yododeficiente)

			ZONA ENDÉMICA	
			SÍ	NO
IL1B <u>p=0,012</u>	GG	n	13	50
		%	65%	46,7%
	AG	n	2	46
		%	10%	43%
	AA	n	5	11
		%	25%	10,3%

Tabla 19: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 511 C>G del gen IL1B (rs 16944) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la presencia o no de bocio

			BOCIO		
			NO	SI	NÓDULO AISLADO
IL1B p=0,656	GG	n	60	36	1
		%	50%	45,6%	100%
	AG	n	47	30	0
		%	39,2%	38%	0%
	AA	n	13	13	0
		%	10,8%	16,4%	0%

Tabla 20: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 511 C>G del gen IL1B (rs 16944) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del tamaño glandular

			TAMAÑO GLANDULAR					
			0a	0b	I	II	III	NÓDULO AISLADO
IL1B p=0,624	GG	n	34	26	23	12	1	1
		%	50%	50%	44,2%	48%	50%	100%
	AG	n	24	23	18	11	1	0
		%	35,3%	44,2%	34,6%	44%	50%	0%
	AA	n	10	3	11	2	0	0
		%	14,7%	5,8%	21,2%	8%	0%	0%

Tabla 21: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 511 C>G del gen IL1B (rs 16944) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroglobulina

			Ac TG	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
IL1B p=0,190	GG	n	39	56
		%	54,2%	44,4%
	AG	n	22	55
		%	30,6%	43,7%
	AA	n	11	15
		%	15,2%	11,9%

RESVLTADOS

Tabla 22: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 511 C>G del gen IL1B (rs 16944) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antiperoxidasa

			Ac TPO	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
IL1B p=0,032	GG	n	1	96
		%	14,3%	49,7%
	AG	n	6	71
		%	85,7%	36,8%
	AA	n	0	26
		%	0%	13,5%

Tabla 23: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 511 C>G del gen IL1B (rs 16944) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroideos

			ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS		
			AMBOS POSITIVOS	Ac TG + Ac TPO -	Ac TG - Ac TPO +
IL1B p=0,028	GG	n	55	1	39
		%	46,2%	12,5%	54,9%
	AG	n	49	7	21
		%	41,2%	87,5%	29,6%
	AA	n	15	0	11
		%	12,6%	0%	15,5%

Tabla 24: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 511 C>G del gen IL1B (rs 16944) en los pacientes con tiroiditis autoinmune según la funcionalidad tiroidea

			FUNCIÓN TIROIDEA			
			EUROIDISMO	HIPOTIROIDISMO	HIPERTIROIDISMO	EGB
IL1B p=0,637	GG	n	12	82	1	2
		%	57,1%	47,1%	50%	66,7%
	AG	n	7	69	0	1
		%	33,3%	39,7%	0%	33,3%
	AA	n	2	23	1	0
		%	9,6%	13,2%	50%	0%

Tabla 25: Análisis del riesgo del polimorfismo 511 C>G del gen IL1B (rs 16944), en función del modelo de herencia, entre pacientes procedentes o no de zona endémica de bocio

MODELO	GENOTIPO IL1B	ZONA ENDÉMICA N (%)	ZONA NO ENDÉMICA N (%)	OR	IC 95 %	P
CODOMINANTE	GG	13 (65%)	50 (46,7%)	1		
	AG	2 (10%)	46 (43%)	5,980	1,280-27,939	0,023
	AA	5 (25%)	11 (10,3%)	0,572	0,169-1,939	0,370
DOMINANTE	GG	13 (65%)	50 (46,7%)	1		
	AG+AA	7 (35%)	57 (53,3%)	2,117	0,783-5,722	0,139
RECESIVO	AA	5 (25%)	11 (10,3%)	1		
	AG+GG	15 (75%)	96 (89,7%)	2,909	0,886-9,552	0,078

Tabla 26: Análisis del riesgo de polimorfismo IL1B, en función del modelo de herencia, entre pacientes con anticuerpos antiperoxidasa positivos o negativos

MODELO	GENOTIPO IL1B	NEGATIVOS N (%)	POSITIVOS N (%)	OR	IC DEL 95 %	P
CODOMINANTE	GG	1 (14,3%)	96 (49,7%)	1		
	AG	6 (85,7%)	71 (36,8%)	0,123	0,015-1,047	0,055
	AA	0 (0%)	26 (13,5%)	-	-	-
DOMINANTE	GG	1 (14,3%)	96 (49,7%)	1		
	AG+AA	6 (85,7%)	97 (50,3%)	0,168	0,020-1,425	0,102
RECESIVO	AA	0 (0%)	26 (13,5%)	1		
	AG+GG	7 (100%)	167 (86,5%)	-	-	-

2.2. Polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874)

2.2.1. Estudio caso-control

Se estudia la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos. Los resultados del estudio se reflejan en la tabla 27. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas.

Tampoco se observan diferencias significativas en el estudio de riesgo del polimorfismo en función del modelo de herencia. En la tabla 28 se muestran los datos del análisis.

RESVLTADOS

Tabla 27: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) estudiadas en pacientes con tiroiditis autoinmune (casos) e individuos sanos (controles)

IL4	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	OR (IC al 95%)	P
ALELO C	333 (83,3%)	278 (83,7%)	1 1,036 (0,700;1,533)	0,860
ALELO T	67 (16,7%)	54 (16,3%)		
HOMOCIGOTO CC	140 (70%)	119 (71,7%)		0,833
HETEROCIGOTO CT	53 (26,5%)	40 (24,1%)		
HOMOCIGOTO TT	7 (3,5%)	7 (4,2%)		

Tabla 28: Análisis del riesgo de polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en función del modelo de herencia

MODELO	GENOTIPO IL4	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	OR	IC 95 %	P
CODOMINANTE	CC	119 (71,7%)	140 (70%)	1		
	CT	40 (24,1%)	53 (26,5%)	1,126	0,698-1,816	0,626
	TT	7 (4,2%)	7 (3,5%)	0,850	0,290-2,492	0,767
DOMINANTE	CC	119 (71,7%)	140 (70%)	1		
	CT+TT	47 (28,3%)	60 (30%)	1,085	0,690-1,707	0,724
RECESIVO	TT	7 (4,2%)	7 (3,5%)	1		
	CT+CC	159 (95,8%)	193 (96,5%)	1,214	0,417-3,533	0,722

2.2.2. Estudio según las variables clínicas

Se realiza también el estudio de distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en los distintos grupos de pacientes, estratificados en función de las variables clínicas recogidas en la revisión de datos: antecedentes familiares de tiroidopatía, consumo de sal yodada, procedencia de zona endémica de bocio, presencia de bocio y tamaño glandular, positividad de anticuerpos antitiroideos de manera individual y combinados, y función tiroidea. Se muestran los resultados observados en las tablas 29 a 37.

Se detectan diferencias estadísticamente significativas en cuanto al consumo de sal yodada, la presencia de bocio y el tamaño glandular.

El estudio sobre el consumo de sal yodada se completa con el análisis según modelos de herencia, cuyos datos se muestran en la tabla 38. Se han observado diferencias estadísticamente significativas. Los pacientes que no consumen sal yodada presentan de manera más frecuente, en el modelo de herencia codominante, un genotipo heterocigoto (un alelo habitual y un alelo variante) que aquéllos que consumen sal

yodada. Lo mismo ocurre en el modelo dominante de herencia, en que los enfermos que no consumen sal yodada son portadores del alelo variante T de manera más frecuente.

En el estudio de bocio y tamaño glandular no se realiza el análisis según modelos de herencia ya que al realizar la agrupación de las variables (incluyendo el único paciente con nódulo sin bocio en el grupo de bocio) se pierde la significación en la distribución de las frecuencias genotípicas ($p=0,616$).

Tabla 29: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la existencia de antecedentes familiares de tiroidopatía

			ANTECEDENTES FAMILIARES	
			SÍ	NO
IL4 $p=0,051$	CC	n	79	46
		%	72,5%	64,8%
	CT	n	25	25
		%	22,9%	35,2%
	TT	n	5	0
		%	4,6%	0%

Tabla 30: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del consumo de sal yodada

			SAL YODADA	
			SÍ	NO
IL4 $p=0,027$	CC	n	37	31
		%	80,4%	55,4%
	CT	n	8	21
		%	17,4%	37,5%
	TT	n	1	4
		%	2,2%	7,1%

Tabla 31: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la procedencia de zona endémica de bocio (yododeficiente)

			ZONA ENDÉMICA	
			SÍ	NO
IL4 $p=0,258$	CC	n	12	77
		%	60%	72%
	CT	n	6	27
		%	30%	25,2%
	TT	n	2	3
		%	10%	2,8%

RESVLTADOS

Tabla 32: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la presencia o no de bocio

			BOCIO		
			NO	SÍ	NÓDULO AISLADO
IL4 p=0,000	CC	n	84	56	0
		%	70%	70,9%	0%
	CT	n	33	20	0
		%	27,5%	25,3%	0%
	TT	n	3	3	1
		%	2,5%	3,8%	100%

Tabla 33: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del tamaño glandular

			TAMAÑO GLANDULAR					NÓDULO AISLADO
			0a	0b	I	II	III	
IL4 p=0,001	CC	n	50	34	38	17	1	0
		%	73,5%	65,4%	73,1%	68%	50%	0%
	CT	n	16	17	12	7	1	0
		%	23,5%	32,7%	23,1%	28%	50%	0%
	TT	n	2	1	2	1	0	1
		%	3%	1,9%	3,8%	4%	0%	100%

Tabla 34: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroglobulina

			Ac TG	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
IL4 p=0,898	CC	n	49	89
		%	68%	70,6%
	CT	n	20	33
		%	27,8%	26,2%
	TT	n	3	4
		%	4,2%	3,2%

Tabla 35: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antiperoxidasa

			Ac TPO	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
IL4 p=0,632	CC	n	6	134
		%	85,7%	69,4%
	CT	n	1	52
		%	14,3%	27%
	TT	n	0	7
		%	0%	3,6%

Tabla 36: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroideos

			ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS		
			AMBOS POSITIVOS	TG + TPO -	TG - TPO +
IL4 p=0,834	CC	n	83	7	48
		%	69,7%	87,5%	67,6%
	CT	n	32	1	20
		%	26,9%	12,5%	28,2%
	TT	n	4	0	3
		%	3,4%	0%	4,2%

Tabla 37: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en los pacientes con tiroiditis autoinmune según la funcionalidad tiroidea

			FUNCIÓN TIROIDEA			
			EUROIDISMO	HIPOTIROIDISMO	HIPERTIROIDISMO	EGB
IL4 p=0,987	CC	n	14	123	1	2
		%	66,6%	70,7%	50%	66,7%
	CT	n	6	45	1	1
		%	28,6%	25,9%	50%	33,3%
	TT	n	1	6	0	0
		%	4,8%	3,4%	0%	0%

RESVLTADOS

Tabla 38: Análisis del riesgo de polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en función del modelo de herencia, entre pacientes que consumen sal yodada o no

MODELO	GENOTIPO IL4	NO SAL N (%)	SÍ SAL N (%)	OR	IC 95 %	p
CODOMINANTE	CC	31 (55,4%)	37 (80,4%)	1		
	CT	21(37,5%)	8 (17,4%)	0,319	0,124-0,820	0,018
	TT	4 (7,1%)	1 (2,2%)	0,209	0,022-1,973	0,172
DOMINANTE	CC	31 (55,4%)	37 (80,4%)	1		
	CT+TT	25 (44,6%)	9 (19,6%)	0,302	0,123-0,741	0,009
RECESIVO	TT	4 (7,1%)	1 (2,2%)	1		
	CT+CC	52 (92,9%)	45 (97,8%)	3,462	0,373-32,106	0,275

2.3. Polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795)

2.3.1. Estudio caso-control

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 39.

En el análisis de riesgo del polimorfismo en función del modelo de herencia tampoco se observan diferencias significativas. En la tabla 40 se recogen los datos del estudio.

Tabla 39: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795) en pacientes con tiroiditis autoinmune (casos) e individuos sanos (controles)

IL6	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	OR (IC AL 95%)	P
ALELO C	181 (45,3%)	235 (49%)	1,072 (0,815;1,410)	0,618
ALELO G	219 (54,7%)	245 (51%)		
HOMOCIGOTO CC	46 (23%)	67 (27,9%)		0,498
HETEROCIGOTO CG	89 (44,5%)	101 (42,1%)		
HOMOCIGOTO GG	65 (32,5%)	72 (30%)		

Tabla 40: Análisis del riesgo de polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795) en función del modelo de herencia

MODELO	GENOTIPO IL6	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	OR	IC 95%	p
CODOMINANTE	CC	67 (27,9%)	46 (23%)	1		
	CG	101 (42,1%)	89 (44,5%)	1,283	0,801-2,056	0,299
	GG	72 (30%)	65 (32,5%)	1,315	0,795-2,175	0,286
DOMINANTE	CC	67 (27,9%)	46 (23%)	1		
	CG+GG	173 (72,1%)	154 (77%)	1,297	0,840-2,000	0,240
RECESIVO	GG	72 (30%)	65 (32,5%)	1		
	CG+CC	168 (70%)	135 (67,5%)	0,890	0,594-1,334	0573

2.3.2. Estudio según las variables clínicas

También se realiza el análisis de distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795) en los distintos grupos de pacientes, estratificados en función de las diferentes variables clínicas: antecedentes familiares de tiroidopatía, consumo de sal yodada, procedencia de zona endémica de bocio, presencia de bocio y tamaño glandular, positividad de anticuerpos antitiroideos de manera individual y combinados, y función tiroidea. Se muestran los resultados observados en las tablas 41 a 49. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 41: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la existencia de antecedentes familiares de tiroidopatía

			ANTECEDENTES FAMILIARES	
			SÍ	NO
IL6 p=0,266	CC	n	29	16
		%	26,6%	22,5%
	CG	n	42	36
		%	38,5%	50,7%
	GG	n	38	19
		%	34,9%	26,8%

RESVLTADOS

Tabla 42: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del consumo de sal yodada

			SAL YODADA	
			SÍ	NO
IL6 p=0,554	CC	n	9	12
		%	19,5%	21,4%
	CG	n	21	30
		%	45,7%	53,6%
	GG	n	16	14
		%	34,8%	25%

Tabla 43: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la procedencia de zona endémica de bocio (yododeficiente)

			ZONA ENDÉMICA	
			SÍ	NO
IL6 p=0,276	CC	n	7	24
		%	35%	22,4%
	CG	n	6	52
		%	30%	48,6%
	GG	n	7	31
		%	35%	29%

Tabla 44: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la presencia o no de bocio

			BOCIO		
			NO	SÍ	NÓDULO AISLADO
IL6 p=0,42	CC	n	29	17	0
		%	24,2%	21,6%	0%
	CG	n	57	31	1
		%	47,5%	39,2%	100%
	GG	n	34	31	0
		%	28,3%	39,2%	0%

Tabla 45: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del tamaño glandular

			TAMAÑO GLANDULAR					NÓDULO AISLADO
			0A	0B	I	II	III	
IL6 p=0,243	CC	n	16	13	14	2	1	0
		%	23,5%	25%	26,9%	8%	50%	0%
	CG	n	37	20	20	11	0	1
		%	54,4%	38,5%	38,5%	44%	0%	100%
	GG	n	15	19	18	12	1	0
		%	22,1%	36,5%	34,6%	48%	50%	0%

Tabla 46: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroglobulina

			Ac TG	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
IL6 p=0,886	CC	n	18	28
		%	25%	22,2%
	CG	n	31	58
		%	43,1%	46%
	GG	n	23	40
		%	31,9%	31,8%

Tabla 47: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de positividad o negatividad de los anticuerpos antiperoxidasa

			Ac TPO	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
IL6 p=0,943	CC	n	2	44
		%	28,6%	22,8%
	CG	n	3	86
		%	42,8%	44,6%
	GG	n	2	63
		%	28,6%	32,6%

Tabla 48: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroideos

			ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS		
			AMBOS POSITIVOS	TG + TPO -	TG - TPO +
IL6 p=0,972	CC	n	26	2	18
		%	21,9%	25%	25,3%
	CG	n	55	3	31
		%	46,2%	37,5%	43,7%
	GG	n	38	3	22
		%	31,9%	37,5%	31%

Tabla 49: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la funcionalidad tiroidea

			FUNCIÓN TIROIDEA			
			EUTIROIDISMO	HIPOTIROIDISMO	HIPERTIROIDISMO	EGB
IL6 p=0,07	CC	n	1	44	1	0
		%	4,8%	25,3%	50%	0%
	CG	n	9	77	0	3
		%	42,9%	44,2%	0%	100%
	GG	n	11	53	1	0
		%	52,3%	30,5%	50%	0%

2.4. Polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832)

2.4.1. Estudio caso-control

Se estudia la distribución de frecuencias alélicas y genóticas entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos. Los resultados del estudio se reflejan en la tabla 50. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

Tampoco se observan diferencias significativas en el estudio de riesgo del polimorfismo en función del modelo de herencia. En la tabla 51 se muestran los datos del análisis.

Tabla 50: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) estudiadas en pacientes con tiroiditis autoinmune (casos) e individuos sanos (controles)

CD40	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	OR (IC al 95%)	P
ALELO C	281 (70,2%)	228 (68,7%)	1,077 (0,785;1,477)	0,645
ALELO T	119 (29,3%)	104 (31,3%)		
HOMOCIGOTO CC	99 (49,5%)	76 (45,8%)		0,712
HETEROCIGOTO CT	83 (41,5%)	76 (45,8%)		
HOMOCIGOTO TT	18 (9%)	14 (8,4%)		

Tabla 51: Análisis del riesgo de polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) en función del modelo de herencia

MODELO	GENOTIPO CD40	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	OR	IC 95%	p
CODOMINANTE	CC	76 (45,8%)	99 (49,5%)	1		
	CT	76 (45,8%)	83 (41,5%)	0,838	0,545-1,291	0,423
	TT	14 (8,4%)	18 (9%)	0,987	0,462-2,110	0,973
DOMINANTE	CC	76 (45,8%)	99 (49,5%)	1		
	CT+TT	90 (54,2%)	101 (50,5%)	0,862	0,570-1,301	0,479
RECESIVO	TT	14 (8,4%)	18 (9%)	1		
	CT+CC	152 (91,6%)	182 (91%)	0,931	0,448-1,934	0,849

2.4.2. Estudio según las variables clínicas

Se completa el estudio con el análisis de distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) en los diferentes grupos de pacientes, en función de las variables clínicas recogidas: antecedentes familiares de tiroidopatía, consumo de sal yodada, procedencia de zona endémica de bocio, presencia de bocio y tamaño glandular, positividad de anticuerpos antitiroideos de manera individual y combinados, y función tiroidea. Se muestran los resultados observados en las tablas 52 a 60.

Se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la distribución de genotipos en función de la positividad o no de los anticuerpos antitiroglobulina.

Para este subgrupo se ha completado el estudio con el análisis según modelos de herencia, cuyos datos se muestran en la tabla 61. No se ha podido confirmar la existencia de diferencias.

