

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA VÍA
NRF2/KEAP1 E *IL10* EN LA TIROIDITIS AUTOINMUNE

Cristina Robles Lázaro
2023



Prof. Dña. Rosa Ana Iglesias López
Profesora Asociada del Departamento de Medicina
Universidad de Salamanca

Prof. D. Rogelio González Sarmiento
Catedrático del Departamento de Medicina
Universidad de Salamanca

Prof. D. José Manuel Miralles García
Ex Catedrático y profesor honorífico del Departamento de Medicina
Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Polimorfismos genéticos de la vía *NRF2/KEAP1* e *IL10* en la Tiroiditis Autoinmune” que presenta la licenciada en medicina Dña. Cristina Robles Lázaro, 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 el Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, se expide el siguiente certficad en Salamanca, a 10 de mayo de 2023.

Prof. Dña. Rosa Ana Iglesias López

Prof. D. Rogelio González Sarmiento

Prof. D. José Manuel Miralles García

A mis padres

Agradecimientos

Me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han estado a mi lado estos años y han colaborado de una u otra forma en este trabajo.

A los Profesores José Manuel Miralles García, Rosa Ana Iglesias López y Rogelio González Sarmiento por la confianza depositada en mí para la elaboración de este trabajo, por el tiempo y esfuerzo dedicado y sus consejos en la elaboración.

Al Servicio de Endocrinología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca por ser parte indispensable de mi formación. En especial a mi tutora María Teresa Mories Álvarez, por todo lo que he aprendido a su lado todos estos años y por su apoyo incondicional. Y a todos mis compañeros en especial a Ana Herrero Ruíz y a Ana Isabel Sánchez Marcos por el ánimo y la fuerza que me dan siempre.

A todo el personal del Laboratorio de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, en especial a María Ovejero Sánchez por su paciencia al enseñarme las técnicas de laboratorio necesarias para realizarlo y su disponibilidad en todo momento durante la revisión.

A Carlos Gutiérrez Cerrajero, por su ayuda indispensable con el análisis estadístico y su dedicación para ayudarme en la interpretación de los resultados.

A pacientes y controles, por su colaboración desinteresada.

A mis amigos, por sus ánimos.

A mi familia, por estar siempre a mi lado.

A mis padres, porque sin ningún tipo de duda soy lo que soy gracias a ellos, por apoyarme en mis sueños y mis ilusiones siempre y porque no es suficiente lo que pueda decir para agradecerles todo lo que hacen por mí cada día.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARE: Elemento de respuesta antioxidante
ARN: Ácido ribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico mensajero
ARNsa: Ribonucleasa
CCA: Colangiocarcinoma
CCR: Carcinoma colorrectal
CIAA: Cloroformo alcohol isoamílico
CD: Células dendríticas
CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
CUL3: Culina 3
ddH₂O: Agua bidestilada
DM tipo 1: Diabetes mellitus tipo 1
DRE: Epilepsia resistente a fármacos
EDTA: ácido etilendiamino-tetraacético
EG: Enfermedad de Graves
EO: Estrés oxidativo
EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ETA: Enfermedad tiroidea autoinmune
GWAS: Estudio de asociación del genoma completo
G: Medida de aceleración en centrifugación
HCl: Ácido clorhídrico
HLA: Antígeno leucocitario humano
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
HSPA1A: Heat Shock Protein family a Member 1A
IFN: Interferón
Ig: Inmunoglobulina
IL: Interleucinas
IL2R: Receptor de la interleucina 2
KCl: Cloruro potásico
KEAP1: Kelch-like ECH-associated protein 1
L: Litro
LES: Lupus eritematoso sistémico
LTBI: Infección tuberculosa latente
M: Moles
MgCl₂: Cloruro magnésico
ml: Mililitro
mM: Milimoles