RESVLTADOS

Tabla 52: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la existencia de antecedentes familiares de tiroidopatía

			ANTECEDENTES FAMILIARES	
			SÍ	NO
CD40 p=0,895	CC	n	53	37
		%	48,6%	52,1%
	CT	n	45	27
		%	41,3%	38%
	TT	n	11	7
		%	10,1%	9,9%

Tabla 53: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del consumo de sal yodada

			SAL YODADA	
			SÍ	NO
CD40 p=0,630	CC	n	20	22
		%	43,5%	39,3%
	CT	n	19	28
		%	41,3%	50%
	TT	n	7	6
		%	15,2%	10,7%

Tabla 54: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la procedencia de zona endémica de bocio (yododeficiente)

			ZONA ENDÉMICA	
			SÍ	NO
CD40 p=0,587	CC	n	10	48
		%	50%	44,9%
	CT	n	9	45
		%	45%	42%
	TT	n	1	14
		%	5%	13,1%

Tabla 55: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la presencia o no de bocio

		BOCIO			
		NO	SÍ	NÓDULO AISLADO	
CD40 p=0,184	CC	n	66	33	0
		%	55%	41,8%	0,0%
	CT	n	42	40	1
		%	35%	50,6%	1,2%
	TT	n	12	6	0
		%	10%	7,6%	0,0%

Tabla 56: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del tamaño glandular

		TAMAÑO GLANDULAR						
		0a	0b	I	II	III	NÓDULO AISLADO	
CD40 p=0,426	CC	n	37	29	22	10	1	0
		%	54,4%	55,8%	42,3%	40%	50%	0%
	CT	n	23	19	28	11	1	1
		%	33,8%	36,5%	53,8%	44%	50%	100%
	TT	n	8	4	2	4	0	0
		%	11,8%	7,7%	3,9%	16%	0%	0%

Tabla 57: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroglobulina

		Ac TG		
		NEGATIVOS	POSITIVOS	
CD40 <u>p=0,046</u>	CC	n	39	58
		%	54,2%	46%
	CT	n	23	60
		%	31,9%	47,6%
	TT	n	10	8
		%	13,9%	6,4%

RESVLTADOS

Tabla 58: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antiperoxidasa

			Ac TPO	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
CD40 p=0,564	CC	n	3	96
		%	42,9%	49,8%
	CT	n	4	79
		%	57,1%	40,9%
	TT	n	0	18
		%	0%	9,3%

Tabla 59: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroideos

			ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS		
			AMBOS POSITIVOS	TG + TPO -	TG - TPO +
CD40 p=0,177	CC	n	55	4	38
		%	46,2%	50%	53,5%
	CT	n	56	4	23
		%	47,1%	50%	32,4%
	TT	n	8	0	10
		%	6,7%	0%	14,1%

Tabla 60: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) en los pacientes con tiroiditis autoinmune según la funcionalidad tiroidea

			FUNCIÓN TIROIDEA			
			EUTIROIDISMO	HIPOTIROIDISMO	HIPERTIROIDISMO	EGB
CD40 p=0,163	CC	n	10	88	1	0
		%	47,6%	50,6%	50%	0%
	CT	n	10	71	0	2
		%	47,6%	40,8%	0%	66,7%
	TT	n	1	15	1	1
		%	4,8%	8,6%	50%	33,3%

Tabla 61: Análisis del riesgo del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832), en función del modelo de herencia, entre pacientes con anticuerpos antiperoxidasa positivos o negativos

MODELO	GENOTIPO CD40	AC NEGATIVOS n (%)	AC POSITIVOS n (%)	OR	IC 95 %	p
CODOMINANTE	CC	39 (54,2%)	58 (46%)	1		
	CT	23 (31,9%)	60 (47,6%)	1,754	0,935-3,291	0,080
	TT	10 (13,9%)	8 (6,4%)	0,538	0,195-1,483	0,231
DOMINANTE	CC	39 (54,2%)	58 (46%)	1		
	CT+TT	33 (45,8%)	68 (54%)	1,386	0,775-2,477	0,271
RECESIVO	TT	10 (13,9%)	8 (6,4%)	1		
	CT+CC	62 (86,1%)	118 (93,6%)	2,379	0,894-6,334	0,083

2.5. Polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601)

2.5.1. Estudio caso-control

Se observan diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos ($p < 0,01$). Los datos del análisis se recogen en la tabla 62.

Una vez establecida la existencia de diferencias, y para conocer la magnitud del riesgo que aporta cada genotipo, se ha realizado el estudio según los diferentes modelos de herencia. Tal y como se presenta en la tabla 63, se obtienen resultados estadísticamente significativos en los tres modelos de herencia: codominante, dominante y recesiva ($p < 0,01$).

Ser portador del alelo G (menos frecuente o mutado) en el modelo de herencia codominante, tanto en heterocigosis (C/G) como en homocigosis (G/G), supone un aumento del riesgo de presentar tiroiditis autoinmune.

En el modelo de herencia dominante se confirma que ser portador del alelo variante G aumenta el riesgo de la enfermedad.

También se confirma un mayor riesgo de desarrollar tiroiditis autoinmune, según el análisis con el modelo de herencia recesivo, en los pacientes en homocigosis para el alelo mutado G.

RESULTADOS

Tabla 62: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) estudiadas en pacientes con tiroiditis autoinmune (casos) e individuos sanos (controles)

ATG2B	CASOS N (%)	CONTROLES N (%)	OR (IC al 95%)	P
ALELO C	139 (34,8%)	303 (63,1%)	1 3,214 (2,437;4,240)	0,000
ALELO G	261 (65,2%)	177 (36,9%)		
HOMOCIGOTO C/C	16 (8%)	99 (41,2%)		0,000
HETEROCIGOTO C/G	107 (53,5%)	105 (43,8%)		
HOMOCIGOTO G/G	77 (38,5%)	36 (15%)		

Tabla 63: Análisis del riesgo de polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) en función del modelo de herencia

MODELO	GENOTIPO ATG2B	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	OR	IC 95 %	P
CODOMINANTE	CC	99 (41,2%)	16 (8%)	1		
	CG	105 (43,8%)	107 (53,5%)	6,305	(3.486;11.406)	0,000
	GG	36 (15%)	77 (38,5%)	13,234	(6.841;25.604)	0,000
DOMINANTE	CC	99 (41,2%)	16 (8%)	1		
	CG+GG	141 (58,8%)	184 (92%)	8,074	(4.558;14.304)	0,000
RECESIVO	CG+CC	240 (85%)	123 (61,5%)	1		
	GG	36 (15%)	77 (38,5%)	3,25	(2,252;5,589)	0,000

2.5.2. Estudio según las variables clínicas

Se completa el estudio con el análisis de distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) en los distintos grupos de pacientes, estratificados en función de las variables clínicas que presentaban: antecedentes familiares de tiroidopatía, consumo de sal yodada, procedencia de zona endémica de bocio, presencia de bocio y tamaño glandular, positividad de anticuerpos antitiroideos de manera individual y combinados, y función tiroidea. Se muestran los resultados obtenidos en las tablas 64 a 72. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 64: Distribución de las frecuencias genótípicas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la existencia de antecedentes familiares de tiroidopatía

			ANTECEDENTES FAMILIARES	
			SÍ	NO
ATG2B p=0,532	CC	n	8	6
		%	7,3%	8,4%
	CG	n	63	35
		%	57,8%	49,3%
	GG	n	38	30
		%	34,9%	42,3%

Tabla 65: Distribución de las frecuencias genótípicas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del consumo de sal yodada

			SAL YODADA	
			SÍ	NO
ATG2B p=0,374	CC	n	3	7
		%	6,5%	12,5%
	CG	n	22	30
		%	47,8%	53,6%
	GG	n	21	19
		%	45,7%	33,9%

Tabla 66: Distribución de las frecuencias genótípicas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la procedencia de zona endémica de bocio (yododeficiente)

			ZONA ENDÉMICA	
			SÍ	NO
ATG2B p=0,367	CC	n	2	8
		%	10%	7,5%
	CG	n	12	55
		%	60%	51,4%
	GG	n	6	44
		%	30%	41,1%

RESVLTADOS

Tabla 67: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la presencia o no de bocio

			BOCIO		
			NO	SÍ	NÓDULO AISLADO
ATG2B p=0,175	CC	n	12	4	0
		%	10%	5,1%	0%
	CG	n	69	37	1
		%	57,5%	46,8%	100%
	GG	n	39	38	0
		%	32,5%	48,1%	0%

Tabla 68: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del tamaño glandular

			TAMAÑO GLANDULAR					
			0a	0b	I	II	III	NÓDULO AISLADO
ATG2B p=0,164	CC	n	4	8	2	2	0	0
		%	5,9%	15,4%	3,8%	8%	0%	0%
	CG	n	39	30	26	9	2	1
		%	57,4%	57,7%	50%	36%	100%	100%
	GG	n	25	14	24	14	0	0
		%	36,7%	26,9%	46,2%	56%	0%	0%

Tabla 69: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroglobulina

			Ac TG	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
ATG2B p=0,225	CC	n	3	13
		%	4,2%	10,3%
	CG	n	38	69
		%	52,8%	54,8%
	GG	n	31	44
		%	43%	34,9%

Tabla 70: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antiperoxidasa

			Ac TPO	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
ATG2B p=0,728	CC	n	0	16
		%	0%	8,3%
	CG	n	4	103
		%	57,1%	53,4%
	GG	n	3	74
		%	42,9%	38,3%

Tabla 71: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroideos

			ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS		
			AMBOS POSITIVOS	TG + TPO -	TG - TPO +
ATG2B p=0,367	CC	n	13	0	3
		%	10,9%	0%	4,2%
	CG	n	65	5	37
		%	54,6%	62,5%	52,1%
	GG	n	41	3	31
		%	34,5%	37,5%	43,7%

Tabla 72: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) en los pacientes con tiroiditis autoinmune según la funcionalidad tiroidea

			FUNCIÓN TIROIDEA			
			EUTIROIDISMO	HIPOTIROIDISMO	HIPERTIROIDISMO	EGB
ATG2B p=0,171	CC	n	1	14	1	0
		%	4,8%	8%	50%	0%
	CG	n	10	94	0	3
		%	47,6%	54%	0%	100%
	GG	n	10	66	1	0
		%	47,6%	38%	50%	0%

2.6. Polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214)

2.6.1. Estudio caso-control

Existen diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias alélicas y genóticas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos (p<0,01). Los

RESVLTADOS

datos del análisis se recogen en la tabla 73.

Una vez conocida la existencia de diferencias, y para establecer la magnitud del riesgo que aporta cada genotipo, se realiza el análisis según los diferentes modelos de herencia. Se han obtenido resultados estadísticamente significativos en los tres modelos de herencia: codominante, dominante y recesiva ($p < 0,01$). Los resultados del estudio se presentan en la tabla 74.

En el modelo de herencia codominante, ser portador del alelo G (menos frecuente o mutado), tanto en heterocigosis (C/G) como en homocigosis (G/G), confiere un efecto protector frente a la enfermedad.

En el modelo de herencia dominante se confirma que ser portador del alelo variante G disminuye el riesgo de presentar tiroiditis autoinmune.

Se confirma también un menor riesgo de desarrollar la enfermedad, según el análisis con el modelo de herencia recesivo, en los pacientes en homocigosis para el alelo mutado G.

Tabla 73: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) en pacientes con tiroiditis autoinmune (casos) e individuos sanos (controles)

ATG 5	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	OR (IC al 95%)	P
ALELO C	256 (64%)	229 (47,7%)	1,949 (1,485;2,557) 1	0,000
ALELO G	144 (36%)	251 (52,3%)		
HOMOCIGOTO CC	84 (42%)	57 (23,8%)		0,000
HETEROCIGOTO CG	88 (44%)	115 (47,9%)		
HOMOCIGOTO GG	28 (14%)	68 (28,3%)		

Tabla 74: Análisis del riesgo de polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) en función del modelo de herencia

MODELO	GENOTIPO ATG5	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	OR	IC DEL 95 %	p
CODOMINANTE	CC	57 (23,8%)	84 (42%)	1		
	CG	115 (47,9%)	88 (44%)	0.519	(0.336;0.903)	0,003
	GG	68 (28,3%)	28 (14%)	0.279	(0.161;0.486)	0,000
DOMINANTE	CC	57 (23,8%)	84 (42%)	1		
	CG+GG	183 (76,2%)	116 (58%)	0.430	(0.286;0.647)	0,000
RECESIVO	CG+CC	172 (71,7%)	172 (82%)	1		
	GG	68 (28,3%)	28 (14%)	0,412	(0,253;0,671)	0,000

2.6.2. Estudio según las variables clínicas

También se valora la distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) en los diferentes grupos de pacientes, realizados según las variables clínicas recogidas: antecedentes familiares de tiroidopatía, consumo de sal yodada, procedencia de zona endémica de bocio, presencia de bocio y tamaño glandular, positividad de anticuerpos antitiroideos de manera individual y combinados, y función tiroidea. Se muestran los resultados del análisis en las tablas 75 a 83. No hay diferencias estadísticamente significativas este estudio.

Tabla 75: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la existencia de antecedentes familiares de tiroidopatía

			ANTECEDENTES FAMILIARES	
			SÍ	NO
ATG5 p=0,065	CC	n	39	36
		%	35,8%	50,7%
	CG	n	50	29
		%	45,9%	40,8%
	GG	n	20	6
		%	18,3%	8,5%

Tabla 76: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del consumo de sal yodada

			SAL YODADA	
			SÍ	NO
ATG5 p=0,492	CC	n	24	23
		%	52,2%	41,1%
	CG	n	17	27
		%	37%	48,2%
	GG	n	5	6
		%	10,8%	10,7%

RESVLTADOS

Tabla 77: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la procedencia de zona endémica de bocio (yododeficiente)

			ZONA ENDÉMICA	
			SÍ	NO
ATG5 p=0,505	CC	n	6	47
		%	30%	43,9%
	CG	n	10	44
		%	50%	41,1%
	GG	n	4	16
		%	20%	15%

Tabla 78: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la presencia o no de bocio

			BOCIO		
			NO	SÍ	NÓDULO AISLADO
ATG5 p=0,398	CC	n	53	30	1
		%	44,2%	38%	100%
	CG	n	54	34	0
		%	45%	43%	0%
	GG	n	13	15	0
		%	10,8%	19%	0%

Tabla 79: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del tamaño glandular

			TAMAÑO GLANDULAR					NÓDULO AISLADO
			0a	0b	I	II	III	
ATG5 p=0,161	CC	n	31	22	19	10	1	1
		%	45,6%	42,3%	36,5%	40%	50%	100%
	CG	n	28	26	20	14	0	0
		%	41,2%	50%	38,5%	56%	0%	0%
	GG	n	9	4	13	1	1	0
		%	13,2%	7,7%	25%	4%	50%	0%

Tabla 80: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroglobulina

			Ac TG	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
ATG5 p=0,474	CC	n	28	55
		%	38,9%	43,7%
	CG	n	31	56
		%	43,1%	44,4%
	GG	n	13	15
		%	18%	11,9%

Tabla 81: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antiperoxidasa

			Ac TPO	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
ATG5 p=0,474	CC	n	3	81
		%	42,8%	42%
	CG	n	2	86
		%	28,6%	44,6%
	GG	n	2	26
		%	28,6%	13,4%

Tabla 82: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroideos

			ANTICUERPOS ANTITIRIDEOS		
			AMBOS POSITIVOS	TG + TPO -	TG - TPO +
ATG5 p=0,464	CC	n	52	4	27
		%	43,7%	50%	38%
	CG	n	54	2	31
		%	45,4%	25%	43,7%
	GG	n	13	2	13
		%	10,9%	25%	18,3%

RESVLTADOS

Tabla 83: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la funcionalidad tiroidea

		FUNCIÓN TIROIDEA				
		EUTIROIDISMO	HIPOTIROIDISMO	HIPERTIROIDISMO	EGB	
ATG5 p=0,480	CC	n	6	75	2	1
		%	28,6%	43,1%	100%	33.3%
	CG	n	12	75	0	1
		%	57,1%	43,1%	0%	33.3%
	GG	n	3	24	0	1
		%	14,3%	13,8%	0%	33.3%

2.7. Polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183)

2.7.1. Estudio caso-control

No se han detectado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias alélicas y genóticas entre enfermos e individuos sanos. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 84.

En el análisis de riesgo del polimorfismo en función del modelo de herencia tampoco se observan diferencias significativas. En la tabla 85 se reflejan los datos del estudio.

Tabla 84: Distribución de las frecuencias alélicas y genóticas del polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183) estudiadas en pacientes con tiroiditis autoinmune (casos) e individuos sanos (controles)

ATG10	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	OR (IC al 95%)	P
ALELO C	226 (56,5%)	243 (50,6%)	1,267 (0,970;1,654) 1	0,082
ALELO T	174 (43,5%)	237 (49,6%)		
HOMOCIGOTO CC	64 (32%)	65 (27,1%)		0,199
HETEROCIGOTO CT	98 (49%)	113 (47,1%)		
HOMOCIGOTO TT	38 (19%)	62 (25,8%)		

Tabla 85: Análisis del riesgo de polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183) en función del modelo de herencia

MODELO	GENOTIPO ATG10	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	OR	IC 95 %	p
CODOMINANTE	CC	65 (27,1%)	64 (32%)	1		
	CT	113 (47,1%)	98 (49%)	0.881	(0.568;1.366)	0,571
	TT	62 (25,8%)	38 (19%)	0.622	(0.366;1.059)	0.080
DOMINANTE	CC	65 (27,1%)	64 (32%)	1		
	CT+TT	175 (72,9%)	136 (68%)	0.789	(0.523;1.191)	0,260
RECESIVO	TT	62 (25,8%)	38 (19%)	1		
	CT+CC	178 (74,2%)	162 (81%)	1.485	(0.941;2.344)	0,090

2.7.2. Estudio según las variables clínicas

Se ha realizado también el estudio de distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183) en los diferentes grupos de pacientes, separados según las variables clínicas analizadas en la revisión de datos: antecedentes familiares de tiroidopatía, consumo de sal yodada, procedencia de zona endémica de bocio, presencia de bocio y tamaño glandular, positividad de anticuerpos antitiroideos de manera individual y combinados, y función tiroidea. Los resultados observados se reflejan en las tablas 86 a 94. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el análisis.

Tabla 86: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la existencia de antecedentes familiares de tiroidopatía

			ANTECEDENTES FAMILIARES	
			SÍ	NO
ATG10 p=0,831	CC	n	33	22
		%	30,3%	31%
	CT	n	55	33
		%	50,5%	46,5%
	TT	n	21	16
		%	19,2%	22,5%

RESVLTADOS

Tabla 87: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del consumo de sal yodada

			SAL YODADA	
			SÍ	NO
ATG10 p=0,290	CC	n	16	16
		%	34,8%	28,6%
	CT	n	26	29
		%	56,5%	51,8%
	TT	n	4	11
		%	8,7%	19,6%

Tabla 88: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la procedencia de zona endémica de bocio (yododeficiente)

			ZONA ENDÉMICA	
			SÍ	NO
ATG10 p=0,053	CC	n	8	28
		%	40%	26,2%
	CT	n	12	55
		%	60%	51,4%
	TT	n	0	24
		%	0%	22,4%

Tabla 89: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la presencia o no de bocio

			BOCIO		
			NO	SÍ	NÓDULO AISLADO
ATG10 p=0,171	CC	n	42	21	1
		%	35%	26,6%	1,6%
	CT	n	52	46	0
		%	43,3%	58,2%	0,0%
	TT	n	26	12	0
		%	21,7%	15,2%	0,0%

Tabla 90: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del tamaño glandular

			TAMAÑO GLANDULAR					NÓDULO AISLADO
			0a	0b	I	II	III	
ATG10 p=0,267	CC	n	21	21	12	9	0	1
		%	30,9%	40,4%	23,1%	36%	0%	100%
	CT	n	34	18	32	13	1	0
		%	50%	34,6%	61,5%	52%	50%	0%
	TT	n	13	13	8	3	1	0
		%	19,1%	25%	15,4%	12%	50%	0%

Tabla 91: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroglobulina

			Ac TG	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
ATG10 p=0,611	CC	n	26	37
		%	36,1%	29,4%
	CT	n	33	65
		%	45,8%	51,6%
	TT	n	13	24
		%	18,1%	19%

Tabla 92: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antiperoxidasa

			Ac TPO	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
ATG10 p=0,244	CC	n	2	62
		%	28,6%	32,1%
	CT	n	2	96
		%	28,6%	49,8%
	TT	n	3	35
		%	42,8%	18,1%

RESVLTADOS

Tabla 93: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroideos

			ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS		
			AMBOS POSITIVOS	TG + TPO -	TG - TPO +
ATG10 p=0,157	CC	n	35	2	26
		%	29,4%	25%	36,6%
	CT	n	63	2	33
		%	53%	25%	46,5%
	TT	n	21	4	12
		%	17,6%	50%	16,9%

Tabla 94: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183) en los pacientes con tiroiditis autoinmune según la funcionalidad glandular

			FUNCIÓN TIROIDEA			
			EUTIROIDISMO	HIPOTIROIDISMO	HIPERTIROIDISMO	EGB
ATG10 p=0,860	CC	n	5	57	1	1
		%	23,8%	32,8%	50%	33,3%
	CT	n	13	83	1	1
		%	61,9%	47,7%	50%	33,3%
	TT	n	3	34	0	1
		%	14,3%	19,5%	0%	33,3%

2.8. Polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880)

2.8.1. Estudio caso-control

Se estudia la distribución de frecuencias alélicas y genóticas entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 95. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas.

Tampoco se observan diferencias significativas en el análisis de riesgo del polimorfismo en función del modelo de herencia. En la tabla 96 se recogen los datos del estudio.