mU: Miliunidades
NCBI: National Center for Biotechnology
nm: Nanómetros
NFE2L2: Nuclear factor erythroid 2 like 2
NRF2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
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 de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa
PRNP: proteína priónica
PTPN22: Proteína tirosina fosfatasa, no receptor tipo 22
PTB: tuberculosis pulmonar
QRT-PCR: Siglas de su nombre en inglés Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa, en tiempo real
rpm: Revoluciones por minuto
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SelS: Selenoproteína S
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate, dodecilsulfato sódico
SPG-1: Síndrome pluriglandular autoinmune tipo 1
SPG-2: Síndrome pluriglandular autoinmune tipo 2
SPN: Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de un solo nucleótido).
Treg: T reguladoras
TGF: Factor de crecimiento transformante
TH: Tiroiditis de Hashimoto
Th: T helper
Thr: Aminoácido treonina
TNF- α : 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 de su nombre en inglés Untranslated Region, regiones no traducidas de los genes
°C: Grados centígrados
 μg : Microgramos
 λ_{abs} : Espectro de excitación
 λ_{em} : Espectro de emisión

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	4
1. TIROIDITIS AUTOINMUNE (TA).....	5
1.1 Epidemiología.....	5
1.2 Patogenia de la TA.....	6
1.2.1 Inmunidad celular.....	6
1.2.2 Inmunidad humoral.....	7
1.3 Etiología.....	7
1.3.1 Factores genéticos.....	7
1.3.1.1 Genes de la sinapsis inmunológica.....	8
1.3.1.2 Genes de regulación de células T y genes de citocinas.....	8
1.3.1.3 Genes específicos de la tiroglobulina.....	9
1.3.2. Factores ambientales.....	10
1.3.2.1 Fármacos.....	10
1.3.2.2 Estrés oxidativo.....	10
1.3.2.3 Yodo.....	10
1.3.2.4 Selenio.....	11
1.3.2.5 Vitamina D.....	12
1.3.3 Factores epigenéticos.....	13
1.4 Características histopatológicas.....	13
1.5 Clínica.....	15
1.6 Diagnóstico.....	18
1.6.1 Autoinmunidad y función tiroideas.....	18
1.6.2 Ecografía tiroidea.....	19
1.7 Estudios que relacionaban la TA con el linfoma tiroideo y el CPT.....	19
1.8 Tratamiento.....	21
2. POLIMORFISMOS IMPLICADOS EN TA.	21
2.1 Polimorfismos de citocinas.....	23
2.2 Polimorfismos de selenoproteínas.....	24
2.3 Polimorfismo de <i>NFE2L2</i>	24
3. <i>KEAP1</i> Y <i>NRF2</i> IMPLICADOS EN LA TA Y OTRAS ENFERMEDADES TIROIDEAS.....	25
3.1 <i>KEAP1</i> en bocio familiar no tóxico.....	27
3.2 Hipertiroidismo y activación de la señalización <i>NRF2</i>	29
3.3 Vía de señalización <i>KEAP1/NRF2</i> en carcinoma papilar de tiroides (CPT).....	29
3.3.1 Activación de <i>NRF2</i> en CPT.....	29
3.3.2 Mutaciones de <i>KEAP1</i> en CPT.....	30
4. ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE <i>KEAP1</i> CON PATOLOGÍAS EXTRATIROIDEAS.....	32
5. ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE <i>NRF2</i> CON PATOLOGÍAS EXTRATIROIDEAS Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES.....	33
5.1 Patologías extratiroides.....	33
5.2 Enfermedades autoinmunes.....	34
6. IL 10 IMPLICADA EN LA TA Y OTRAS ENFERMEDADES TIROIDEAS.....	35
7. IL 10 IMPLICADA EN OTRAS ENFERMEDADES EXTRATIROIDEAS Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES.....	37

7.1 Enfermedades extratiroideas	37
7.2 Enfermedades autoinmunes	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	40
1. HIPÓTESIS	41
2. OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
1. SUJETOS DEL ESTUDIO	44
1.1 Pacientes.....	44
1.2 Controles.....	45
2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DEL ADN.....	46
2.1 Obtención de la muestra	46
2.2 Obtención de DNA a partir de sangre periférica.....	46
3. ESTUDIO GENÉTICO DE POLIMORFISMOS.....	48
3.1 Polimorfismos estudiados.	48
3.1.1 Polimorfismos en el gen <i>KEAP1</i> (rs1048290) y (rs11545829).....	48
3.1.2 Polimorfismo en el gen <i>NFE2L2</i> (rs2706110).....	49
3.1.3 Polimorfismo en el gen <i>IL10</i> (rs1800872).....	49
3.2 Estudio de polimorfismos mediante PCR en tiempo real.....	49
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	55
RESULTADOS.....	58
1. Datos clínicos de los pacientes con TA.....	59
1.1 Edad.....	59
1.2 Sexo.....	59
1.3 Antecedentes familiares.....	60
1.4 Consumo de sal yodada	60
1.5 Procedencia de zona endémica.....	61
1.6 Grado de bocio	62
1.7 Función tiroidea	63
1.8 Autoinmunidad tiroidea	64
1.8.1 Anticuerpos anti-tiroglobulina.....	64
1.8.2 Anticuerpos anti TPO.....	65
2. Datos clínicos comparados.....	65
2.1 Antecedentes familiares y autoinmunidad	65
2.2 Consumo de yodo y autoinmunidad	66
2.3 Grado de bocio y consumo yodo.....	67
2.4 Grado de bocio y procedencia de zona endémica	68
2.5 Consumo de yodo y función tiroidea	69
2.6 Grado de bocio y función tiroidea.....	70
2.7 Función tiroidea y autoinmunidad	71
3. Análisis genético de polimorfismos en los genes <i>KEAP1</i> , <i>NFE2L2</i> e <i>IL10</i> en pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos.....	73
2.1 Estudio de polimorfismos en el gen <i>KEAP1</i> en pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos.....	73
2.1.1 Análisis del polimorfismo rs1048290 del gen <i>KEAP1</i> en individuos con tiroiditis autoinmune e individuos sanos	73

2.1.2 Análisis del polimorfismo rs11545829 del gen <i>KEAP1</i> en individuos con tiroiditis autoinmune e individuos sanos	74
2.2 Estudio del polimorfismo rs2706110 en el gen <i>NFE2L2</i> en pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos	75
2.3 Análisis del polimorfismo rs1800872 en el gen <i>IL10</i> en pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos	76
4. Análisis de los polimorfismos en los genes <i>KEAP1</i>, <i>NFE2L2</i> e <i>IL10</i> en pacientes con tiroiditis autoinmune atendiendo a los datos clínicos.....	76
3.1 Estudio de los polimorfismos en los genes <i>KEAP1</i> , <i>NFE2L2</i> e <i>IL10</i> en pacientes con tiroiditis autoinmune con bocio e individuos sanos	76
3.2 Estudio de los polimorfismos en los genes <i>KEAP1</i> , <i>NFE2L2</i> e <i>IL10</i> en pacientes con tiroiditis autoinmune sin bocio e individuos sanos	78
3.3 Estudio de los polimorfismos en los genes <i>KEAP1</i> , <i>NFE2L2</i> e <i>IL10</i> en pacientes con tiroiditis autoinmune que presentan o no tienen bocio.....	80
3.4 Estudio de los polimorfismos en los genes <i>KEAP1</i> , <i>NFE2L2</i> e <i>IL10</i> en pacientes con tiroiditis autoinmune eutiroideos e hipotiroideos	82
DISCUSIÓN	84
1. Discusión de datos clínicos.....	85
2. Polimorfismos en las vías de señalización antioxidante y su papel en la TA	88
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	95

INTRODUCCIÓN

1. TIROIDITIS AUTOINMUNE (TA)

La tiroiditis autoinmune presenta dos variantes clínicas: una acompañada de aumento del volumen tiroideo que es la más frecuente, denominada también de Hashimoto, descrita por primera vez por Haraku Hashimoto y sin bocio, su variante atrófica y bastante menos frecuente. En ambos casos está involucrada una respuesta autoinmune celular y humoral contra el tejido tiroideo. La facilidad con la que se pueden demostrar actualmente los títulos elevados de anticuerpos circulantes y de células T específicas para los antígenos en la mayoría de los pacientes con enfermedad de Hashimoto ha llevado al uso del término tiroiditis autoinmune.