Tabla 95: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) estudiadas en pacientes con tiroiditis autoinmune (casos) e individuos sanos (controles)

ATG16L1	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	OR (IC al 95%)	P
ALELO G	204 (51%)	238 (49,6%)	1,058 (0,812;1,380) 1	0,676
ALELO A	196 (49%)	242 (50,4%)		
HOMOCIGOTO GG	51 (25,5%)	60 (25%)		0,850
HETEROCIGOTO AG	102 (51%)	118 (49,2%)		
HOMOCIGOTO AA	47 (23,5%)	62 (25,8%)		

Tabla 96: Análisis del riesgo de polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) en función del modelo de herencia

MODELO	GENOTIPO ATG16L1	CONTROLES N (%)	CASOS N (%)	OR	IC DEL 95 %	P
CODOMINANTE	GG	60 (25%)	51 (25,5%)	1		
	AG	118 (49,2%)	102 (51%)	1.017	(0.643;1.607)	0.943
	AA	62 (25,8%)	47 (23,5%)	0.892	(0.524;1.518)	0,673
DOMINANTE	GG	60 (25%)	51 (25,5%)	1		
	AG+AA	180 (75%)	149 (74,5%)	0.974	(0.632;1.500)	0,904
RECESIVO	AA	62 (25,8%)	47 (23,5%)	1		
	AG+GG	178 (74,2%)	153 (76,5%)	1.134	(0.733;1.754)	0,572

2.8.2. Estudio según las variables clínicas

El estudio se completa con el análisis de distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) en los diferentes grupos de pacientes, en función de las variables clínicas recogidas: antecedentes familiares de tiroidopatía, consumo de sal yodada, procedencia de zona endémica de bocio, presencia de bocio y tamaño glandular, positividad de anticuerpos antitiroideos de manera individual y combinados, y función tiroidea. Se muestran los resultados observados en las tablas 97 a 105. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

RESVLTADOS

Tabla 97: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la existencia de antecedentes familiares de tiroidopatía

			ANTECEDENTES FAMILIARES	
			SÍ	NO
ATG16L1 p=0,643	GG	n	25	19
		%	23%	26,8%
	AG	n	60	34
		%	55%	47,9%
	AA	n	24	18
		%	22%	25,3%

Tabla 98: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del consumo de sal yodada

			SAL YODADA	
			SÍ	NO
ATG16L1 p=0,488	GG	n	14	12
		%	30,4%	21,4%
	AG	n	22	33
		%	47,8%	59%
	AA	n	10	11
		%	21,8%	19,6%

Tabla 99: Distribución de las frecuencias genóticas del polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la procedencia de zona endémica de bocio (yododeficiente)

			ZONA ENDÉMICA	
			SÍ	NO
ATG16L1 p=0,831	GG	n	4	28
		%	20%	26,2%
	AG	n	11	56
		%	55%	52,3%
	AA	n	5	23
		%	25%	21,5%

Tabla 100: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la presencia o no de bocio

			BOCIO		
			NO	SI	NÓDULO AISLADO
ATG16L1 p=0,149	GG	n	26	25	0
		%	21,7%	31,7%	0,0%
	AG	n	62	40	0
		%	51,7%	50,6%	0,0%
	AA	n	32	14	1
		%	26,6%	17,7%	2,1%

Tabla 101: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función del tamaño glandular

			TAMAÑO GLANDULAR					NÓDULO AISLADO
			0a	0b	I	II	III	
ATG16L1 p=0,259	GG	n	15	11	18	7	0	0
		%	22%	21,2%	34,6%	28%	0%	0%
	AG	n	39	23	26	13	1	0
		%	57,4%	44,2%	50%	52%	50%	0%
	AA	n	14	18	8	5	1	1
		%	20,6%	34,6%	15,4%	20%	50%	100%

Tabla 102: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroglobulina

			Ac TG	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
ATG16L1 p=0,821	GG	n	19	31
		%	26,4%	24,6%
	AG	n	35	67
		%	48,6%	53,2%
	AA	n	18	28
		%	25%	22,2%

RESVLTADOS

Tabla 103: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antiperoxidasa

			Ac TPO	
			NEGATIVOS	POSITIVOS
ATG16L1 p=0,545	GG	n	1	50
		%	14,3%	25,9%
	AG	n	5	97
		%	71,4%	50,3%
	AA	n	1	46
		%	14,3%	23,8%

Tabla 104: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) en los pacientes con tiroiditis autoinmune en función de la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroideos

			ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS		
			AMBOS POSITIVOS	TG + TPO -	TG - TPO +
ATG16L1 p=0,704	GG	n	30	1	19
		%	25,2%	12,5%	26,8%
	AG	n	62	6	34
		%	52,1%	75%	47,9%
	AA	n	27	1	18
		%	22,7%	12,5%	25,3%

Tabla 105: Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) en los pacientes con tiroiditis autoinmune según la funcionalidad tiroidea

			FUNCIÓN TIROIDEA			
			EUTIROIDISMO	HIPOTIROIDISMO	HIPERTIROIDISMO	EGB
ATG16L1 p=0,175	GG	n	8	41	2	0
		%	38,1%	23,6%	100%	0%
	AG	n	9	91	0	2
		%	42,9%	52,3%	0%	66,7%
	AA	n	4	42	0	1
		%	19%	24,1%	0%	33,3%

3. RESUMEN DE RESULTADOS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS

3.1. Estudio caso-control

Se observan diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las

frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos. Según los diferentes modelos de herencia, ser portador del alelo G (menos frecuente o mutado) supone un aumento del riesgo de presentar tiroiditis autoinmune (tablas 62 y 63).

Existen diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos. En el análisis según los diferentes modelos de herencia se observa que ser portador del alelo G (menos frecuente o mutado), confiere un efecto protector frente a la enfermedad (tablas 73 y 74).

3.2. Estudio en subgrupos según las variables clínicas

En el estudio de distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo 511 C>G del gen IL1B (rs 16944) en los distintos grupos de pacientes en función de las variables clínicas, se encuentran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la procedencia de zona endémica, que se confirman en el análisis según modelos de herencia (tablas 18 y 25). Los pacientes que no proceden de zona endémica de bocio presentan de manera más frecuente, en el modelo de herencia codominante, un genotipo heterocigoto (un alelo habitual y un alelo variante) que aquéllos que proceden de zona endémica. No hay significación en el resto de modelos de herencia.

Se realiza también el estudio del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874) en los distintos grupos de pacientes. Se detectan diferencias estadísticamente significativas en cuanto al consumo de sal yodada, que se confirman con el análisis según modelos de herencia (tablas 30 y 38). Los pacientes que no consumen sal yodada presentan de manera más frecuente, en el modelo de herencia codominante, un genotipo heterocigoto (un alelo habitual y un alelo variante) que aquéllos que consumen sal yodada. Lo mismo ocurre en el modelo dominante de herencia, en que los enfermos que no consumen sal yodada son portadores del alelo variante T de manera más frecuente.

DISCVSIÓN

1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

1.1. Edad

La mediana de edad de los pacientes estudiados es de 41 años. Este dato es concordante con la epidemiología habitual de la tiroiditis autoinmune, en la que se describe una mayor incidencia en edades medias de la vida ⁽⁴⁾.

1.2. Antecedentes familiares

Más de la mitad de los pacientes (54%) refirieron antecedentes familiares de tiroidopatía, probablemente en el contexto de tiroiditis autoinmune, aunque no se pudo constatar la filiación de la enfermedad tiroidea por desconocimiento clínico de los pacientes. Es conocida la elevada frecuencia con que la tiroiditis autoinmune afecta a miembros de la misma familia ⁽²⁷⁾. Esto sugiere la existencia de un componente genético en la etiología de la enfermedad, aunque el hecho de que la concordancia en gemelos monocigóticos sea menor del 100% indica que los factores ambientales también tienen una importancia esencial.

1.3. Consumo de sal yodada

En la historia clínica de nuestros pacientes existe un déficit en cuanto a la anamnesis sobre este dato que alcanza casi el 50%. De los enfermos en los que se conoce, tan sólo la mitad constatan el uso habitual de sal yodada.

En España, las fuentes alimentarias más ricas en yodo son la sal yodada y algunos alimentos enriquecidos en yodo durante su producción y procesamiento, entre los que destacan (por la frecuencia de su consumo y por la cantidad de su ingesta) la leche corriente de vaca y los derivados lácteos ricos en yodo elaborados a partir de la misma ⁽¹⁹⁶⁾.

En el último informe redactado por el Grupo de Trabajo de Trastornos por Déficit de Yodo (TDY) de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición, se reafirma la necesidad de definir programas de vigilancia, tanto sobre la evolución de los TDY, como sobre la yodación universal de la sal; también se recuerda la necesidad de

recabar la información que permita definir los criterios de actuación a seguir de una manera coordinada, para lograr la erradicación de estos trastornos en nuestro país. Se objetiva una mejoría franca de la yoduria, indicando que esta aceptable nutrición de yodo es un hecho reciente y consecuencia de campañas de salud pública de carácter localizado que se han realizado; pero aún es preciso incidir en el desarrollo de campañas de yodo-profilaxis mediante una adecuada información a la población general, pero también, y muy especialmente, a las autoridades sanitarias y los profesionales sanitarios.

1.4. Procedencia de zona endémica

El porcentaje de desconocimiento del dato alcanza aproximadamente un tercio de nuestra serie de pacientes. Del resto de enfermos, un 15% proceden de zona endémica de bocio y, por tanto, de zona yododeficiente.

Clásicamente, una gran parte de la población en España, al igual que en otros muchos países de Europa, ha presentado una baja nutrición en yodo. En el último informe de la OMS del año 2007, España aparece como un país con una óptima nutrición de yodo ⁽¹⁹⁷⁾. Un estudio español realizado en 2012 sobre el consumo de yodo en población adulta, que realiza cuantificación de la yoduria, indica una adecuada ingesta del oligoelemento en el país, aunque en valores muy cercanos al punto de corte que no garantizan un adecuado aporte en situaciones con incremento de las necesidades ⁽¹⁹⁸⁾. Muy probablemente el cambio observado en todos estos estudios debe relacionarse con un aumento del consumo de sal yodada. Sin embargo, a pesar de estos buenos resultados, el consumo voluntario de sal yodada obliga a mantener programas de salud pública que garanticen la presencia efectiva de esta sal en el mercado y su correcta yodación, y que promuevan su empleo entre la población.

En España la mayoría de Comunidades Autónomas carecen de programas para la erradicación del déficit de yodo. Según la OMS, para conseguir una progresiva y sostenible erradicación de los TDY deberían cumplirse toda una serie de criterios que van desde la existencia de comités de expertos, inclusión de los programas para la erradicación en los presupuestos anuales, legislación sobre la yodación que promueva la yodación universal, existencia de sistemas rutinarios de control de su evolución, de la

yoduria de la población y de la calidad de la sal yodada, y existencia de una base de datos estatal que monitorice los indicadores. Además, referente a la población, debería conseguirse que el 90% de las familias consumieran sal adecuadamente yodada y que la mediana de yoduria, como marcador más relevante de la yodación poblacional, estuviese entre 100 y 199 $\mu\text{g/L}$ en la población general y entre 150 y 249 $\mu\text{g/L}$ en las mujeres gestantes ^(199,200).

1.5. Presencia de bocio

Aproximadamente un 40% de los pacientes presentaban bocio en la exploración física. De los pacientes con aumento del tamaño glandular, un 65% corresponde a un grado I.

Los enfermos con bocio presentan la forma clásica de tiroiditis autoinmune (tiroiditis de Hashimoto), mientras que los enfermos sin bocio pueden corresponder a variantes atróficas o a tiroiditis con escaso tiempo de evolución, en los que aún no se ha producido el aumento de tamaño glandular.

1.6. Estudio de anticuerpos antitiroideos

El 96,5% de pacientes del estudio presentó títulos positivos de anticuerpos antiperoxidasa tiroidea. Este dato es concordante con la literatura, en que se describen los anticuerpos antiperoxidasa como el mejor marcador serológico para el diagnóstico de la tiroiditis autoinmune, dado que aparecen hasta en el 95% de los pacientes y son raros en individuos sanos ⁽¹⁾.

También son concordantes con los estudios previos los datos obtenidos en cuanto a la presencia de anticuerpos antitiroglobulina, que son detectados en el 63% de los enfermos de nuestra serie. Estos anticuerpos contra la proteína más abundante de la glándula tiroidea son positivos en torno al 60 al 80% de los pacientes que presentan tiroiditis autoinmune, por lo que se trata de una prueba diagnóstica menos sensible. Además son menos específicos, ya que pueden aparecer en porcentajes mayores de controles sanos que los anticuerpos antiperoxidasa ⁽²⁰⁾.

Se han realizado múltiples estudios que han intentado correlacionar entre sí

ambos anticuerpos. Aunque en algunos casos se han obtenido datos sugerentes de una correlación positiva, el coeficiente de determinación (que informa la calidad del modelo para replicar los resultados y la proporción de variación de los resultados que puede explicarse por el mismo) siempre ha sido muy bajo ⁽²¹⁾. Estos resultados sugieren que los dos tipos de anticuerpos antitiroideos pueden reflejar dos aspectos diferentes de la respuesta autoinmune contra la glándula tiroidea. Los anticuerpos antitiroglobulina podrían representar una respuesta inmune innata inicial, mientras que los anticuerpos antiperoxidasa serían característicos de la respuesta inmune adaptativa posterior ⁽²⁰¹⁾.

En línea con esta hipótesis, los anticuerpos antitiroglobulina serían los primeros en detectarse en el establecimiento de la enfermedad. De hecho, en modelos animales de tiroiditis autoinmune, los anticuerpos antitiroglobulina preceden a la aparición de los anticuerpos antiperoxidasa ⁽²⁰²⁾. Es poco habitual detectar las enfermedades autoinmunes en el momento de su instauración; en la tiroiditis autoinmune los pacientes son diagnosticados de manera tardía, dada la habitual ausencia de expresión clínica en las fases iniciales. De este modo, es esperable que los enfermos presenten títulos positivos y más elevados de anticuerpos antiperoxidasa que de anticuerpos antitiroglobulina. Estos datos coinciden con los obtenidos en nuestro estudio, en que hasta un 35% de pacientes presentan anticuerpos antiperoxidasa positivos y antitiroglobulina negativos, mientras que únicamente un 4% tienen anticuerpos antitiroglobulina positivos y antiperoxidasa no detectables (correspondiendo quizá a fases más tempranas de la instauración de la enfermedad).

1.7. Estudio de funcionalidad tiroidea

En nuestro estudio aproximadamente un 87% de los pacientes presentaba un hipotiroidismo en el momento del diagnóstico. De estos pacientes un 70% permanecían en fase de hipotiroidismo subclínico, mientras que el 30% presentaban un déficit funcional clínico con disminución de los valores de hormonas tiroideas.

En un estudio de largo tiempo de seguimiento (hasta 20 años) se observó que el riesgo de desarrollo de hipotiroidismo primario es de un 4,3% por año en mujeres que inicialmente presentaban elevación de TSH (mayor de 6 mU/l como punto de corte para el análisis) y anticuerpos antitiroideos positivos, y de un 2,1% por año si presentaban

anticuerpos positivos con normalidad de TSH. Las tasas acumuladas de hipotiroidismo en este estudio fueron del 55% y el 27%, respectivamente, para los dos grupos mencionados de pacientes ⁽²⁰³⁾.

Los resultados de nuestro estudio son concordantes con los datos previos, considerando la heterogeneidad funcional que puede condicionar el hecho de diagnosticar a los pacientes en diferentes estadios de la enfermedad, según el motivo de la consulta (presencia de clínica, hallazgo analítico incidental, etc.).

Sólo dos pacientes fueron diagnosticados de Hashitoxicosis, cuadro de hipertiroidismo transitorio en que debido al proceso inflamatorio puede haber liberación de hormonas a la circulación.

Tres pacientes presentaron de manera simultánea un cuadro de enfermedad de Graves-Basedow con hipertiroidismo, patología englobada en el espectro de la enfermedad autoinmune tiroidea.

2. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN CITOCINAS

2.1. Polimorfismo -511 C>G del gen IL1B (rs 16944)

La distribución de frecuencias alélicas y genotípicas no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos. En el análisis de riesgo del polimorfismo en función del modelo de herencia tampoco se observan diferencias significativas.

El polimorfismo -511 C/G del gen IL1B (rs 16944) se ha relacionado con un aumento relativo de la susceptibilidad a padecer enfermedad de Graves-Basedow en pacientes chinos ⁽¹⁰⁸⁾. Por lo tanto, se ha objetivado una relación entre dicho SPN y el espectro de la enfermedad autoinmune tiroidea en el que también se engloba la tiroiditis autoinmune.

No obstante, se han realizado múltiples estudios que no han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con tiroiditis autoinmune de diferentes procedencias, como Reino Unido ⁽⁶³⁾ o China ⁽¹⁰⁹⁾. Recientemente, un estudio

europeo en población polaca ha observado una relación significativa entre polimorfismos en el gen IL1B y la susceptibilidad de presentar la enfermedad. La frecuencia del alelo C y del genotipo CC del polimorfismo -511 C/T es mayor en pacientes que en sanos ⁽¹¹⁰⁾.

Es conocido que IL-1 β es una citocina proinflamatoria que interviene en la etiopatogenia de la tiroiditis autoinmune mediante varios mecanismos objetivados. La concentración de IL-1 β está aumentada significativamente en el hipotiroidismo autoinmune frente a individuos sanos, por lo que puede considerarse como un marcador ⁽⁶¹⁾. Estimula la secreción de IL-6 y modifica la integridad del epitelio folicular mediante la alteración de las proteínas de unión ⁽⁵⁷⁾, esenciales en el reconocimiento de los antígenos tiroideos por las células T en la tiroiditis autoinmune ⁽⁵⁸⁾; aumenta la producción del glucosaminoglicano no sulfatado ácido hialurónico en los tirocitos y los fibroblastos, que se acumula en el tejido tiroideo contribuyendo a aumentar el tamaño glandular ⁽⁵⁹⁾; además, podría inducir la expresión de Fas, mecanismo potencial para la destrucción del tejido tiroideo por apoptosis ⁽⁶⁰⁾.

Se postula que el polimorfismo -511 C/G del gen IL1B (rs 16944) puede influir en la producción y secreción de esta citocina y, de este modo, ser determinante en la patogénesis de la tiroiditis autoinmune. No hemos encontrado ninguna asociación significativa en nuestro estudio pese a tratarse de una población caucásica similar a la del estudio realizado por Lacka et al, que analiza un número menor de pacientes (115 pacientes: 112 mujeres y 3 hombres con una media de edad de 53.3 años) ⁽¹¹⁰⁾. Esta ausencia de significación no puede atribuirse por tanto al tamaño muestral del estudio, a diferencias raciales o a la estratificación de la población. Sí refiere en la recogida de pacientes, que presentan niveles séricos de anticuerpos antiperoxidasa “extremadamente elevados”, dato que podría diferir de nuestra muestra que incluye enfermos con títulos positivos sin segregar en función de su valor. De este modo, en el estudio de Lacka et al, podría relacionarse el polimorfismo con formas “severas” (con respuesta autoinmune de gran intensidad) de tiroiditis autoinmune.

2.2. Polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874)

Hemos estudiado la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre

pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos del polimorfismo -33T>C del gen IL4 (rs2070874). No encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los análisis que hemos realizado.

En un metaanálisis se ha comunicado la asociación de varios polimorfismos del gen IL4, entre ellos el SPN rs2070874, con la enfermedad de Graves-Basedow. El estudio integra y analiza los datos de las publicaciones disponibles que han valorado la asociación con la enfermedad autoinmune tiroidea, pero no incluye ninguno que haya examinado la relación del polimorfismo -33T/C del gen IL4 con la tiroiditis autoinmune ⁽¹¹⁵⁾.

Sí que se ha constatado la relación de otros polimorfismos en el gen IL4, diferentes al de nuestro estudio, con la tiroiditis autoinmune. Se ha observado una diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia del genotipo -590 CC en el gen IL4 entre pacientes japoneses con formas severas o leves de tiroiditis autoinmune, de modo que dicho genotipo parece ser un fuerte factor predictivo para el desarrollo de hipotiroidismo en estos enfermos ⁽³⁹⁾. Sería preciso realizar el análisis en nuestra población para valorar la reproductibilidad de los resultados, ya que existen amplias diferencias raciales y en los factores ambientales de los pacientes sobre los que se realiza este estudio.