Existe susceptibilidad genética para desarrollar la enfermedad, siendo más prevalente en pacientes con historia familiar de esta y de otras enfermedades autoinmunes como la insuficiencia adrenal, diabetes mellitus tipo 1 (DM tipo 1), anemia perniciosa, miastenia grave, celiaquía, artritis reumatoide, vitíligo, esclerosis múltiple o lupus, entre otras. La TA está presente en el 10-15% de los casos de síndrome pluriglandular autoinmune tipo 1 (SPG-1), que está causado por mutaciones en el gen *AIRE* y que asocia hipoparatiroidismo, enfermedad de Addison y candidiasis mucocutánea. El SPG tipo 2, también conocido como síndrome de Schmidt, se caracteriza por enfermedad de Addison, TA y DM tipo 1.

1.1 Epidemiología

La prevalencia de la enfermedad aumenta con la edad (1)tiene un predominio étnico en la raza blanca (2).

Su incidencia es de 0,3-1,5 casos por cada 1000 personas, pero está aumentando considerablemente en los últimos años, siendo actualmente la principal causa de hipotiroidismo en las zonas con ingesta suficiente de yodo. La incidencia es de 7 a 10 veces mayor en mujeres que en hombres(3).

La incidencia media y la prevalencia de hipotiroidismo espontáneo como

consecuencia de TA fue respectivamente de 3.5-5/1000 en mujeres, y de 0.6-1/1000 en hombres (4).

1.2 Patogenia de la TA

La patogénesis de la TA está estrictamente relacionada con la presencia de autoanticuerpos y con un infiltrado linfocítico relevante, en el tejido tiroideo. Se cree que uno de los primeros eventos en la patogenia de la TA es una alteración funcional de la respuesta inmunitaria, estando implicadas tanto las células T como las B en la actividad autoinmune. Además, la disfunción de las células T se asocia con la ruptura de la homeostasis inmunitaria contra el tejido tiroideo (5).

1.2.1 Inmunidad celular

En pacientes con TA se encontraron células T CD8+ contra tiroglobulina y TPO (6). Sin embargo, solo una pequeña cantidad (2–3 %) de las células CD8+ son específicas de TG/TPO, por lo que la mayoría de ellas no son específicas de los antígenos tiroideos. Además, estudios recientes establecieron que la muerte celular en la tiroiditis autoinmune no sólo se debe a la citotoxicidad sino también a los procesos de apoptosis (7).

Se ha considerado que una población específica de células CD8+ especializadas, denominadas “células T supresoras”, son capaces de inhibir respuestas inmunitarias dañinas. Se ha planteado la hipótesis de que en la TA existe una alteración en la función de las células T supresoras frente a antígenos específicos de las células tiroideas. Algunas de las funciones de las células T supresoras parecen ser realizadas por las células T reguladoras (Treg). Estas células pueden atenuar la respuesta inmune por contacto directo o indirecto con la producción de citocinas como el factor de crecimiento TGF-Beta y la interleucina 10 (8). Algunos estudios han demostrado una alteración en el número y función de las células Treg en la TA (9,10).

Un estudio reciente (11) sugirió que los exosomas circulantes desempeñan un papel activo en la patogenia de la TA. Los exosomas tienen la capacidad de transferir

moléculas bioactivas a otras células, afectando así la actividad biológica y están involucrados en varios procesos celulares como la presentación de antígenos, activación inflamatoria, trastornos autoinmunes y metástasis tumorales. Los exosomas podrían presentar antígenos a las células dendríticas (DC) y unirse a Toll Like receptors 2/3, lo que provocaría la activación de DC a través de la vía de señalización de NFK B, lo que daría lugar a un desequilibrio en la diferenciación de linfocitos T CD4+ y podría contribuir a la aparición de TA (11,12).

1.2.2 Inmunidad humoral

Algunos estudios han encontrado un aumento de los niveles séricos de células Th1 (13) y citoquinas IL-17 e IL-22 (14) en TA. Se ha demostrado que la citoquina IL-12 está aumentada en el 56% de los pacientes con TA (15).

1.3 Etiología

En el caso de la TA existe una predisposición genética a heredar la enfermedad, pero inferior a la de otras enfermedades autoinmunes, lo que nos indica que influyen determinantemente factores genéticos y ambientales.

1.3.1 Factores genéticos

En un gran estudio sueco de gemelos, la tasa de concordancia para TA fue de 0,29 y 0,1 para gemelos monocigóticos y dicigóticos, respectivamente, dando una heredabilidad estimada de 0,64 (16).

Brix et al. mostraron en gemelos daneses que los monocigóticos exhibieron una tasa de concordancia de más del 50%, mientras que los gemelos dicigóticos mostraron ausencia de concordancia (17)

Como desarrollaremos a continuación, entre los factores genéticos implicados en la etiología de la TA se encuentran polimorfismos en el antígeno leucocitario humano (HLA), del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (*CTLA-4*), la proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 22 (*PTPN22*) y los patrones de inactivación del cromosoma

X. Además, los polimorfismos genéticos en los autoantígenos, las citocinas y sus receptores el receptor de la interleucina 2 (*IL2R*), los receptores de estrógeno, las moléculas de adhesión (CD14, CD40), la región promotora de la selenoproteína S y los productos génicos asociados con la apoptosis, todos los cuales se han vinculado vinculados a la autoinmunidad tiroidea. Estas susceptibilidades genéticas podrían modificarse epigenéticamente a través de la metilación, modificaciones de histonas y la interferencia de ARN no codificantes (18–21)

1.3.1.1 Genes de la sinapsis inmunológica

En la patogénesis de la TA están implicados genes que controlan la respuesta inmune como los codificados en el complejo del HLA. Se ha demostrado que el gen HLAeB* 46:01 está asociado con el desarrollo de TA 29. En otro estudio de 444 pacientes japoneses con TA, se demostró que algunos genes (HLA-A* 02:07 y HLA-DRB4) aumentan la probabilidad de enfermedad, mientras que otros favorecen la protección (22)

Se ha encontrado una asociación débil entre TA en pacientes jóvenes chinos con polimorfismos del gen *TNFRSF4*, que codifica el ligando OX40 (CD52) (16).

Un metaanálisis realizado por Ji et al. sobre un polimorfismo específico A49G, en el gen CTLA-4, ha demostrado un mayor riesgo de tiroiditis de Hashimoto (TH) en sujetos de raza blanca y en la población de Asia oriental (23).

1.3.1.2 Genes de regulación de células T y genes de citocinas

Un importante estudio de 202 pacientes tunecinos con TH reveló la asociación con un polimorfismo VNTR de *IL1RN*, mientras que otro estudio de 182 pacientes chinos con TA mostró la importancia del polimorfismo rs763780 en *IL17F* (24,25)

En el estudio de Karakaya et al. se analizaron los polimorfismos *IL18*-607C/A (rs1946518) y -137G/C (rs187238). El genotipo C/G fue más común entre los casos que entre los controles sanos y el genotipo *IL18* C/G se asoció con un mayor riesgo de TH. El riesgo de TH fue más de 2,237 veces mayor (OR 2,237%95 CI 1,195-4,187, $p = 0,039$) en individuos con genotipo *IL18* C/G que en aquellos con genotipo G/G.

Además, se encontró que el polimorfismo del genotipo IL18-607 C/A era más común en los controles que en los pacientes con TH (OR 0,295 IC 95% 0,117-0,745; $p = 0,026$). Como resultado se determinó que el genotipo CA podría tener un efecto protector contra la TH(26)

En un estudio realizado con pacientes del hospital Clínico Universitario de Salamanca se encontraron 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. También se encontraron 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. 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. El 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 (27).