Es bien conocido el papel de la citocina IL-4 en la patogénesis de la tiroiditis autoinmune. IL-4 es la citocina principal que polariza la respuesta inmune hacia una respuesta Th2 y suprime la producción de citocinas inflamatorias Th1 ⁽³⁹⁾. Se han postulado varios mecanismos como responsables de la influencia de IL-4 en la patogenia de la enfermedad: efectos relacionados con el crecimiento y la proliferación de células B, mejora de la producción de algunos precursores de células T citotóxicas ⁽⁶⁶⁾, estímulo de la expresión de antígenos de HLA clase II ⁽⁶⁷⁾, bloqueo de la influencia de IFN- γ en la expresión de DUOX y tioperoxidasa y en la secreción de tiroglobulina ⁽⁶⁸⁾, etc.

En los pacientes con tiroiditis autoinmune existe una reducción de la capacidad de producción de IL-4 por los linfocitos de los infiltrados tiroideos ⁽⁶⁴⁾. Las variaciones en el gen IL4 podrían tener un papel importante en su función ^(62,63). Se precisan más

estudios que valoren la influencia del polimorfismo -33T/C sobre la capacidad de producción de IL-4 y, por tanto, sobre si puede determinar la inclinación de la respuesta hacia Th1 o Th 2 e influir en el desarrollo y la intensidad de la patología.

2.3. Polimorfismo -174 G>C del gen IL6 (rs1800795)

En nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos.

En un estudio previo del polimorfismo del gen IL6 -174 G/C (rs1800795) y su influencia sobre el desarrollo de tiroiditis autoinmune tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El análisis en dicho trabajo sí mostró aparentes interacciones entre alelos polimórficos diferentes, de manera que la presencia concomitante de las mutaciones IL10 -1082 G/A y de IL6 -174 G/C aumentó el riesgo de presentar la enfermedad. Por tanto, los efectos combinados de las variantes alélicas definidas podrían ser decisivos para inducir diferencias funcionales y modificar el riesgo de presentar la patología. En estos pacientes se observa una mayor producción de IL-6 (inflamatoria) y menor producción de IL-10 (antiinflamatoria), lo que desequilibraría el balance entre citocinas pro/antiinflamatorias, conduciendo a una acentuación de la respuesta inflamatoria y a una propagación del proceso autoinmune (123).

Los pacientes con tiroiditis autoinmune presentan un incremento en la producción de IL-6 (75,76) y la expresión de IL-6 en los tirocitos se correlaciona con el grado de infiltración linfocítica (76,77). Se han observado múltiples mecanismos que justifican su influencia en la enfermedad: regulación de la expresión de moléculas de adhesión en las células tiroideas (58), expresión de anticuerpos antiperoxidasa (78), etc. Cualquier alteración en la síntesis de IL-6 podría interferir con la autoinmunidad tiroidea y el desarrollo de la enfermedad.

Existen múltiples estudios de asociación con diferentes patologías que indican que el polimorfismo del gen IL6 -174 G/C (rs1800795) es probablemente el principal SPN que determina modificaciones en la producción de IL-6. Las variaciones en la

región promotora del gen IL6 se han asociado con artritis reumatoide juvenil ⁽¹²⁸⁾, con aterosclerosis carotidea ^(128,129), con defectos en el crecimiento en niños con enfermedad de Crohn ⁽¹³⁰⁾, con obesidad en adultos ⁽¹³¹⁾, con oclusión de la arteria central de la retina ⁽¹³³⁾, con diabetes mellitus ^(125,126), con cambios en la tolerancia a la glucosa inducidos por el ejercicio ⁽¹³⁴⁾, con el síndrome metabólico ⁽¹³²⁾ y con alteraciones en la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas ⁽¹³⁵⁾. En estas enfermedades, los pacientes portadores del alelo C tienen niveles en plasma de IL-6 significativamente más bajos, influyendo así en el desarrollo de la patología según el papel de esta citocina en su patogénesis.

Es esperable, aunque no se haya demostrado en nuestro estudio, que los individuos con el alelo mutado C presenten valores más bajos de IL-6 y con ello una menor susceptibilidad al desarrollo de tiroiditis autoinmune. En el estudio de Baki et al, el alelo C aumentó el riesgo de enfermedad, pero sólo en combinación con otras mutaciones concomitantes y no en el análisis individual del polimorfismo ⁽¹²³⁾. Existen múltiples factores que pueden controlar la transcripción del gen IL6, y el efecto de un polimorfismo particular probablemente dependa del tejido específico en el que esté involucrado y de los factores ambientales que lo rodeen ⁽²⁰⁴⁾.

2.4. Polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832)

Hemos analizado la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -1C>T del gen CD40 (rs1883832) en pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

En los pacientes con tiroiditis autoinmune las concentraciones séricas de CD-40 están elevadas, por lo que esta citocina podría ser útil como marcador del estado de actividad de la enfermedad autoinmune tiroidea ⁽⁸³⁾. El hecho de que ciertos polimorfismos puedan modificar su expresión justificaría su papel en la etiopatogenia de la enfermedad. Se ha analizado en múltiples estudios el polimorfismo del gen CD40 (rs1883832) sin observarse asociación con la tiroiditis autoinmune ⁽¹³⁷⁾ ni con la gravedad de la patología ⁽¹³⁸⁾. Se recopilaron los estudios previos sin significación estadística en un metaanálisis en el que tampoco se objetivó una asociación de riesgo, ni en el análisis por genotipos ni por frecuencia alélica ⁽¹³⁷⁾.

En cambio, otros estudios sí han encontrado relación estadísticamente significativa entre el polimorfismo -1 C/T del gen CD40 y el riesgo de enfermedad de Graves-Basedow en múltiples poblaciones ^(137,139-145), así como con la severidad y dificultad de tratamiento de la enfermedad ⁽¹³⁸⁾. Se ha observado un aumento en la eficiencia de la traducción de ARNm (ARN mensajero), y con ello de la expresión tiroidea de CD-40, relacionada con el SPN presente en estos pacientes. También se ha determinado la existencia de una mayor asociación con aquellos enfermos que mantienen títulos elevados de anticuerpos antitiroideos (antiperoxidasa y/o antitiroglobulina) tras el tratamiento de la enfermedad de Graves-Basedow, frente a los que presentan anticuerpos antitiroideos negativos (dato que no se ha podido corroborar en individuos sanos) ⁽²⁰⁵⁾.

Parece, por lo tanto, que este polimorfismo tiene un papel diferente en la patogenia de las dos enfermedades autoinmunes tiroideas y puede ser específico para la enfermedad de Graves-Basedow, aunque la base para esta especificidad es aún desconocida ⁽¹⁴⁶⁾. Esto justificaría la ausencia de diferencias en los pacientes con tiroiditis autoinmune de nuestro estudio.

2.5. Estudio por subgrupos en función de las variables clínicas

2.5.1. Polimorfismo -511 C>G del gen IL1B (rs 16944) y procedencia de zona endémica

Es conocido que algunos factores ambientales desempeñan un papel en la etiopatogenia de la tiroiditis autoinmune; de este modo se ha constatado que las poblaciones yodosuficientes tienen mayor incidencia de tiroiditis e hipotiroidismo. Si la población yododeficiente se desplaza a zonas de yodosuficiencia también se incrementa la prevalencia de anticuerpos antitiroideos y de hipotiroidismo ⁽⁴⁾.

En nuestro estudio, los pacientes que no proceden de zona endémica de bocio (yododeficiente) presentan de manera más frecuente, en el modelo de herencia codominante, un genotipo heterocigoto que aquéllos que proceden de zona endémica.

En la herencia codominante cada genotipo confiere un riesgo diferente, por lo que es posible que el genotipo heterocigoto para este polimorfismo pueda modificar el riesgo de presentar tiroiditis autoinmune en determinados individuos, en función de la

procedencia o no de zona yododeficiente de éstos. Para confirmar esta interacción entre el polimorfismo y el factor externo se precisaría comparar la distribución genotípica y alélica de los subgrupos de pacientes según su procedencia, con controles también segregados según esta variable clínica.

Los resultados de este estudio complementario nos informarían sobre si existe correlación real entre el polimorfismo y la yododeficiencia en su influencia sobre la patogénesis de la tiroiditis autoinmune, o si los datos de nuestra serie se deben a que la procedencia de zona endémica condiciona por sí misma el riesgo de la enfermedad y está actuando como factor de confusión en el análisis.

2.5.2. Polimorfismo -33T>C del gen IL 4 (rs2070874) y consumo de sal yodada

Los estudios indican que la ingesta dietética de yodo es un factor ambiental muy importante que puede desencadenar la reacción autoinmune en la enfermedad. Existen diferentes mecanismos que justifican esta influencia patogénica: La inmunogenicidad de la molécula de tiroglobulina altamente yodada, que puede facilitar la absorción del antígeno y su procesamiento; el estímulo de la funcionalidad de los macrófagos y las células dendríticas junto con el incremento del número de células T circulantes y la producción de IgG por las células B ^(2,4); también el procesamiento del exceso de yodo en las células epiteliales tiroideas que puede desencadenar niveles elevados de estrés oxidativo y con ello una oxidación dañina de los lípidos y daños en el tejido tiroideo ⁽⁴⁷⁾.

En nuestro análisis, los pacientes que no consumen sal yodada presentan de manera más frecuente, en el modelo de herencia codominante, un genotipo heterocigoto que aquéllos que consumen sal yodada. Lo mismo ocurre en el modelo dominante de herencia, en que los enfermos que no consumen sal yodada son portadores del alelo T de manera más frecuente.

Estas diferencias en la distribución en nuestros pacientes podrían deberse a la existencia de una relación entre la capacidad de influencia del polimorfismo sobre el desarrollo de tiroiditis autoinmune y la ingesta dietética de yodo. Se precisaría completar el estudio con un análisis de subgrupos entre pacientes con tiroiditis autoinmune y controles, separados según su consumo o no de sal yodada; de este modo

confirmaríamos esta interacción o la descartaríamos, achacándose entonces nuestros resultados a la actuación de la ingesta de sal yodada como factor de confusión en el análisis por su influencia directa en la patogenia de la enfermedad, y no a través de su coadyuvancia con el polimorfismo.

3. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN AUTOFAGIA

3.1. Polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601)

En nuestro estudio se observan diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos ($p<0,01$). En el análisis según los diferentes modelos de herencia se han obtenido resultados estadísticamente significativos en los tres modelos de herencia: codominante, dominante y recesiva ($p<0,01$). Ser portador del alelo G (menos frecuente) en el modelo de herencia codominante, tanto en heterocigosis (C/G) como en homocigosis (G/G), supone un aumento del riesgo de presentar tiroiditis autoinmune, mayor aún en presencia de los dos alelos variantes. En el modelo de herencia dominante se confirma que ser portador del alelo variante G aumenta el riesgo de la enfermedad. También se confirma un mayor riesgo de desarrollar tiroiditis autoinmune, según el análisis con el modelo de herencia recesivo, en los pacientes en homocigosis para el alelo mutado G.

En nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que intenta relacionar polimorfismos de genes de autofagia con tiroiditis autoinmune.

Hasta el momento no se ha encontrado evidencia de influencia de polimorfismos del gen ATG2B en otras enfermedades en las que se ha realizado el análisis, como la enfermedad de Paget⁽¹⁶⁴⁾ o la tuberculosis⁽¹⁶⁵⁾.

La proteína Atg2B es esencial para la formación del autofagosoma y su déficit ocasiona un bloqueo en el proceso de autofagia⁽²⁰⁶⁾. Interviene en el sellado de las membranas, etapa posterior a la regulada por el resto de proteínas incluidas en nuestro trabajo, que contribuyen a la elongación de dichas membranas. Es posible que las variaciones en el genotipo del gen ATG2B en los pacientes que presentan el

polimorfismo rs3759601 puedan modificar el proceso de autofagia, debido a que la modificación en la proteína Atg2B por un cambio de aminoácido (Gln1382Glu) induzca cambios en su funcionalidad. Se precisan más estudios sobre la funcionalidad de esta variante genética que confirmen su implicación en la enfermedad.

3.2. Polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214)

Los resultados de nuestro trabajo muestran diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) entre pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos ($p < 0,01$). En el análisis según los diferentes tipos de herencia se han obtenido resultados estadísticamente significativos en los tres modelos. En el modelo de herencia codominante ser portador del alelo G (mutado), tanto en heterocigosis (C/G) como en homocigosis (G/G), confiere un efecto protector frente a la enfermedad, mayor aún en presencia de los dos alelos menos frecuentes. En el modelo de herencia dominante se confirma que ser portador del alelo variante G disminuye el riesgo de presentar tiroiditis autoinmune. También se observa un menor riesgo de desarrollar tiroiditis autoinmune con el modelo de herencia recesivo, en los pacientes en homocigosis para el alelo mutado G.

No se han realizado hasta ahora estudios que valoren la influencia del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG 5 (rs2245214) en la etiopatogenia de la tiroiditis autoinmune.

El polimorfismo de ATG5 rs2245214 ocasiona una mutación intrónica, es decir, que afecta a una región del ADN que no se transcribe a ARN. Pese a ello, se ha incluido en el estudio por su alta prevalencia en caucásicos (mayor del 10% e incluso del 40% en algunos estudios) y porque se asocia con la pérdida de las zonas de reconocimiento para la proteína SRp40 que está implicada en la maduración del ARNm.

En las enfermedades autoinmunes mediadas por autoanticuerpos, la autofagia podría facilitar la presentación de antígenos y de este modo la activación y maduración de las células B a células plasmáticas que segregan anticuerpos patogénicos. El bloqueo parcial de la autofagia podría prevenir de manera específica la presentación de los

autoantígenos, mientras que una autofagia excesiva podría potenciar la exposición de estos péptidos modificados e iniciar el proceso de la autoinmunidad. De manera habitual, estos efectos se equilibrarían con otros efectos dependientes de la autofagia (como la supervivencia celular, el incremento del aclaramiento de los restos apoptóticos y la regulación de la secreción de citocinas proinflamatorias), pero el decremento en la presentación de antígenos es un mecanismo que podría justificar el efecto protector en nuestro estudio ⁽²⁰⁷⁾.

En cambio, otros estudios proponen la contribución del proceso de autofagia en el establecimiento de la tolerancia a autoantígenos. Las células T autorreactivas son eliminadas de manera activa a través de la presentación en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II en las células epiteliales del timo, consiguiendo así la referida tolerancia ⁽²⁰⁸⁾. Este hecho se ha demostrado en estudios que objetivan el desarrollo de autoinmunidad por alteración en la presentación de antígenos en células epiteliales tímicas modificadas genéticamente para inducir un defecto de Atg5 ⁽²⁰⁹⁾.

En hipótesis, el polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) podría, de manera indirecta, ocasionar modificaciones en la autofagia o podría estar relacionado con otros polimorfismos en regiones exónicas que no hayan sido incluidos en nuestro estudio y que conferirían una protección frente al desarrollo de tiroiditis autoinmune.

No obstante, se ha objetivado una relación entre este polimorfismo y otras enfermedades. Se asocia con el inicio y/o el desarrollo de LES en varias poblaciones (EEUU y Suecia) ^(170,171). Ser portador del alelo G del polimorfismo de ATG5 rs2245214 se ha asociado con un incremento de riesgo de enfermedad de Paget ⁽¹⁶⁴⁾, a diferencia de nuestro estudio en que confiere un efecto protector frente al desarrollo de tiroiditis autoinmune, si bien, al ser diferentes los mecanismos patogénicos de ambas enfermedades puede estar justificado el resultado obtenido en nuestro trabajo.

Se ha descrito que los pacientes portadores del polimorfismo del gen ATG5 rs2245214 tienen una mayor probabilidad de desarrollar carcinoma folicular de tiroides ⁽¹⁶⁷⁾. El alelo G de este polimorfismo se ha asociado con un aumento de la susceptibilidad a desarrollar dicho tumor, a diferencia de la tiroiditis autoinmune en que

disminuye el riesgo de enfermar. No hay datos que relacionen la tiroiditis autoinmune con el desarrollo del carcinoma folicular de tiroides, y el proceso de autofagia puede influir, por diferentes mecanismos, tanto en las enfermedades autoinmunes como en las patologías tumorales. Por tanto la patogenia de la influencia sobre ambas patologías tiroideas puede diferir y no hay una controversia entre ambos datos.

3.3. Polimorfismo -635 C>T del gen ATG10 (rs1864183)

Nuestro estudio no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con tiroiditis autoinmune y controles sanos, en cuanto a la distribución de frecuencias alélicas y genómicas, ni en cuanto al análisis de riesgo según los diferentes modelos de herencia.

No hay en la literatura científica hasta la actualidad estudios que hayan valorado la relación entre el polimorfismo del gen ATG10 rs1864183 y el desarrollo de tiroiditis autoinmune. Sí se ha relacionado la presencia de este polimorfismo con otras enfermedades como la enfermedad de Paget ⁽¹⁶⁴⁾.

El polimorfismo del gen ATG10 rs1864183 se ha asociado con un incremento de la producción de IL-8 en estudios sobre inducción de citocinas en pacientes afectos de tuberculosis ⁽¹⁶⁵⁾. Se ha demostrado la presencia de IL-8 en las células foliculares tiroideas y en las células inflamatorias que infiltran la glándula en la tiroiditis autoinmune ^(210,211). Por tanto, las alteraciones en el proceso de autofagia debidas al SPN del gen ATG10 rs1864183 podrían influir indirectamente en producción de IL-8 o en su degradación y, de este modo, tener un papel en la patogénesis de la tiroiditis autoinmune.

Hemos de considerar también que la proteína Atg10 contribuye a la formación del complejo Atg12-Atg5, necesario en la cascada de conjugación de proteínas necesarias para la elongación del autofagosoma. Hemos observado en nuestro estudio la relación entre el polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) y la tiroiditis autoinmune. La variación en Atg 5 podría ser suficiente para modificar el proceso de autofagia y explicar así la falta de asociación del SPN de ATG10 con la enfermedad.

Se precisan más estudios que investiguen la influencia del polimorfismo sobre la enfermedad.

3.4. Polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880)

El estudio del polimorfismo +898 A>G del gen ATG16L1 (rs 2241880) en nuestra serie no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con tiroiditis autoinmune y controles sanos, en cuanto a la distribución de frecuencias alélicas y genómicas, ni en cuanto al análisis de riesgo según los diferentes modelos de herencia.

No hay hasta el momento en la literatura científica estudios que hayan valorado la relación entre el polimorfismo de ATG16L1 rs2241880 y el desarrollo de tiroiditis autoinmune.

Pese a ello, existe evidencia científica que relaciona la presencia del polimorfismo de ATG16L1 rs2241880 con otras enfermedades, como la enfermedad de Crohn ^(50,180-182), la colitis ulcerosa ⁽¹⁸⁴⁾, el cáncer colorrectal ⁽¹⁸⁵⁾, la psoriasis ⁽¹⁸⁸⁾ o la enfermedad de Paget ⁽¹⁶⁴⁾.

El mecanismo etiopatogénico parece radicar en la producción de niveles más elevados de IL-1 β en aquellas personas con defectos en los mecanismos de autofagia, debidos a las mutaciones en el gen ATG16L1 ⁽¹⁰⁴⁾. La inhibición de la autofagia incrementa la producción de IL-1 β a través de una mayor activación de la caspasa 1, proteína del complejo que promueve la maduración de la citocina inflamatoria referida ⁽²¹²⁾. Es conocido el papel de IL-1 β como citocina proinflamatoria que interviene en la etiopatogenia de la tiroiditis autoinmune a través de múltiples mecanismos. Por tanto, se propugna la intervención de la autofagia a través de las modificaciones en citocinas como un factor influyente en el desarrollo de la enfermedad.

El polimorfismo del gen ATG16L1 rs2241880 se ha asociado con un descenso del riesgo de presentar carcinoma tiroideo del epitelio folicular en aquellos sujetos portadores del alelo G. El mecanismo de acción propuesto es que las variantes del gen ATG16L1 pueden influir en el riesgo de cáncer de tiroides a través de la modulación en la producción de IL-1 β , citocina que también influye sobre el crecimiento y la

diferenciación de diferentes tipo celulares, habiéndose descrito efecto antiproliferativo en líneas celulares epiteliales tiroideas malignas. No se pueden excluir otros efectos sobre la capacidad de las células epiteliales tiroideas de prevenir la muerte celular mediante inducción de la autofagia ⁽¹⁷⁹⁾. Es bien conocida la relación entre la tiroiditis autoinmune y el carcinoma papilar de tiroides, cuyo riesgo está incrementado en estos pacientes, existiendo diferentes hipótesis sobre los mecanismos moleculares que relacionan ambos procesos, a las que se puede sumar las alteraciones en los procesos de autofagia ⁽⁹⁾ que podrían influir también en la etiopatogenia de la tiroiditis, aunque no se hayan objetivado resultados significativos.

La proteína Atg16L1 participa en el elongamiento del autofagosoma uniéndose al conjugado proteico de Atg12-Atg5 para formar complejos mayores. En nuestro trabajo se ha observado la relación entre el polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) y la tiroiditis autoinmune. Es posible que la variación en Atg 5 pueda ser suficiente para inhibir esta cascada proteica y modificar el proceso de autofagia, explicando de este modo la falta de asociación del SPN de ATG16L1 con la enfermedad.

Es preciso ampliar los estudios para investigar una posible relación entre el polimorfismo y la tiroiditis autoinmune.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en este trabajo y como consecuencia de los resultados obtenidos y su discusión, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. Las características epidemiológicas y clínicas que presentan los pacientes con tiroiditis autoinmune incluidos en nuestra serie no difieren respecto a los datos habituales poblacionales.
2. En nuestro estudio, no hemos encontrado ninguna asociación significativa entre la presencia de tiroiditis autoinmune y las variantes alélicas y genotípicas de los polimorfismos -511 C>G del gen IL1B, -33T>C del gen IL4, -174 G>C del gen IL6 y -1C>T del gen CD40. Esto muestra que las variantes génicas de los genes que codifican proteínas relacionadas con la respuesta inmune incluidas en nuestro trabajo no modifican el riesgo de desarrollar tiroiditis autoinmune.
3. Por primera vez mostramos que ser portador del alelo G (genotipos CG y GG) del polimorfismo -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) supone un aumento del riesgo de presentar tiroiditis autoinmune. Estos datos sugieren que es posible que las variaciones en el genotipo del gen ATG2B puedan modificar el proceso de autofagia al alterar su funcionalidad, e influir en la etiopatogénesis de la tiroiditis autoinmune.
4. Así mismo, mostramos por primera vez que ser portador del alelo G (genotipos CG y GG) del polimorfismo 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214) confiere un efecto protector frente al desarrollo de tiroiditis autoinmune, reforzando la idea de que variaciones en el mecanismo de autofagia pueden estar implicadas en el desarrollo de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun Rev* 2014 Apr-May;13(4-5):391-397.
- (2) Ahmed R, Al-Shaikh S, Akhtar M. Hashimoto thyroiditis: a century later. *Adv Anat Pathol* 2012 May;19(3):181-186.
- (3) Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997 Sep;84(3):223-243.
- (4) McLeod DS, Cooper DS. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine* 2012 Oct;42(2):252-265.
- (5) Golden SH, Robinson KA, Saldanha I, Anton B, Ladenson PW. Clinical review: Prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 Jun;94(6):1853-1878.
- (6) Delemer B, Aubert JP, Nys P, Landron F, Bouee S. An observational study of the initial management of hypothyroidism in France: the ORCHIDEE study. *Eur J Endocrinol* 2012 Dec;167(6):817-823.
- (7) Vanderpump MP. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull* 2011;99:39-51.
- (8) Effraimidis G, Wiersinga WM. Mechanisms in endocrinology: autoimmune thyroid disease: old and new players. *Eur J Endocrinol* 2014 Jun;170(6):R241-52.
- (9) Bozec A, Lassalle S, Hofman V, Ilie M, Santini J, Hofman P. The thyroid gland: a crossroad in inflammation-induced carcinoma? An ongoing debate with new therapeutic potential. *Curr Med Chem* 2010;17(30):3449-3461.
- (10) Ahn D, Heo SJ, Park JH, Kim JH, Sohn JH, Park JY, et al. Clinical relationship between Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer. *Acta Oncol* 2011 Nov;50(8):1228-1234.
- (11) Hamburger JI, Miller JM, Kini SR. Lymphoma of the thyroid. *Ann Intern Med* 1983 Nov;99(5):685-693.
- (12) Pedersen RK, Pedersen NT. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the thyroid gland: a population based study. *Histopathology* 1996 Jan;28(1):25-32.
- (13) Jenkins RC, Weetman AP. Disease associations with autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2002 Nov;12(11):977-988.
- (14) Boelaert K, Newby PR, Simmonds MJ, Holder RL, Carr-Smith JD, Heward JM, et al. Prevalence and relative risk of other autoimmune diseases in subjects with autoimmune thyroid disease. *Am J Med* 2010 Feb;123(2):183.e1-183.e9.

BIBLIOGRAFÍA

- (15) Galofre JC, Garcia-Mayor RV, Fluiters E, Fernandez-Calvet L, Rego A, Paramo C, et al. Incidence of different forms of thyroid dysfunction and its degrees in an iodine sufficient area. *Thyroidology* 1994 Aug;6(2):49-54.
- (16) Pedersen IB, Laurberg P, Knudsen N, Jorgensen T, Perrild H, Ovesen L, et al. An increased incidence of overt hypothyroidism after iodine fortification of salt in Denmark: a prospective population study. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Aug;92(8):3122-3127.
- (17) Zimmermann MB. Iodine deficiency. *Endocr Rev* 2009 Jun;30(4):376-408.
- (18) Hutfless S, Matos P, Talor MV, Caturegli P, Rose NR. Significance of prediagnostic thyroid antibodies in women with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 Sep;96(9):E1466-71.
- (19) Pandit AA, Vijay Warde M, Menon PS. Correlation of number of intrathyroid lymphocytes with antimicrosomal antibody titer in Hashimoto's thyroiditis. *Diagn Cytopathol* 2003 Feb;28(2):63-65.
- (20) McLachlan SM, Rapoport B. Why measure thyroglobulin autoantibodies rather than thyroid peroxidase autoantibodies? *Thyroid* 2004 Jul;14(7):510-520.
- (21) Carle A, Laurberg P, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Rasmussen LB, et al. Thyroid peroxidase and thyroglobulin auto-antibodies in patients with newly diagnosed overt hypothyroidism. *Autoimmunity* 2006 Sep;39(6):497-503.
- (22) Sostre S, Reyes MM. Sonographic diagnosis and grading of Hashimoto's thyroiditis. *J Endocrinol Invest* 1991 Feb;14(2):115-121.
- (23) LiVolsi VA. The pathology of autoimmune thyroid disease: a review. *Thyroid* 1994 Fall;4(3):333-339.
- (24) Nanba T, Watanabe M, Inoue N, Iwatani Y. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease. *Thyroid* 2009 May;19(5):495-501.
- (25) Tomer Y, Huber A. The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. *J Autoimmun* 2009 May-Jun;32(3-4):231-239.
- (26) Chiovato L, Bassi P, Santini F, Mammoli C, Lapi P, Carayon P, et al. Antibodies producing complement-mediated thyroid cytotoxicity in patients with atrophic or goitrous autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 Dec;77(6):1700-1705.
- (27) Brix TH, Kyvik KO, Hegedus L. A population-based study of chronic autoimmune hypothyroidism in Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Feb;85(2):536-539.

-
- (28) Kawashima A, Tanigawa K, Akama T, Yoshihara A, Ishii N, Suzuki K. Innate immune activation and thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 Dec;96(12):3661-3671.
- (29) Tomer Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future. *Thyroid* 2010 Jul;20(7):715-725.
- (30) Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999 Jul 8;234(2):177-186.
- (31) Dustin ML. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol Rev* 2008 Feb;221:77-89.
- (32) Jacobson EM, Huber A, Tomer Y. The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology. *J Autoimmun* 2008 Feb-Mar;30(1-2):58-62.
- (33) Farid NR, Sampson L, Moens H, Barnard JM. The association of goitrous autoimmune thyroiditis with HLA-DR5. *Tissue Antigens* 1981 Mar;17(3):265-268.
- (34) Petrone A, Giorgi G, Mesturino CA, Capizzi M, Cascino I, Nistico L, et al. Association of DRB1*04-DQB1*0301 haplotype and lack of association of two polymorphic sites at CTLA-4 gene with Hashimoto's thyroiditis in an Italian population. *Thyroid* 2001 Feb;11(2):171-175.
- (35) Cogni G, Chiovato L. An overview of the pathogenesis of thyroid autoimmunity. *Hormones (Athens)* 2013 Jan-Mar;12(1):19-29.
- (36) 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. *Am J Hum Genet* 2005 Apr;76(4):561-571.
- (37) Zaletel K, Gaberscek S. Hashimoto's Thyroiditis: From Genes to the Disease. *Curr Genomics* 2011 Dec;12(8):576-588.
- (38) Ito C, Watanabe M, Okuda N, Watanabe C, Iwatani Y. Association between the severity of Hashimoto's disease and the functional +874A/T polymorphism in the interferon-gamma gene. *Endocr J* 2006 Aug;53(4):473-478.
- (39) Nanba T, Watanabe M, Akamizu T, Iwatani Y. The -590CC genotype in the IL4 gene as a strong predictive factor for the development of hypothyroidism in Hashimoto disease. *Clin Chem* 2008 Mar;54(3):621-623.
- (40) Yamada H, Watanabe M, Nanba T, Akamizu T, Iwatani Y. The +869T/C polymorphism in the transforming growth factor-beta1 gene is associated with the severity and intractability of autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 2008 Mar;151(3):379-382.

BIBLIOGRAFÍA

- (41) Inoue N, Watanabe M, Nanba T, Wada M, Akamizu T, Iwatani Y. Involvement of functional polymorphisms in the TNFA gene in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases and production of anti-thyrotropin receptor antibody. *Clin Exp Immunol* 2009 May;156(2):199-204.
- (42) Paust S, Cantor H. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2005 Apr;204:195-207.
- (43) Gaberscek S, Zaletel K, Schwetz V, Pieber T, Obermayer-Pietsch B, Lerchbaum E. Mechanisms in endocrinology: thyroid and polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2015 Jan;172(1):R9-21.
- (44) van Zuuren EJ, Albusta AY, Fedorowicz Z, Carter B, Pijl H. Selenium Supplementation for Hashimoto's Thyroiditis: Summary of a Cochrane Systematic Review. *Eur Thyroid J* 2014 Mar;3(1):25-31.
- (45) Duntas LH. Environmental factors and thyroid autoimmunity. *Ann Endocrinol (Paris)* 2011 Apr;72(2):108-113.
- (46) Papanastasiou L, Vatalas IA, Koutras DA, Mastorakos G. Thyroid autoimmunity in the current iodine environment. *Thyroid* 2007 Aug;17(8):729-739.
- (47) Luo Y, Kawashima A, Ishido Y, Yoshihara A, Oda K, Hiroi N, et al. Iodine excess as an environmental risk factor for autoimmune thyroid disease. *Int J Mol Sci* 2014 Jul 21;15(7):12895-12912.
- (48) Tomer Y. Hepatitis C and interferon induced thyroiditis. *J Autoimmun* 2010 May;34(3):J322-6.
- (49) Blackard JT, Kong L, Huber AK, Tomer Y. Hepatitis C virus infection of a thyroid cell line: implications for pathogenesis of hepatitis C virus and thyroiditis. *Thyroid* 2013 Jul;23(7):863-870.
- (50) Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007 May;39(5):596-604.
- (51) Hammerstad SS, Jahnsen FL, Tauriainen S, Hyoty H, Paulsen T, Norheim I, et al. Inflammation and increased myxovirus resistance protein A expression in thyroid tissue in the early stages of Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid* 2013 Mar;23(3):334-341.
- (52) Mori K, Nakagawa Y, Ozaki H. Does the gut microbiota trigger Hashimoto's thyroiditis? *Discov Med* 2012 Nov;14(78):321-326.
- (53) Tomer Y, Menconi F. Interferon induced thyroiditis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009 Dec;23(6):703-712.

-
- (54) Akeno N, Smith EP, Stefan M, Huber AK, Zhang W, Keddache M, et al. IFN-alpha mediates the development of autoimmunity both by direct tissue toxicity and through immune cell recruitment mechanisms. *J Immunol* 2011 Apr 15;186(8):4693-4706.
- (55) Grubeck-Loebenstien B, Buchan G, Chantry D, Kassal H, Londei M, Pirich K, et al. Analysis of intrathyroidal cytokine production in thyroid autoimmune disease: thyroid follicular cells produce interleukin-1 alpha and interleukin-6. *Clin Exp Immunol* 1989 Sep;77(3):324-330.
- (56) Rasmussen AK, Bendtzen K, Feldt-Rasmussen U. Thyrocyte-interleukin-1 interactions. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000;108(2):67-71.
- (57) Rebuffat SA, Kammoun-Krichen M, Charfeddine I, Ayadi H, Bougacha-Elleuch N, Peraldi-Roux S. IL-1beta and TSH disturb thyroid epithelium integrity in autoimmune thyroid diseases. *Immunobiology* 2013 Mar;218(3):285-291.
- (58) Watson PF, Pickerill AP, Davies R, Weetman AP. Semi-quantitative analysis of interleukin-1 alpha, interleukin-6 and interleukin-8 mRNA expression by human thyrocytes. *J Mol Endocrinol* 1995 Aug;15(1):11-21.
- (59) Gianoukakis AG, Jennings TA, King CS, Sheehan CE, Hoa N, Heldin P, et al. Hyaluronan accumulation in thyroid tissue: evidence for contributions from epithelial cells and fibroblasts. *Endocrinology* 2007 Jan;148(1):54-62.
- (60) Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, et al. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 1997 Feb 14;275(5302):960-963.
- (61) Mikos H, Mikos M, Rabska-Pietrzak B, Niedziela M. The clinical role of serum concentrations of selected cytokines: IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in diagnosis of autoimmune thyroid disease (AITD) in children. *Autoimmunity* 2014 Nov;47(7):466-472.
- (62) Romagnani S. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1996 Sep;80(3 Pt 1):225-235.
- (63) Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP, Bell JI, Wass JA, Welsh KI. Cytokine gene polymorphisms in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 May;85(5):1984-1988.
- (64) Del Prete GF, Tiri A, De Carli M, Mariotti S, Pinchera A, Chretien I, et al. High potential to tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) production of thyroid infiltrating T lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis: a peculiar feature of destructive thyroid autoimmunity. *Autoimmunity* 1989;4(4):267-276.
- (65) Mazziotti G, Sorvillo F, Naclerio C, Farzati A, Cioffi M, Perna R, et al. Type-1 response in peripheral CD4+ and CD8+ T cells from patients with Hashimoto's

- thyroiditis. *Eur J Endocrinol* 2003 Apr;148(4):383-388.
- (66) Chen RH, Chang CT, Wang TY, Chen CC, Tsai CH, Tsai FJ. Lack of association between interleukin-4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid diseases amongst Taiwanese Chinese. *Endocrine* 2007 Oct;32(2):170-174.
- (67) Kelso A. Cytokines: principles and prospects. *Immunol Cell Biol* 1998 Aug;76(4):300-317.
- (68) Poncin S, Lengele B, Colin IM, Gerard AC. Differential interactions between Th1/Th2, Th1/Th3, and Th2/Th3 cytokines in the regulation of thyroperoxidase and dual oxidase expression, and of thyroglobulin secretion in thyrocytes in vitro. *Endocrinology* 2008 Apr;149(4):1534-1542.
- (69) Raad H, Eskalli Z, Corvilain B, Miot F, De Deken X. Thyroid hydrogen peroxide production is enhanced by the Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, through increased expression of the dual oxidase 2 and its maturation factor DUOXA2. *Free Radic Biol Med* 2013 Mar;56:216-225.
- (70) Santaguida MG, Nardo S, Del Duca SC, Lococo E, Virili C, Gargano L, et al. Increased interleukin-4-positive lymphocytes in patients with Hashimoto's thyroiditis and concurrent non-endocrine autoimmune disorders. *Clin Exp Immunol* 2011 Aug;165(2):148-154.
- (71) Kissonerghis AM, Grubeck-Loebenstien B, Pirich K, Feldmann M, Londei M. Tumour necrosis factor synergises with gamma interferon on the induction of mRNA for DR alpha chain on thyrocytes from Graves' disease and non toxic goitre. *Autoimmunity* 1989;4(4):255-266.
- (72) Kayser L, Broholm H, Francis D, Perrild H, Olsen BE, Bendtzen K, et al. Immunocytochemical localisation of interleukin-1 alpha and interleukin-6 in thyroid tissues from patients with neoplastic or autoimmune thyroid disorders. *Autoimmunity* 1995;20(2):75-82.
- (73) Rasmussen AK, Feldt-Rasmussen U, Bendtzen K. The effect of interleukin-1 on the thyroid gland. *Autoimmunity* 1993;16(2):141-148.
- (74) Masek Z, Astl J, Duskova J, Bilek R, Novak Z, Vanik P, et al. Plasma and tissue levels of cytokines and adhesive molecules in patients before strumectomy. *Vnitr Lek* 1996 Nov;42(11):747-750.
- (75) Zorin NA, Maklakova TP, Appel'gans TV, Arkhipova SV, Bichan IV. Hormones, cytokines and macroglobulines in blood of women with autoimmune thyroid diseases. *Ter Arkh* 2008;80(11):61-63.
- (76) Salvi M, Girasole G, Pedrazzoni M, Passeri M, Giuliani N, Minelli R, et al. Increased serum concentrations of interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 Aug;81(8):2976-

2979.

- (77) Ruggeri RM, Barresi G, Sciacchitano S, Trimarchi F, Benvenga S, Trovato M. Immunoexpression of the CD30 ligand/CD30 and IL-6/IL-6R signals in thyroid autoimmune diseases. *Histol Histopathol* 2006 Mar;21(3):249-256.
- (78) Tominaga T, Yamashita S, Nagayama Y, Morita S, Yokoyama N, Izumi M, et al. Interleukin 6 inhibits human thyroid peroxidase gene expression. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991 Mar;124(3):290-294.
- (79) Popova EV, Popova NP, Aliab'eva IV, Gatiatulina ER. Interleukin-6 in endemic goiter patients in the south Ural region. *Gig Sanit* 2012 May-Jun;(3)(3):9-10.
- (80) Sieminska L, Wojciechowska C, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Nowak M, et al. Serum concentrations of leptin, adiponectin, and interleukin-6 in postmenopausal women with Hashimoto's thyroiditis. *Endokrynol Pol* 2010 Jan-Feb;61(1):112-116.
- (81) Sieminska L, Wojciechowska C, Walczak K, Borowski A, Marek B, Nowak M, et al. Associations between metabolic syndrome, serum thyrotropin, and thyroid antibodies status in postmenopausal women, and the role of interleukin-6. *Endokrynol Pol* 2015;66(5):394-403.
- (82) Peters AL, Stunz LL, Bishop GA. CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Semin Immunol* 2009 Oct;21(5):293-300.
- (83) Mysliwiec J, Oklota M, Nikolajuk A, Waligorski D, Gorska M. Serum CD40/CD40L system in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis related to soluble Fas, FasL and humoral markers of autoimmune response. *Immunol Invest* 2007;36(3):247-257.
- (84) 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 Aug;84(2):212-215.
- (85) Carayanniotis G, Masters SR, Noelle RJ. Suppression of murine thyroiditis via blockade of the CD40-CD40L interaction. *Immunology* 1997 Mar;90(3):421-426.
- (86) Peterson KE, Braley-Mullen H. CD40L is necessary for the priming of effector cells for lymphocytic and granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *J Autoimmun* 1999 Feb;12(1):1-12.
- (87) 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 Aug;9(8):749-755.
- (88) Smith TJ, Sempowski GD, Berenson CS, Cao HJ, Wang HS, Phipps RP. Human thyroid fibroblasts exhibit a distinctive phenotype in culture: characteristic

- ganglioside profile and functional CD40 expression. *Endocrinology* 1997 Dec;138(12):5576-5588.
- (89) Metcalfe RA, McIntosh RS, Marelli-Berg F, Lombardi G, Lechler R, Weetman AP. Detection of CD40 on human thyroid follicular cells: analysis of expression and function. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 Apr;83(4):1268-1274.
- (90) Weetman AP. Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *Eur J Endocrinol* 2003 Jan;148(1):1-9.
- (91) Salmaso C, Olive D, Pesce G, Bagnasco M. Costimulatory molecules and autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* 2002 May;35(3):159-167.
- (92) Kie JH, Cho MS, Yang WI. Expression of CD40 and apoptosis related molecules in autoimmune thyroid diseases. *Yonsei Med J* 2001 Oct;42(5):488-496.
- (93) Buck D, Kroner A, Rieckmann P, Maurer M, Wiendl H. Analysis of the C/T(-1) single nucleotide polymorphism in the CD40 gene in multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2006 Oct;68(4):335-338.
- (94) Blanco-Kelly F, Matesanz F, Alcina A, Teruel M, Diaz-Gallo LM, Gomez-Garcia M, et al. CD40: novel association with Crohn's disease and replication in multiple sclerosis susceptibility. *PLoS One* 2010 Jul 12;5(7):e11520.
- (95) Sridhar S, Botbol Y, Macian F, Cuervo AM. Autophagy and disease: always two sides to a problem. *J Pathol* 2012 Jan;226(2):255-273.
- (96) Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011 Jan 20;469(7330):323-335.
- (97) Lista P, Straface E, Brunelleschi S, Franconi F, Malorni W. On the role of autophagy in human diseases: a gender perspective. *J Cell Mol Med* 2011 Jul;15(7):1443-1457.
- (98) Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2007 Oct;7(10):767-777.
- (99) Lleo A, Invernizzi P, Selmi C, Coppel RL, Alpini G, Podda M, et al. Autophagy: highlighting a novel player in the autoimmunity scenario. *J Autoimmun* 2007 Sep-Nov;29(2-3):61-68.
- (100) Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res* 2012 Jan;22(1):43-61.
- (101) Chen Y, Klionsky DJ. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci* 2011 Jan 15;124(Pt 2):161-170.
- (102) Bhattacharya A, Eissa NT. Autophagy and autoimmunity crosstalks. *Front*