1.3.1.3 Genes específicos de la tiroglobulina

Un gen que contribuye a la TH es una variante en el sitio de unión en el gen de la tiroglobulina (TG c.1076- 1G > C) asociada con la omisión de un exón, que da lugar a una variante de transcripción de la TG. Otra familia con TA heredada de forma autosómica dominante presenta una mutación que lleva a la haploinsuficiencia del gen que codifica la proteína 3 inducida por el TNF alfa, conocida como A20 (16).

1.3.2. Factores ambientales

1.3.2.1 Fármacos

Los fármacos que modulan el sistema inmunitario pueden causar TA. Dentro de este grupo podemos mencionar el IFN alfa, los inhibidores del punto de control inmunitario (ICI), como los inhibidores de CTLA – 4, los de PD1 y los inhibidores del ligando 1 de PD. Estos últimos fármacos al activar la respuesta de las células T contra las células tumorales, producen enfermedades autoinmunes por disminución de la autotolerancia. La disfunción tiroidea se produce en el 5-10 % de los pacientes tratados con ICI (16)

1.3.2.2 Estrés oxidativo

La evidencia reciente ha confirmado la alteración del potencial antioxidante y el aumento del estrés oxidativo en pacientes con TA. Muchos estudios han demostrado que los oxidantes aumentan y los antioxidantes disminuyen en pacientes con TA, independientemente del estado funcional del tiroides (tanto en eutiroidismo como en hipotiroidismo manifiesto) en comparación con sujetos sanos. Por lo tanto, el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes se desplaza hacia el lado oxidativo (28).

1.3.2.3 Yodo

La excesiva ingesta de yodo o la suplementación extra del mismo inducen disfunción tiroidea y autoinmunidad tiroidea, por lo cual no se recomienda en pacientes con TA (28).

Se han propuesto varias explicaciones, incluida la inducción de la producción de citocinas y quimiocinas por el exceso de yodo que puede reclutar células inmunocompetentes a la glándula tiroides. Otros mecanismos incluyen el procesamiento del exceso de yodo en las células epiteliales de la tiroides, lo que resultó en un aumento de los niveles de estrés oxidativo, oxidación de lípidos y daño del tejido tiroideo o aumento de la inmunogenicidad de la tiroglobulina altamente yodada (29).

El exceso de yodo se ha asociado con un incremento de hasta cuatro veces en la incidencia de TA. El mecanismo detrás de este fenómeno podría estar relacionado con una mayor inmunogenicidad de la tiroglobulina por el yodo en individuos genéticamente predispuestos. Si bien se debe desaconsejar la suplementación excesiva de yodo en la TA, se recomienda una suplementación adecuada durante el embarazo y la lactancia hasta una ingesta total de 250 µg/día.

1.3.2.4 Selenio

La suplementación de selenio se ha demostrado que la suplementación de selenio limita el desarrollo de hipotiroidismo, disminuye los niveles de Ac anti TPO y Ac anti TG y normalizaba los niveles séricos de TSH (30–33).

Una ingesta insuficiente de selenio en la dieta está relacionada con un empeoramiento de la TA. Un metaanálisis ha demostrado que la suplementación con selenio en pacientes con TA tratados con levotiroxina redujo los niveles de anticuerpos TPO en suero después de 3, 6 y 12 meses, pero sólo se observó una reducción a los 3 meses y no a los 6 y 12 meses en pacientes con TA no tratados (34)

No obstante, otros estudios no muestran un efecto beneficioso de la suplementación con selenio en pacientes con TA (35,36). Un estudio prospectivo, aleatorizado, ciego, controlado con placebo con pacientes con TA eutiroideos recién diagnosticados, describió un efecto limitado de la suplementación con selenio a corto plazo. En este estudio, 38 pacientes con TA recibieron un placebo y los otros 38 recibieron 166 µg/día de selenometionina durante seis meses. Las concentraciones de TSH, T4 libre, T3 libre y Ac anti TPO no fueron diferentes entre los grupos de estudio y control al inicio del estudio después de tres y seis meses (35). Además, en la revisión sistemática de van Zuuren et al. concluyeron que la relevancia clínica de la suplementación con selenio en pacientes con TA no está clara. Los estudios demostraron insuficiente evidencia para apoyar la eficacia de selenio en pacientes con TA (36). Son necesarios más estudios para demostrar que la suplementación con selenio en pacientes con TA puede prevenir la progresión a hipotiroidismo.