- Immunol 2013 Apr 15;4:88.
- (103) Zhou XJ, Zhang H. Autophagy in immunity: implications in etiology of autoimmune/autoinflammatory diseases. *Autophagy* 2012 Sep;8(9):1286-1299.
- (104) Joosten LA, Netea MG, Dinarello CA. Interleukin-1beta in innate inflammation, autophagy and immunity. *Semin Immunol* 2013 Dec 15;25(6):416-424.
- (105) Caza TN, Talaber G, Perl A. Metabolic regulation of organelle homeostasis in lupus T cells. *Clin Immunol* 2012 Sep;144(3):200-213.
- (106) Giancchetti E, Delfino DV, Fierabracci A. Recent insights on the putative role of autophagy in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2014 Mar;13(3):231-241.
- (107) Nicklin MJ, Weith A, Duff GW. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics* 1994 Jan 15;19(2):382-384.
- (108) Chen RH, Chen WC, Chang CT, Tsai CH, Tsai FJ. Interleukin-1-beta gene, but not the interleukin-1 receptor antagonist gene, is associated with Graves' disease. *J Clin Lab Anal* 2005;19(4):133-138.
- (109) Chen RH, Chang CT, Chen WC, Tsai CH, Tsai FJ. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms among Hashimoto's thyroiditis patients. *J Clin Lab Anal* 2006;20(6):260-265.
- (110) Lacka K, Paradowska-Gorycka A, Maciejewski A, Kramer L, Herman WA, Lacki JK. Interleukin 1 beta (IL1beta) gene polymorphisms (SNP-511 and SNP+3953) in Hashimoto's thyroiditis among the Polish population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2014 Oct;122(9):544-547.
- (111) Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992 Jun;22(6):396-402.
- (112) Pociot F, Ronningen KS, Bergholdt R, Lorenzen T, Johannesen J, Ye K, et al. Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes--evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Autoimmunity* 1994;19(3):169-178.
- (113) Le Beau MM, Espinosa R, 3rd, Neuman WL, Stock W, Roulston D, Larson RA, et al. Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jun 15;90(12):5484-5488.
- (114) Heward JM, Nithiyananthan R, Allahabadia A, Gibson S, Franklyn JA, Gough SC. No association of an interleukin 4 gene promoter polymorphism with Graves' disease in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Aug;86(8):3861-

- 3863.
- (115) Shen X, Yan X, Xie B, Xu D, Wang K, Zhu J, et al. Genetic variants of interleukin-4 gene in autoimmune thyroid diseases: An updated meta-analysis. *Autoimmunity* 2014 Oct 6:1-7.
- (116) Kawashima T, Noguchi E, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Nakagawa H, Otsuka F, et al. Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J Med Genet* 1998 Jun;35(6):502-504.
- (117) Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kawashima T, et al. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 1998 Apr;28(4):449-453.
- (118) Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali JJ, Klinnert M, et al. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 1995 Nov;25 Suppl 2:74-8; discussion 95-6.
- (119) Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999 Jun;42(6):1093-1100.
- (120) Wu KH, Peng CT, Li TC, Wan L, Tsai CH, Lan SJ, et al. Interleukin 4, interleukin 6 and interleukin 10 polymorphisms in children with acute and chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2005 Mar;128(6):849-852.
- (121) Sutherland GR, Baker E, Callen DF, Hyland VJ, Wong G, Clark S, et al. Interleukin 4 is at 5q31 and interleukin 6 is at 7p15. *Hum Genet* 1988 Aug;79(4):335-337.
- (122) Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tatusmi K, Hidaka Y, Akamizu T, et al. Association of functional polymorphisms in promoter regions of IL5, IL6 and IL13 genes with development and prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 2011 Mar;163(3):318-323.
- (123) Baki M, Akman FE, Vural P, Dogru-Abbasoglu S, Ozderya A, Karadag B, et al. The combination of interleukin-10 -1082 and tumor necrosis factor alpha -308 or interleukin-6 -174 genes polymorphisms suggests an association with susceptibility to Hashimoto's thyroiditis. *Int Immunopharmacol* 2012 Apr;12(4):543-546.
- (124) Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H, Kamiuchi K, Ishii M, Yano M, et al. Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promoter region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabet Med* 2002 Dec;19(12):1000-1005.
- (125) Jahromi MM, Millward BA, Demaine AG. A polymorphism in the promoter

- region of the gene for interleukin-6 is associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *J Interferon Cytokine Res* 2000 Oct;20(10):885-888.
- (126) Herbert A, Liu C, Karamohamed S, Schiller J, Liu J, Yang Q, et al. The -174 IL-6 GG genotype is associated with a reduced risk of type 2 diabetes mellitus in a family sample from the National Heart, Lung and Blood Institute's Framingham Heart Study. *Diabetologia* 2005 Aug;48(8):1492-1495.
- (127) Mysliwiec M, Mysliwska J, Zorena K, Balcerska A, Malinowska E, Wisniewski P. Interleukin 6 -174(G>C) gene polymorphism is related to celiac disease and autoimmune thyroiditis coincidence in diabetes type 1 children. *Diabetes Res Clin Pract* 2008 Oct;82(1):108-112.
- (128) Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998 Oct 1;102(7):1369-1376.
- (129) Chapman CM, Beilby JP, Humphries SE, Palmer LJ, Thompson PL, Hung J. Association of an allelic variant of interleukin-6 with subclinical carotid atherosclerosis in an Australian community population. *Eur Heart J* 2003 Aug;24(16):1494-1499.
- (130) Sawczenko A, Azooz O, Paraszczuk J, Idestrom M, Croft NM, Savage MO, et al. Intestinal inflammation-induced growth retardation acts through IL-6 in rats and depends on the -174 IL-6 G/C polymorphism in children. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Sep 13;102(37):13260-13265.
- (131) Wernstedt I, Eriksson AL, Berndtsson A, Hoffstedt J, Skrtic S, Hedner T, et al. A common polymorphism in the interleukin-6 gene promoter is associated with overweight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004 Oct;28(10):1272-1279.
- (132) Hamid YH, Rose CS, Urhammer SA, Glumer C, Nolsoe R, Kristiansen OP, et al. Variations of the interleukin-6 promoter are associated with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. *Diabetologia* 2005 Feb;48(2):251-260.
- (133) Weger M, Steinbrugger I, Haas A, Marz W, El-Shabrawi Y, Weger W, et al. Role of the interleukin-6 -174 G>C gene polymorphism in retinal artery occlusion. *Stroke* 2005 Feb;36(2):249-252.
- (134) McKenzie JA, Weiss EP, Ghiu IA, Kulaputana O, Phares DA, Ferrell RE, et al. Influence of the interleukin-6 -174 G/C gene polymorphism on exercise training-induced changes in glucose tolerance indexes. *J Appl Physiol* (1985) 2004 Oct;97(4):1338-1342.
- (135) Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Duboeuf F, Jeffery R, Woo P, et al. Association between a functional interleukin-6 gene polymorphism and peak bone mineral density and postmenopausal bone loss in women: the OFELY study. *Bone*

- 2002 Jul;31(1):43-50.
- (136) Lafage-Pochitaloff M, Herman P, Birg F, Galizzi JP, Simonetti J, Mannoni P, et al. Localization of the human CD40 gene to chromosome 20, bands q12-q13.2. *Leukemia* 1994 Jul;8(7):1172-1175.
- (137) Yang J, Qin Q, Yan N, Zhu YF, Li C, Yang XJ, et al. CD40 C/T(-1) and CTLA-4 A/G(49) SNPs are associated with autoimmune thyroid diseases in the Chinese population. *Endocrine* 2012 Feb;41(1):111-115.
- (138) Inoue N, Watanabe M, Yamada H, Takemura K, Hayashi F, Yamakawa N, et al. Associations between autoimmune thyroid disease prognosis and functional polymorphisms of susceptibility genes, CTLA4, PTPN22, CD40, FCRL3, and ZFAT, previously revealed in genome-wide association studies. *J Clin Immunol* 2012 Dec;32(6):1243-1252.
- (139) Tomer Y, Concepcion E, Greenberg DA. A C/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. *Thyroid* 2002 Dec;12(12):1129-1135.
- (140) 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 Jun;146(6):2684-2691.
- (141) Tomer Y, Davies TF, Greenberg DA. What is the contribution of a Kozak SNP in the CD40 gene to Graves' disease? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005 Feb;62(2):258.
- (142) Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Tomita M, Ban Y. Association of a C/T single-nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of the CD40 gene with Graves' disease in Japanese. *Thyroid* 2006 May;16(5):443-446.
- (143) Kim TY, Park YJ, Hwang JK, Song JY, Park KS, Cho BY, et al. A C/T polymorphism in the 5'-untranslated region of the CD40 gene is associated with Graves' disease in Koreans. *Thyroid* 2003 Oct;13(10):919-925.
- (144) Kurylowicz A, Kula D, Ploski R, Skorka A, Jurecka-Lubieniecka B, Zebracka J, et al. Association of CD40 gene polymorphism (C-1T) with susceptibility and phenotype of Graves' disease. *Thyroid* 2005 Oct;15(10):1119-1124.
- (145) Li M, Sun H, Liu S, Yu J, Li Q, Liu P, et al. CD40 C/T-1 polymorphism plays different roles in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. *Endocr J* 2012;59(12):1041-1050.
- (146) 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. *J Autoimmun* 2007 Mar-May;28(2-3):85-98.

- (147) Wagner M, Wisniewski A, Bilinska M, Pokryszko-Dragan A, Cyrul M, Kusnierczyk P, et al. Investigation of gene-gene interactions between CD40 and CD40L in Polish multiple sclerosis patients. *Hum Immunol* 2014 Aug;75(8):796-801.
- (148) Liu Y, Liang WB, Gao LB, Wang YY, Zhang L. Association of CD40 -1C/T polymorphism in the 5'-untranslated region and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chim Acta* 2009 Oct;408(1-2):56-59.
- (149) Chen F, Hou S, Jiang Z, Chen Y, Kijlstra A, Rosenbaum JT, et al. CD40 gene polymorphisms confer risk of Behcet's disease but not of Vogt-Koyanagi-Harada syndrome in a Han Chinese population. *Rheumatology (Oxford)* 2012 Jan;51(1):47-51.
- (150) Shuang C, Dalin L, Weiguang Y, Zhenkun F, Fengyan X, Da P, et al. Association of CD40 gene polymorphisms with sporadic breast cancer in Chinese Han women of Northeast China. *PLoS One* 2011;6(8):e23762.
- (151) Pineda B, Laporta P, Hermenegildo C, Cano A, Garcia-Perez MA. A C >T polymorphism located at position -1 of the Kozak sequence of CD40 gene is associated with low bone mass in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2008 Aug;19(8):1147-1152.
- (152) Orozco G, Eyre S, Hinks A, Ke X, Wellcome Trust Case Control consortium YEAR Consortium, Wilson AG, et al. Association of CD40 with rheumatoid arthritis confirmed in a large UK case-control study. *Ann Rheum Dis* 2010 May;69(5):813-816.
- (153) Sokolova EA, Malkova NA, Korobko DS, Rozhdestvenskii AS, Kakulya AV, Khanokh EV, et al. Association of SNPs of CD40 gene with multiple sclerosis in Russians. *PLoS One* 2013 Apr 22;8(4):e61032.
- (154) Ma Y, Wang SX, Liu Y, Peng GG, Wang XM, Zhang B, et al. Single nucleotide polymorphism of CD40 in the 5'-untranslated region is associated with ischemic stroke. *Gene* 2013 Oct 25;529(2):257-261.
- (155) Zhang B, Wu T, Song C, Chen M, Li H, Guo R. Association of CD40--1C/T polymorphism with cerebral infarction susceptibility and its effect on sCD40L in Chinese population. *Int Immunopharmacol* 2013 Aug;16(4):461-465.
- (156) Wang M, Li Y, Li W, Xia ZE, Wu Q. The CD40 gene polymorphism rs1883832 is associated with risk of acute coronary syndrome in a Chinese case-control study. *DNA Cell Biol* 2011 Mar;30(3):173-178.
- (157) Tian C, Qin W, Li L, Zheng W, Qiu F. A common polymorphism in CD40 Kozak sequence (-1C/T) is associated with acute coronary syndrome. *Biomed Pharmacother* 2010 Mar;64(3):191-194.

- (158) Tian CX, Li Y, Wang M, Xia ZE, Li XY, Huang CX. Association between inflammatory cytokine CD40 gene polymorphism and risk of acute coronary syndrome. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2008 Mar;36(3):199-204.
- (159) Cheng SC, Cheng YY, Wu JL. Association between gene polymorphism of CD40 gene and coronary artery lesion in Kawasaki disease. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2014 Oct;16(10):1025-1028.
- (160) Kuo HC, Chao MC, Hsu YW, Lin YC, Huang YH, Yu HR, et al. CD40 Gene polymorphisms associated with susceptibility and coronary artery lesions of Kawasaki disease in the Taiwanese population. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:520865.
- (161) Joo YB, Park BL, Shin HD, Park SY, Kim I, Bae SC. Association of genetic polymorphisms in CD40 with susceptibility to SLE in the Korean population. *Rheumatology (Oxford)* 2013 Apr;52(4):623-630.
- (162) Vazgiourakis VM, Zervou MI, Choulaki C, Bertias G, Melissourgaki M, Yilmaz N, et al. A common SNP in the CD40 region is associated with systemic lupus erythematosus and correlates with altered CD40 expression: implications for the pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 2011 Dec;70(12):2184-2190.
- (163) Gross MB. Personal communication. Baltimore, Md. 2/13/2015.
- (164) Usategui-Martin R, Garcia-Aparicio J, Corral-Gudino L, Calero-Paniagua I, Del Pino-Montes J, Gonzalez Sarmiento R. Polymorphisms in autophagy genes are associated with paget disease of bone. *PLoS One* 2015 Jun 1;10(6):e0128984.
- (165) Songane M, Kleinnijenhuis J, Alisjahbana B, Sahiratmadja E, Parwati I, Oosting M, et al. Polymorphisms in autophagy genes and susceptibility to tuberculosis. *PLoS One* 2012;7(8):e41618.
- (166) Schmeiser K, Armstrong S, Hammond EM, Grand RJ. Assignment of the yeast APG5 human homologue APG5L to chromosome band 6q21 by fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet* 1999;87(3-4):213-214.
- (167) Plantinga TS, van de Vosse E, Huijbers A, Netea MG, Joosten LAB, Smit JWA, et al. Role of Genetic Variants of Autophagy Genes in Susceptibility for Non-Medullary Thyroid Cancer and Patients Outcome. *PLoS One* 2014 Apr 16;9(4):. doi:10.1371/journal.pone.0094086.
- (168) International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN), Harley JB, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXXK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* 2008 Feb;40(2):204-210.
- (169) Zhou XJ, Lu XL, Lv JC, Yang HZ, Qin LX, Zhao MH, et al. Genetic association

- of PRDM1-ATG5 intergenic region and autophagy with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Ann Rheum Dis* 2011 Jul;70(7):1330-1337.
- (170) Orozco G, Eyre S, Hinks A, Bowes J, Morgan AW, Wilson AG, et al. Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2011 Mar;70(3):463-468.
- (171) Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, et al. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2009 Nov;41(11):1228-1233.
- (172) Cai PP, Wang HX, Zhuang JC, Liu QB, Zhao GX, Li ZX, et al. Variants of autophagy-related gene 5 are associated with neuromyelitis optica in the Southern Han Chinese population. *Autoimmunity* 2014 Dec;47(8):563-566.
- (173) Martin LJ, Gupta J, Jyothula SS, Butsch Kovacic M, Biagini Myers JM, Patterson TL, et al. Functional variant in the autophagy-related 5 gene promoter is associated with childhood asthma. *PLoS One* 2012;7(4):e33454.
- (174) Lu XL, Zhou XJ, Guo JP, Jia RL, Zhao Y, Jiang Q, et al. Rs548234 polymorphism at PRDM1-ATG5 region susceptible to rheumatoid arthritis in Caucasians is not associated with rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *Chin Med J (Engl)* 2011 Sep;124(18):2863-2867.
- (175) International Radiation Hybrid Mapping Consortium.
- (176) Qin Z, Xue J, He Y, Ma H, Jin G, Chen J, et al. Potentially functional polymorphisms in ATG10 are associated with risk of breast cancer in a Chinese population. *Gene* 2013 Sep 25;527(2):491-495.
- (177) Zheng H, Ji C, Li J, Jiang H, Ren M, Lu Q, et al. Cloning and analysis of human Apg16L. *DNA Seq* 2004 Aug;15(4):303-305.
- (178) Messer JS, Murphy SF, Logsdon MF, Lodolce JP, Grimm WA, Bartulis SJ, et al. The Crohn's disease: associated ATG16L1 variant and Salmonella invasion. *BMJ Open* 2013 Jun 20;3(6):10.1136/bmjopen-2013-002790.
- (179) Huijbers A, Plantinga TS, Joosten LA, Aben KK, Gudmundsson J, den Heijer M, et al. The effect of the ATG16L1 Thr300Ala polymorphism on susceptibility and outcome of patients with epithelial cell-derived thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2012 May 3;19(3):L15-8.
- (180) Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007 Feb;39(2):207-211.

BIBLIOGRAFÍA

- (181) Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007 Jun 7;447(7145):661-678.
- (182) Lacher M, Schroeppf S, Ballauff A, Lohse P, von Schweinitz D, Kappler R, et al. Autophagy 16-like 1 rs2241880 G allele is associated with Crohn's disease in German children. *Acta Paediatr* 2009 Nov;98(11):1835-1840.
- (183) Plantinga TS, Crisan TO, Oosting M, van de Veerdonk FL, de Jong DJ, Philpott DJ, et al. Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2. *Gut* 2011 Sep;60(9):1229-1235.
- (184) Umeno J, Asano K, Matsushita T, Matsumoto T, Kiyohara Y, Iida M, et al. Meta-analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2011 Dec;17(12):2407-2415.
- (185) Nicoli ER, Dumitrescu T, Uscatu CD, Popescu FD, Streata I, Serban Sosoi S, et al. Determination of autophagy gene ATG16L1 polymorphism in human colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2014;55(1):57-62.
- (186) Raju D, Hussey S, Jones NL. Crohn disease ATG16L1 polymorphism increases susceptibility to infection with *Helicobacter pylori* in humans. *Autophagy* 2012 Sep;8(9):1387-1388.
- (187) Chatzikiyriakidou A, Voulgari PV, Drosos AA. Lack of association of the autophagy-related gene polymorphism ATG16L1 rs2241880 in RA predisposition. *Rheumatol Int* 2014 Apr;34(4):477-479.
- (188) Douroudis K, Kingo K, Traks T, Reimann E, Raud K, Ratsep R, et al. Polymorphisms in the ATG16L1 gene are associated with psoriasis vulgaris. *Acta Derm Venereol* 2012 Jan;92(1):85-87.
- (189) Douroudis K, Kingo K, Traks T, Ratsep R, Silm H, Vasar E, et al. ATG16L1 gene polymorphisms are associated with palmoplantar pustulosis. *Hum Immunol* 2011 Jul;72(7):613-615.
- (190) Gonzalez Villaron L, Dominguez Moronta F, de Castro del Pozo S. Endemic goiter in the province of Salamanca. I. Geographic distribution and degree of incidence. *Rev Clin Esp* 1975 Feb 15;136(3):227-233.
- (191) Sambrook.
Molecular cloning: a laboratory manual New York; 1989.
- (192) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993 Sep;11(9):1026-1030.

-
- (193) Costa J. Real-time PCR. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004 May;22(5):299-304; quiz 305.
- (194) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Aug 15;88(16):7276-7280.
- (195) Iniesta R, Guino E, Moreno V. Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gac Sanit* 2005 Jul-Aug;19(4):333-341.
- (196) Arrizabalaga JJ, Jalon M, Espada M, Canas M, Latorre PM. Iodine concentration in ultra-high temperature pasteurized cow's milk. Applications in clinical practice and in community nutrition. *Med Clin (Barc)* 2015 Jul 20;145(2):55-61.
- (197) World Health Organization, UNICEF, International Council for Control Iodine Deficiency Disorders. Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. A guide for programme managers. 2007.
- (198) Soriguer F, Garcia-Fuentes E, Gutierrez-Repiso C, Rojo-Martinez G, Velasco I, Goday A, et al. Iodine intake in the adult population. Di@bet.es study. *Clin Nutr* 2012 Dec;31(6):882-888.
- (199) Vila L. Prevention and control of iodine deficiencies in Spain. *Rev Esp Salud Publica* 2008 Jul-Aug;82(4):371-377.
- (200) Díaz Cadórniga FJ, Delgado Álvarez E. Déficit de yodo en España: Situación actual. *Endocrinología y Nutrición* 2004;51(1):2-13.
- (201) Brent L, Cohen IR, Doherty PC, Feldmann M, Matzinger P, Ghost L, et al. Crystal-ball gazing--the future of immunological research viewed from the cutting edge. *Clin Exp Immunol* 2007 Jan;147(1):1-10.
- (202) Chen CR, Hamidi S, Braley-Mullen H, Nagayama Y, Bresee C, Aliesky HA, et al. Antibodies to thyroid peroxidase arise spontaneously with age in NOD.H-2h4 mice and appear after thyroglobulin antibodies. *Endocrinology* 2010 Sep;151(9):4583-4593.
- (203) Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F, et al. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995 Jul;43(1):55-68.
- (204) Akira S, Nishio Y, Tanaka T, Inoue M, Matsusaka T, Wang XJ, et al. Transcription factors NF-IL6 and APRF involved in gp130-mediated signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1995 Jul 21;762:15-27; discussion 27-8.
- (205) Jacobson EM, Huber AK, Akeno N, Sivak M, Li CW, Concepcion E, et al. A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated

BIBLIOGRAFÍA

- autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression. *Genes Immun* 2007 Apr;8(3):205-214.
- (206) Velikkakath AK, Nishimura T, Oita E, Ishihara N, Mizushima N. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell* 2012 Mar;23(5):896-909.
- (207) Jones SA, Mills KH, Harris J. Autophagy and inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol* 2013 Mar;91(3):250-258.
- (208) Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:139-176.
- (209) Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 2008 Sep 18;455(7211):396-400.
- (210) Ajjan RA, Weetman AP. Cytokines in thyroid autoimmunity. *Autoimmunity* 2003 Sep-Nov;36(6-7):351-359.
- (211) Mikos H, Mikos M, Obara-Moszyńska M, Niedziela M. The role of the immune system and cytokines involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD). *Endokrynol Pol* 2014;65(2):150-155.
- (212) Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 2008 Nov 13;456(7219):264-268.

ANEXOS

Anexo 1: Datos de los pacientes con tiroiditis autoinmune en nuestro estudio. N°: número de identificación en el estudio. Edad: edad al diagnóstico. IL1B, IL4, IL6, CD40, ATG2B, ATG5, ATG10 y ATG 16L1: genotipo de cada uno de los polimorfismos

N°	Edad	IL 2B	IL4	IL6	CD40	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
1	72	AG	CC	GG	CT	CC	CG	CC	AG
2	46	GG	CC	CG	CT	CG	CG	CC	AG
3	30	GG	CT	CG	CT	CG	CC	CT	AG
4	30	GG	CT	CC	CT	CG	CG	CT	AG
5	71	AG	CT	CG	CC	GG	CG	TT	GG
6	58	GG	CC	CG	CT	GG	CC	TT	AA
7	45	GG	CT	CC	CT	CG	CC	CC	AG
8	75	GG	CC	GG	CC	CG	CC	CT	AG
9	61	GG	CC	CG	CT	CG	CG	CT	AG
10	39	AG	CT	CG	CC	CC	CC	TT	GG
11	41	GG	CC	GG	CC	CG	CG	CC	AA
12	35	GG	CC	GG	CC	CG	CC	CT	AG
13	35	GG	CC	CG	CT	CG	CG	TT	GG
14	29	AA	CT	GG	CC	GG	CG	CC	AG
15	47	AG	CC	GG	CC	CG	CG	CT	AG
16	62	GG	CT	CG	CT	CG	CC	CT	GG
17	34	GG	CT	CG	CC	GG	CG	CT	AG
18	56	GG	CT	GG	CC	CG	CG	CC	AG
19	34	AA	CC	GG	CC	GG	CG	CT	AG
20	36	AA	CC	CC	CC	CG	GG	CT	AG
21	40	AA	CC	CG	TT	GG	CG	CT	AG
22	32	AG	CC	GG	CT	CG	CC	CC	AG
23	29	AG	CC	CG	CT	GG	CC	CT	AG
24	33	GG	CC	CG	CC	CG	CG	CC	GG
25	24	GG	CT	GG	CT	GG	CG	CC	AG
26	60	GG	TT	CG	CT	CG	CC	CC	AA
27	36	GG	CT	GG	CC	CG	CC	TT	AA
28	58	GG	CT	GG	CC	CG	CC	CC	AG
29	29	GG	CC	CG	CC	GG	CG	TT	AA
30	36	AG	CC	GG	CC	CG	CC	TT	AG
31	34	AA	CT	GG	CC	CG	CC	CT	GG
32	74	AG	CT	CG	CC	GG	CG	CT	AG
33	37	AG	CT	GG	CT	CG	GG	TT	GG
34	63	GG	CC	CG	CC	CG	CG	CT	GG
35	48	GG	CC	CG	TT	CG	CG	CC	AG
36	35	GG	CC	CG	CT	CG	CC	CC	AG
37	30	GG	CC	CC	CT	CG	CC	CT	AA
38	42	AG	CC	CG	CC	CC	CG	CC	AG
39	37	AA	CC	GG	CT	GG	GG	CT	AG
40	47	GG	CC	GG	CT	GG	CG	TT	AG
41	27	AG	CT	GG	CC	GG	CG	TT	AA

ANEXOS

Nº	Edad	IL 2B	IL4	IL6	CD40	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
42	27	GG	CT	GG	CT	CG	CC	CT	AG
43	36	AG	CC	CG	TT	CG	CC	CC	GG
44	29	AG	CT	CG	CC	CG	CC	CT	AG
45	27	AG	CC	GG	CC	CC	CC	CC	AG
46	41	AG	CC	GG	CC	GG	CC	CT	GG
47	49	AG	CC	GG	CC	CG	CC	TT	AA
48	49	AG	CC	CG	CT	GG	CG	TT	AA
49	32	GG	TT	GG	CC	CG	CG	CT	AG
50	29	GG	CC	CG	TT	CG	CC	CT	AG
51	34	AA	CC	GG	TT	CG	GG	CC	GG
52	49	GG	CT	CG	CT	CG	CG	CT	AA
53	49	AG	CC	CG	TT	CG	CG	TT	AG
54	38	GG	CC	CG	CC	GG	CG	CC	AG
55	19	GG	CC	GG	CC	GG	CG	TT	GG
56	50	AG	TT	GG	CT	GG	CG	CC	GG
57	47	GG	CT	CG	CT	CG	CC	CT	AG
58	33	AG	TT	GG	CT	GG	CG	TT	GG
59	58	GG	CC	CG	CT	CC	GG	CC	GG
60	37	AG	CC	CG	CT	GG	CC	CT	AA
61	19	AA	CC	CG	CT	GG	CG	CT	AG
62	34	AA	CC	CG	CC	CG	CG	CT	GG
63	39	AG	CT	CG	CC	CC	CG	CT	AA
64	43	GG	CT	GG	CC	GG	CC	TT	AA
65	30	AG	CT	GG	CT	CG	CC	CC	AA
66	71	AG	CC	GG	CC	GG	CG	CT	AG
67	26	GG	CC	GG	TT	CG	CG	CC	GG
68	43	AG	CT	GG	CT	CC	CG	CC	AG
69	41	AG	CC	CG	CC	CG	CC	CT	AG
70	71	GG	CC	CG	CC	CG	CG	CT	AG
71	25	GG	CT	CG	CC	CG	CC	CC	GG
72	27	AG	CC	CC	CT	CG	GG	TT	AG
73	52	GG	CC	CG	CT	GG	CG	CT	AG
74	54	GG	CT	CG	CT	GG	CC	CT	AG
75	38	AG	CC	GG	CC	GG	CG	TT	AG
76	66	AG	CT	CG	CC	CG	CG	CT	AA
77	36	AG	CC	CC	TT	GG	GG	TT	GG
78	24	AA	CC	GG	CC	GG	GG	TT	AA
79	49	GG	CC	GG	TT	GG	CG	CT	GG
80	44	GG	CC	CC	CT	GG	CG	CT	AG
81	21	AG	CC	GG	CT	GG	CG	CC	GG
82	51	GG	CC	GG	CC	GG	CC	CC	AG
83	42	GG	CT	CG	CC	GG	CC	TT	AA
84	45	AG	CC	CG	CC	CG	CG	CT	GG
85	47	AG	CT	CC	CT	CC	CG	CC	AG

Nº	Edad	IL 2B	IL4	IL6	CD40	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
86	41	AG	CC	CG	CC	CG	CC	CT	GG
87	46	AG	CC	CC	CC	CG	GG	TT	AA
88	30	AG	CC	CG	TT	GG	GG	CC	GG
89	57	GG	CC	CG	TT	CG	CG	TT	AG
90	75	GG	CC	CG	CT	GG	CG	CC	AA
91	30	AG	CC	CG	CC	CG	CG	TT	AG
92	58	AA	CT	GG	TT	GG	CC	CC	GG
93	42	AA	CT	GG	CC	CG	CG	CT	AG
94	33	AG	CC	GG	CC	GG	GG	CC	GG
95	31	GG	CT	GG	CT	CG	CC	TT	AA
96	65	GG	CC	GG	CT	GG	CG	CC	AG
97	37	AA	CC	CG	CC	GG	CG	CT	GG
98	37	GG	CC	GG	CC	CG	CC	TT	AG
99	52	GG	TT	CG	CC	CC	CG	CT	AG
100	49	GG	CC	CG	CC	CG	CC	CT	AG
101	50	AG	CC	GG	CC	CG	CC	CT	AA
102	39	GG	CC	GG	CC	GG	CC	CT	AG
103	26	GG	CC	CG	CC	GG	GG	CC	GG
104	33	GG	CC	GG	CT	GG	CG	CC	GG
105	25	AG	CC	GG	CT	GG	CG	CC	AG
106	62	AA	CC	CG	CT	GG	CC	CC	AG
107	34	GG	CC	CG	CC	CG	CC	TT	AG
108	54	GG	CC	GG	CC	CG	CC	CC	GG
109	29	GG	CC	CG	CC	GG	GG	CT	AG
110	55	AA	CT	CC	CC	GG	CC	CT	AA
111	24	AG	CC	GG	CC	GG	CC	CT	AA
112	58	GG	CC	CG	CC	GG	CG	CT	AG
113	36	GG	CC	CG	CC	CG	CG	CC	AG
114	20	GG	CT	CG	CT	CG	CC	CC	AG
115	79	GG	CT	GG	CT	CG	CC	CT	AA
116	43	AG	CC	GG	CT	GG	CC	CT	AG
117	67	AG	CC	GG	CC	GG	CC	TT	AG
118	24	GG	CC	CG	CT	GG	GG	CT	GG
119	38	GG	CT	GG	CT	CC	CG	CT	AA
120	42	AG	CC	GG	CC	CG	CC	CT	AA
121	34	GG	CT	CC	CC	CG	CG	CT	AG
122	41	AA	CT	CC	TT	CG	CG	CT	AA
123	52	AG	CC	CG	CT	CG	GG	CC	AG
124	66	AG	CC	CG	CT	GG	CG	CC	AG
125	57	GG	CC	CG	CT	CG	CC	CC	AG
126	55	GG	CC	CG	CC	CC	CG	CC	AG
127	44	AA	CC	GG	CT	GG	CG	CT	GG
128	45	GG	CT	CG	CC	CG	GG	CC	AA
129	42	AG	CC	CG	CC	CG	CG	CT	GG

ANEXOS

Nº	Edad	IL 2B	IL4	IL6	CD40	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
130	33	AG	CC	CC	CT	CG	CG	TT	AG
131	41	GG	CC	CG	CC	CG	CC	CT	AG
132	37	GG	CC	CC	CC	GG	CC	CT	AG
133	49	GG	CT	CG	CC	CG	CC	CC	AG
134	51	AG	CC	CC	CC	CG	CC	CT	AG
135	66	GG	CC	CG	CT	GG	CC	CT	AG
136	29	GG	CC	CG	CC	CG	CG	CT	GG
137	41	AG	CC	GG	CT	GG	CC	CT	AA
138	44	AG	CC	CG	CT	CC	CC	TT	AA
139	39	GG	CC	CG	CT	CG	GG	CC	AA
140	25	GG	CC	CC	CC	CC	CC	CT	GG
141	30	AG	CC	CC	CT	GG	CC	CT	AG
142	31	AG	CC	CC	CT	CG	CC	CC	GG
143	32	GG	CC	CC	CT	GG	CC	CC	AA
144	72	GG	CT	CC	CC	CG	GG	CT	AG
145	54	GG	CC	CG	CT	GG	CC	TT	GG
146	43	AG	CC	CG	CT	CG	GG	TT	AG
147	42	AG	CC	CG	CC	CG	CC	TT	AG
148	24	GG	CT	GG	CT	GG	CC	CT	AG
149	45	GG	CC	CC	CT	CG	CG	CT	AG
150	63	AA	TT	GG	CT	GG	CC	CT	AG
151	30	AG	CT	CC	CC	CG	GG	CC	AA
152	57	AG	CC	CC	CC	GG	CG	CC	AG
153	45	AG	CC	CG	CC	CG	CC	CT	AG
154	55	AA	CC	CC	CC	GG	CC	CT	GG
155	48	GG	CC	CG	CC	CG	CG	CT	GG
156	38	AG	CC	CC	CT	GG	CG	CT	AG
157	45	AG	CC	CC	TT	GG	CC	TT	GG
158	26	GG	CC	GG	CC	CG	CC	CT	AG
159	44	AG	CC	CG	TT	CG	GG	TT	AA
160	37	AA	CC	CC	CT	CG	CC	CT	AG
161	30	GG	CT	CC	CC	CG	CG	CC	AG
162	37	AG	CC	CG	CT	CG	CC	CC	AA
163	56	AG	CC	CC	TT	CG	CG	TT	AA
164	31	GG	CT	GG	CT	GG	CG	CT	GG
165	65	GG	CC	CG	CC	CC	CG	CT	AG
166	57	AG	CC	CC	CC	CG	CG	CC	AA
167	44	AA	CC	CC	CC	CG	CG	CT	GG
168	41	GG	CC	GG	CC	CG	CC	CC	AA
169	33	AG	CC	CG	CT	GG	CC	CT	AG
170	36	GG	CC	CG	CT	CC	CG	CT	AA
171	38	AA	CT	CG	CC	CG	CC	CT	AG
172	46	AG	CT	GG	CC	CG	CG	CT	AG
173	59	AG	CC	CC	CT	CG	CG	CC	GG

Nº	Edad	IL 2B	IL4	IL6	CD40	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
174	69	AG	CC	CC	TT	GG	GG	CT	AG
175	42	GG	TT	CG	CT	GG	GG	CC	AA
176	59	AG	CC	CC	CC	CG	CC	CT	AG
177	58	AA	CC	CC	CC	GG	CG	CC	AG
178	37	AA	CC	CC	CC	CG	GG	CC	AG
179	32	GG	CC	CG	CT	CG	CG	CT	GG
180	61	GG	CC	CC	TT	GG	GG	CT	AG
181	39	AA	CT	GG	CT	CG	CG	CT	GG
182	40	GG	CT	CG	CT	GG	CG	CC	AG
183	59	GG	CC	CC	CC	CG	CC	CT	GG
184	37	AA	CC	CG	CT	GG	CC	CC	GG
185	24	GG	CC	CG	CT	CC	GG	CT	AG
186	30	AG	CT	CG	CC	CG	CC	CT	AG
187	38	AG	CC	CC	CT	GG	CG	CC	AA
188	38	GG	CC	CC	CT	CG	CC	CC	AA
189	48	GG	CC	CG	CC	CG	CC	CT	AG
190	42	AG	CC	CC	CC	CG	GG	CT	AA
191	52	GG	CT	CC	CC	CG	CC	CT	GG
192	26	AG	CC	CG	CT	GG	CG	CT	AG
193	50	GG	CC	CC	CT	CG	CG	CT	GG
194	36	GG	CC	CG	CC	GG	CG	TT	AG
195	39	AG	CT	CG	CT	CG	GG	CT	AA
196	46	AG	CC	GG	CC	CG	CC	CT	AA
197	33	AG	CC	CC	CT	CG	CG	TT	GG
198	72	AG	CT	CC	CT	CG	CC	CT	AA
199	56	GG	CC	GG	CC	GG	CC	CC	AA
200	24	GG	CC	CC	CC	CG	CG	CC	GG

Anexo 2: Datos de los controles para IL1B en nuestro estudio. Nº: número de identificación en el estudio. Edad: Edad en el momento de toma de la muestra. IL1B: genotipo del polimorfismo

Nº	Edad	IL1B
201	53	AG
202	40	GG
203	59	AG
204	58	GG
205	56	GG
206	56	GG
207	27	GG
208	33	AA
209	47	GG
210	57	AA
211	54	AG
212	53	GG

Nº	Edad	ILIB
213	43	GG
214	35	GG
215	65	AG
216	48	AG
217	48	GG
218	48	AG
219	62	AA
220	63	AA
221	58	AG
222	41	AG
223	52	AA
224	28	AA
225	24	AG
226	27	GG
227	21	AA
228	37	GG
229	78	AA
230	59	AG
231	55	GG
232	38	GG
233	46	AG
234	46	AG
235	43	GG
236	45	AG
237	41	GG
238	49	GG
239	58	GG
240	57	GG
241	61	AG
242	51	AA
243	62	GG
244	62	AG
245	53	AG
246	47	AA
247	50	GG
248	34	GG
249	62	GG
250	44	AG
251	41	GG
252	46	GG
253	50	AG
254	47	GG
255	38	AA
256	63	AG

Nº	Edad	IL1B
257	34	AG
258	60	GG
259	32	GG
260	44	AG
261	35	AA
262	48	GG
263	39	GG
264	59	AG
265	61	AA
266	60	GG
267	62	AG
268	54	GG
269	48	AG
270	35	AG
271	47	GG
272	37	AG
273	38	AG
274	44	AG
275	47	GG
276	50	GG
277	50	AA
278	38	AG
279	40	AG
280	48	AG
281	41	GG
282	59	AA
283	39	GG
284	51	AG
285	55	GG
286	39	AA
287	25	AG
288	44	GG
289	35	AA
290	30	GG
291	64	AG
292	33	AG
293	19	GG
294	52	AG
295	52	AG
296	62	AA
297	40	GG
298	36	GG
299	38	AG
300	49	GG

Nº	Edad	ILIB
301	40	AG
302	63	AG
303	24	GG
304	64	AG
305	47	AG
306	68	GG
307	54	AA
308	55	AG
309	65	AG
310	45	GG
311	80	GG
312	77	GG
313	74	AG
314	42	AG
315	52	GG
316	21	AG
317	81	GG
318	80	AA
319	73	GG
320	27	GG
321	78	GG
322	78	AG
323	54	GG
324	56	GG
325	53	AA
326	55	AA
327	49	GG
328	54	AG
329	77	GG
330	56	GG
331	51	AG
332	29	GG
333	46	AG
334	50	AA
335	51	GG
336	54	AG
337	47	AG
338	51	AG
339	50	AG
340	60	GG
341	55	AA
342	65	AG
343	51	GG
344	32	AG

Nº	Edad	IL1B
345	64	AG
346	59	GG
347	57	AG
348	58	GG
349	60	AG
350	60	GG
351	53	AG
352	49	AG
353	43	GG
354	46	AG
355	44	GG
356	57	GG
357	61	AA
358	41	AG
359	59	AA
360	65	AA
361	29	AG
362	51	AG
363	36	GG
364	64	GG
365	51	GG
366	70	GG
367	53	GG
368	45	GG
369	35	AG
370	39	AG
371	37	AG
372	59	GG
373	55	GG
374	56	GG
375	50	AA
376	70	GG
377	60	GG
378	54	GG
379	56	AG
380	31	AG
381	47	AG
382	48	GG
383	46	AA
384	27	AA
385	45	AG
386	36	AA
387	46	AA
388	58	AG

Nº	Edad	ILIB
389	63	GG
390	57	AA
391	64	GG
392	48	GG
393	55	GG
394	65	GG
395	60	GG
396	57	GG
397	53	GG
398	44	GG
399	37	GG
400	42	AG
401	50	GG
402	61	GG
403	45	GG
404	58	GG
405	46	AA
406	48	AG
407	53	AG
408	37	GG
409	46	GG
410	26	GG
411	40	AG
412	44	GG
413	39	AA
414	59	AG
415	37	AG
416	26	GG
417	58	AG
418	25	GG
419	46	AG
420	59	AA
421	49	AG
422	43	AG
423	55	AG
424	44	GG
425	46	AG
426	46	GG
427	63	AG
428	54	AA
429	38	AG
430	52	AG
431	50	AG
432	29	AA

Nº	Edad	IL1B
433	31	AG
434	42	AG
435	27	AG
436	37	AG
437	44	AA
438	49	GG
439	37	GG
440	36	AG

Anexo 3: Datos de los controles para IL4 y CD40 en nuestro estudio. Nº: número de identificación en el estudio. Edad: Edad en el momento de toma de la muestra. IL4 y CD40: genotipo de cada uno de los polimorfismos

Nº	Edad	IL4	CD40
441	20	CT	CT
442	21	CC	CT
443	64	CC	CT
444	60	TT	CT
445	15	CT	CT
446	65	CT	CT
447	77	CT	CC
448	39	CC	CC
449	50	CT	CT
450	36	CC	CC
451	22	CT	CC
452	23	CC	CC
453	72	CC	CC
454	45	CT	CC
455	62	CC	CT
456	21	CC	CC
457	75	CC	TT
458	79	CC	CC
459	53	CC	CT
460	19	CC	CT
461	60	CT	CT
462	37	CC	CC
463	70	CC	CT
464	59	CC	CC
465	24	CC	TT
466	18	CC	CC
467	27	CC	CT
468	60	CC	CT
469	23	CC	CC
470	71	CC	CT

ANEXOS

Nº	Edad	IL4	CD40
471	22	CC	CC
472	15	CC	CC
473	43	CC	CC
474	49	CC	CT
475	14	CC	CC
476	37	CT	CT
477	62	CT	CT
478	53	CC	TT
479	40	CC	CC
480	59	TT	CC
481	58	CT	CC
482	56	CT	CT
483	56	CC	CT
484	27	CT	TT
485	33	TT	CT
486	47	CC	CT
487	57	CC	TT
488	54	CC	CC
489	53	CC	CC
490	43	CC	CC
491	35	CC	CT
492	65	CC	CT
493	48	CT	CC
494	48	CT	CT
495	48	CC	CC
496	62	CT	CC
497	63	CC	CT
498	58	CC	TT
499	41	CT	CC
500	52	CC	CT
501	28	CT	CC
502	24	CC	CC
503	27	CC	CT
504	21	CC	CT
505	37	CC	CT
506	78	CC	TT
507	59	CT	CT
508	55	CC	CT
509	38	CC	CC
510	46	CC	CT
511	46	CC	CC
512	43	CT	CC
513	45	CT	CC
514	41	CC	CC

N°	Edad	IL4	CD40
515	49	CC	CC
516	58	CT	CT
517	57	CC	CT
518	61	CC	CT
519	51	CC	CC
520	62	CC	CT
521	62	TT	CC
522	53	CC	CT
523	47	CC	CT
524	50	CC	CC
525	34	CC	CC
526	62	CC	CT
527	44	CC	CT
528	41	CC	CT
529	46	CT	CT
530	50	CC	CC
531	47	CT	CC
532	38	TT	CT
533	63	CC	CT
534	34	CC	CT
535	60	CC	CC
536	32	CT	CT
537	44	CC	CT
538	35	CC	CC
539	48	CC	CC
540	39	CC	CT
541	59	CC	CC
542	61	CC	CC
543	60	CC	CC
544	62	CC	CC
545	54	CT	CT
546	48	CC	CC
547	35	CC	CC
548	47	CC	CC
549	37	CC	CT
550	38	TT	TT
551	44	CC	CT
552	47	CC	TT
553	50	CC	CT
554	50	CT	CT
555	38	TT	CT
556	40	CC	CT
557	48	CT	CC
558	41	CC	CC

ANEXOS

Nº	Edad	IL4	CD40
559	59	CT	CT
560	39	CT	CC
561	51	CC	CT
562	55	CC	TT
563	39	CC	CC
564	25	CC	CC
565	44	CC	CT
566	35	CC	CT
567	30	CC	CC
568	64	CT	CC
569	33	CC	CC
570	19	CT	CC
571	52	CC	CT
572	52	CC	CT
573	62	CT	CC
574	40	CT	CC
575	36	CC	CT
576	38	CC	CT
577	49	CC	CT
578	40	CC	CT
579	63	CC	CC
580	24	CC	TT
581	82	CC	TT
582	64	CC	CC
583	47	CC	CC
584	83	CC	CT
585	68	CC	CC
586	54	CC	CC
587	55	CC	CT
588	65	CC	CC
589	45	CC	CC
590	80	CT	CT
591	77	CC	CC
592	74	CC	CT
593	42	CT	CC
594	52	CC	CT
595	21	CC	TT
596	82	CC	CT
597	86	CT	CC
598	81	CC	CT
599	80	CC	CT
600	73	CT	CC
601	89	CT	CC
602	91	CC	CC

Nº	Edad	IL4	CD40
603	27	CC	CT
604	78	CC	CC
605	78	CC	TT
606	85	CT	CT

Anexo 4: Datos de los controles para IL6 en nuestro estudio. Nº: número de identificación en el estudio. Edad: Edad en el momento de toma de la muestra. IL6: genotipo del polimorfismo

Nº	Edad	IL6
607	20	CG
608	21	GG
609	60	GG
610	15	CG
611	39	CC
612	50	GG
613	36	CC
614	22	GG
615	23	GG
616	45	GG
617	62	GG
618	21	GG
619	53	CG
620	19	CG
621	60	GG
622	37	CG
623	59	CG
624	24	GG
625	18	GG
626	27	CG
627	60	GG
628	23	GG
629	22	GG
630	15	CC
631	43	GG
632	49	GG
633	14	CG
634	37	CC
635	62	CG
636	53	CC
637	40	GG
638	59	CG
639	58	GG
640	56	CC
641	56	CG

Nº	Edad	IL6
642	27	CG
643	33	CG
644	47	CG
645	57	GG
646	54	CC
647	53	CG
648	43	CG
649	35	GG
650	48	CG
651	48	CG
652	48	GG
653	62	CG
654	58	CG
655	41	CC
656	52	CG
657	28	GG
658	24	CG
659	27	CG
660	21	CG
661	37	CG
662	59	GG
663	55	GG
664	38	GG
665	46	GG
666	46	CG
667	43	GG
668	45	GG
669	41	CG
670	49	GG
671	58	CG
672	57	CC
673	61	GG
674	51	GG
675	62	CG
676	62	GG
677	53	GG
678	47	GG
679	50	CG
680	34	GG
681	62	CG
682	44	CG
683	41	CC
684	46	CC
685	50	GG

Nº	Edad	IL6
686	47	CG
687	38	GG
688	34	CG
689	60	GG
690	32	GG
691	44	CG
692	35	GG
693	48	GG
694	39	CG
695	59	CG
696	61	CG
697	60	GG
698	62	CG
699	54	GG
700	48	GG
701	35	GG
702	47	CC
703	37	GG
704	38	CG
705	44	CG
706	47	CG
707	50	CG
708	50	GG
709	38	GG
710	40	GG
711	48	CG
712	41	GG
713	59	CG
714	39	CG
715	51	CG
716	55	CG
717	39	GG
718	25	CC
719	44	GG
720	35	GG
721	30	GG
722	33	GG
723	19	GG
724	52	CG
725	52	CC
726	40	GG
727	36	GG
728	38	GG
729	49	CC

Nº	Edad	IL6
730	40	GG
731	24	CG
732	47	GG
733	54	CG
734	55	GG
735	45	CG
736	42	CG
737	52	CG
738	21	GG
739	27	CG
740	54	GG
741	56	GG
742	53	CG
743	55	CC
744	49	CG
745	54	CG
746	56	CC
747	51	CG
748	29	CC
749	46	CC
750	50	CG
751	51	CG
752	54	CG
753	47	CC
754	51	CG
755	50	CG
756	60	GG
757	55	CG
758	51	CG
759	32	CG
760	59	CC
761	57	CC
762	58	GG
763	60	CC
764	60	CG
765	53	CC
766	49	CC
767	43	CG
768	46	CC
769	44	CC
770	57	CC
771	61	CG
772	41	CC
773	59	CC

Nº	Edad	IL6
774	29	CC
775	51	CG
776	36	CG
777	51	CC
778	53	CC
779	45	CC
780	35	GG
781	39	CC
782	37	CC
783	59	CG
784	55	CG
785	56	CG
786	50	CG
787	60	CG
788	54	CC
789	56	CG
790	31	CC
791	47	CG
792	48	CC
793	46	CC
794	27	CC
795	45	CG
796	36	CC
797	46	CG
798	58	CG
799	57	CC
800	48	CC
801	55	CG
802	60	CG
803	57	CG
804	53	CG
805	44	CG
806	37	CC
807	42	CG
808	50	CC
809	61	CC
810	45	CG
811	58	CG
812	46	CC
813	48	GG
814	53	GG
815	37	CG
816	46	CC
817	26	CC

Nº	Edad	IL6
818	40	GG
819	44	CC
820	39	CG
821	59	CG
822	37	CC
823	26	CC
824	58	CG
825	25	CG
826	46	CC
827	59	CG
828	49	CG
829	43	CC
830	55	CC
831	44	CG
832	46	CG
833	46	CC
834	54	GG
835	38	CC
836	52	CG
837	50	CG
838	29	CC
839	31	CC
840	42	CC
841	27	CC
842	37	CC
843	44	CC
844	49	CC
845	37	CC
846	36	CC

Anexo 5: Datos de los controles para ATG en nuestro estudio. Nº: número de identificación en el estudio. Edad: Edad en el momento de toma de la muestra. ATG2B, ATG5, ATG10, ATL 16 L1: genotipo de cada uno de los polimorfismos

Nº	Edad	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
847	54	CG	GG	CT	AG
848	56	GG	GG	TT	AA
849	53	CC	GG	CT	GG
850	55	CG	GG	CT	AG
851	49	CC	CG	CC	GG
852	54	CC	CG	CC	AG
853	77	CG	CG	TT	GG
854	56	GG	GG	CT	GG
855	51	CG	CG	TT	AG

Nº	Edad	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
856	29	GG	CC	TT	AG
857	46	GG	CG	TT	AA
858	50	CC	CC	TT	AG
859	51	GG	CG	TT	AA
860	54	CC	CG	CT	AG
861	47	CC	GG	CT	AG
862	51	CG	CG	CT	GG
863	50	CG	CG	CT	AA
864	60	CC	CG	TT	GG
865	55	CC	CG	CC	AG
866	65	CG	CG	TT	AG
867	51	CG	CG	CC	AA
868	32	CG	CG	CC	AA
869	64	CG	CG	CT	GG
870	59	CC	CG	CT	GG
871	57	CC	GG	CC	AG
872	58	CC	GG	CT	AG
873	60	CC	GG	CT	AG
874	60	CG	CG	CT	AG
875	53	CC	GG	CT	AG
876	49	CC	CG	CC	AG
877	43	CC	GG	TT	AG
878	46	CC	CG	CC	AG
879	44	CG	CC	CC	GG
880	57	CC	GG	CT	GG
881	61	GG	CC	TT	AG
882	41	CC	GG	CC	AG
883	59	CC	CG	CC	AG
884	65	CC	CG	CT	AA
885	29	GG	GG	TT	AG
886	51	CG	CG	TT	AG
887	36	CG	GG	CT	AA
888	64	CG	GG	CC	GG
889	51	CC	CG	TT	AA
890	70	CC	GG	CT	AG
891	53	CC	GG	CT	AG
892	83	CC	CG	TT	GG
893	45	CG	GG	TT	AG
894	35	CG	GG	CT	AA
895	39	GG	CG	TT	AG
896	37	CG	GG	CC	AA
897	59	CG	CG	CT	AG
898	55	CG	GG	CC	AA
899	56	CG	CC	TT	GG

ANEXOS

Nº	Edad	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
900	50	CG	CG	TT	AA
901	70	CC	CC	CT	GG
902	60	CC	GG	TT	AG
903	54	CC	CG	CT	AG
904	56	GG	CG	CT	GG
905	31	CC	GG	CT	AA
906	47	CC	GG	TT	AG
907	48	CG	CG	TT	AG
908	46	CG	GG	CT	AG
909	27	CG	CG	CT	AG
910	45	CC	CG	CT	GG
911	36	CC	GG	TT	AG
912	46	CC	CG	CC	AG
913	58	CG	CC	CT	AG
914	63	CC	CG	TT	AA
915	57	CC	GG	CT	AG
916	64	CG	GG	CC	GG
917	48	CC	GG	CT	AG
918	55	CG	GG	TT	AA
919	65	CG	CG	CC	GG
920	60	CC	CG	CT	GG
921	57	CC	GG	TT	AA
922	53	CG	GG	CT	GG
923	44	CC	CG	TT	AG
924	37	CC	CG	TT	GG
925	42	CC	GG	CT	GG
926	50	CG	CG	CT	AA
927	61	GG	CC	CT	AG
928	45	CC	CG	CT	AG
929	58	CC	CC	CT	AA
930	46	CC	CG	CC	AG
931	48	CC	CG	CT	AG
932	53	CC	CG	CC	GG
933	37	CG	GG	CT	GG
934	46	CC	CG	CT	AG
935	26	CG	CG	TT	AA
936	40	GG	CG	TT	AA
937	44	CG	CG	CT	AG
938	39	CC	CG	CT	GG
939	59	CG	CG	CT	AG
940	37	CG	GG	CT	AG
941	26	GG	GG	CC	AA
942	58	CG	CG	CT	AG
943	25	CG	CG	CT	AG

Nº	Edad	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
944	46	GG	CC	CT	AA
945	59	CG	GG	CC	AG
946	49	GG	GG	TT	AA
947	43	CG	GG	TT	AG
948	55	CG	GG	CC	AG
949	44	GG	GG	TT	AA
950	46	GG	CC	CC	AA
951	46	CG	CG	CT	AG
952	63	CG	CG	TT	AG
953	54	CG	CC	CT	AG
954	38	CG	CG	TT	AG
955	52	CG	GG	CC	AG
956	50	CG	GG	CC	AG
957	29	GG	GG	CT	AG
958	31	CC	GG	CT	GG
959	42	CG	GG	TT	AA
960	27	CG	GG	TT	AG
961	37	CC	CG	CT	GG
962	44	CG	CG	TT	AG
963	49	CC	CG	TT	GG
964	37	CG	CC	CT	AG
965	36	CC	CC	CT	AA
966	68	CG	CG	CT	AG
967	69	CC	GG	CT	AG
968	80	CC	CG	CT	AA
969	80	CC	GG	CT	AG
970	70	CG	GG	CT	AA
971	70	GG	GG	CT	GG
972	78	CC	CG	CT	AG
973	70	GG	GG	CC	GG
974	75	CC	CG	CC	AG
975	80	CG	CG	CC	AG
976	70	GG	CG	CT	AG
977	50	CC	CC	CT	AA
978	42	CC	CC	CT	AG
979	64	CG	CG	TT	GG
980	42	CG	GG	CT	AG
981	31	CG	CG	TT	AG
982	24	CG	CG	CC	AG
983	27	CG	CC	CT	AG
984	42	CC	CG	CC	GG
985	53	CG	CC	CT	GG
986	40	CC	CG	CT	AA
987	35	CG	GG	TT	AA

ANEXOS

Nº	Edad	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
988	37	CC	GG	CT	AA
989	39	GG	CG	TT	AA
990	74	CC	GG	TT	AG
991	74	CG	GG	CT	GG
992	38	CG	CG	TT	AA
993	40	CG	CG	CC	AA
994	38	CC	GG	CC	AG
995	35	GG	CC	CC	AG
996	34	GG	CG	TT	AG
997	30	GG	GG	CC	AG
998	37	CG	CG	CT	AG
999	28	CG	CG	CC	GG
1000	22	CC	CG	CT	AA
1001	29	CG	CG	CT	AG
1002	38	CC	CG	CC	AA
1003	36	CG	GG	CT	AG
1004	37	CC	GG	CT	GG
1005	31	CC	CC	CT	AA
1006	31	CC	CG	CC	AG
1007	31	CC	CG	TT	AG
1008	35	CG	CG	CT	AG
1009	30	CC	CG	CC	AG
1010	37	CG	CG	CT	AG
1011	42	CC	CC	CT	AA
1012	53	CG	GG	CT	GG
1013	58	CG	CC	CT	GG
1014	48	CG	CC	CT	AG
1015	63	CG	CG	TT	AA
1016	40	GG	CG	CT	AG
1017	56	CC	CG	CC	AA
1018	48	CC	CC	CC	AA
1019	67	GG	CG	CT	AG
1020	45	CG	CG	CC	AG
1021	43	GG	CG	CT	AG
1022	57	CG	CG	CC	GG
1023	59	GG	CC	CC	AG
1024	47	CC	CG	TT	AG
1025	66	GG	CC	TT	AG
1026	55	GG	CC	CT	GG
1027	39	CC	CG	TT	GG
1028	38	CG	CC	CT	AA
1029	62	CG	CC	CT	AG
1030	64	CG	GG	CT	GG
1031	41	CG	CC	CT	AG

Nº	Edad	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
1032	68	CC	CG	CC	GG
1033	46	CC	CG	CT	AG
1034	50	CC	CC	CT	AG
1035	70	CC	CG	CC	AA
1036	66	CG	CG	TT	AA
1037	73	CC	CG	TT	AG
1038	73	CG	CC	CT	AA
1039	73	CG	CC	CT	GG
1040	72	CG	CC	CC	GG
1041	72	CG	CG	CT	AA
1042	72	GG	CG	CC	GG
1043	69	CG	CC	CT	GG
1044	75	CG	CC	CC	AG
1045	67	CC	CC	CT	AA
1046	69	CG	CC	CC	AA
1047	72	GG	GG	CC	AG
1048	80	CC	CG	CT	AG
1049	69	CG	CG	TT	AG
1050	72	CC	CC	CT	GG
1051	76	CG	CC	CC	GG
1052	78	CC	CG	TT	GG
1053	75	CG	CC	CC	AA
1054	80	CG	CC	CT	AG
1055	75	CG	CC	CC	AG
1056	81	CC	CC	CC	AG
1057	75	CC	CG	CC	GG
1058	75	CG	CC	CT	GG
1059	72	CC	CG	CC	GG
1060	72	CC	CC	TT	AA
1061	80	CG	CG	CC	AA
1062	80	CG	CG	CC	AG
1063	71	GG	GG	CT	AG
1064	33	CC	CG	CC	GG
1065	37	CG	GG	CT	GG
1066	35	CG	CG	CC	AG
1067	32	CC	CG	CT	AA
1068	35	CG	CC	TT	AA
1069	31	CC	CC	CT	AA
1070	36	GG	CG	TT	AA
1071	80	CC	CC	TT	AG
1072	75	CG	CC	CT	GG
1073	77	CC	CC	TT	GG
1074	82	CC	CC	CC	GG
1075	74	GG	CC	CC	GG

ANEXOS

Nº	Edad	ATG2B	ATG5	ATG10	ATG16L1
1076	82	CG	CG	CC	AA
1077	77	CG	CC	CT	AG
1078	74	CC	CC	CT	AG
1079	73	CC	GG	CT	AA
1080	72	CG	CG	TT	AA
1081	79	GG	CC	CC	AG
1082	79	CG	CG	CT	AG
1083	75	CC	CG	CC	AA
1084	82	CC	CC	CT	GG
1085	73	CC	CG	TT	AG
1086	60	CG	CG	CT	AG