En el momento actual, ni la Sociedad Europea, ni Americana de Tiroides recomiendan la suplementación de selenio en la TA.

1.3.2.5 Vitamina D

Varios ensayos aleatorizados demostraron que la suplementación con vitamina D durante tres meses disminuía los Ac anti TPO (37) Otro mostraba una reducción significativa de los Ac anti TG y los niveles de TSH en el grupo suplementado con vitamina D en comparación al inicio del estudio (38) Varias revisiones sistemáticas y metaanálisis de 2021 que incluyó 8 estudios (n = 652) también encontraba resultados similares, la suplementación con vitamina D durante más de tres meses reduce los títulos de autoanticuerpos en pacientes con TA (39). Otra revisión sistemática y metanálisis reciente que incluyó seis ensayos controlados aleatorios con 330 pacientes de TA también mostró que después de seis meses de suplementación con vitamina D, los niveles de Ac anti TPO y Ac anti TG disminuyeron significativamente en comparación con el grupo de control. Este análisis confirmó un efecto positivo de la suplementación con vitamina D en TA (40).

La mayoría de los estudios demostraron que la suplementación con vitamina D aumenta significativamente los niveles séricos de 25(OH) vitamina D e induce cambios en los niveles de Ac anti TPO en pacientes con TA. Sin embargo, en la mayoría de los casos no se encontraron asociaciones significativas entre la vitamina D sérica y las concentraciones de Ac anti TG, TSH, T3 libre y T4 libre.

Sin embargo, un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo mostró que la suplementación con vitamina D en pacientes con TA y deficiencia de esta vitamina podría no tener un efecto significativo sobre la función tiroidea y la autoinmunidad. Este estudio demostró que los niveles de vitamina D aumentaron después de 12 semanas en el grupo suplementado. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos con respecto a los niveles de Ac anti TPO y TSH (41)

Se necesitan más estudios a largo plazo para confirmar la eficacia de la suplementación

1.3.3 Factores epigenéticos

La investigación actual ha demostrado que los factores genéticos y ambientales actúan sinérgicamente en el origen de la TA a través de la modulación de factores epigenéticos (42–45), los cuales pueden regular la expresión de genes, dando lugar a la aparición de la enfermedad en ausencia de alteraciones del ADN en individuos genéticamente susceptibles. Los principales mecanismos epigenéticos implicados son la metilación, las modificaciones de las histonas y la interferencia del ARN a través de los ARN no codificantes (46)

La metilación del ADN puede determinar la inactivación de ciertos genes, mientras que algunas alteraciones de histonas inducen la activación de otros genes; sin embargo, la acción de estos mecanismos epigenéticos puede ser variable e influenciada por factores ambientales (47,48). Además, los ARN no codificantes, incluidos los microARN, también pueden controlar la expresión de genes específicos (49,50).

La evidencia sugiere que la preponderancia femenina en la TA puede deberse a la inactivación del cromosoma X, que se considera una característica epigenética importante en la que se silencia un cromosoma X (51).

Esta creciente evidencia sugiere que los factores ambientales pueden inducir modificaciones epigenéticas que, en individuos genéticamente susceptibles, pueden producir enfermedades tiroideas autoinmunes, incluida la TA (52,53).

1.4 Características histopatológicas

Las características histopatológicas de la TH incluyen la infiltración linfocítica, la presencia de tejido fibrótico, la formación de folículos linfáticos, la atrofia del parénquima y la presencia en los folículos linfoides de células grandes con gránulos

eosinófilos en el citoplasma, llamadas células de Hürthle. El hipotiroidismo se debe a la destrucción de las células tiroideas.

Las características histopatológicas del TA no son únicas, aunque se han identificado diferentes variantes de TA a través de las características clínicas e histopatológicas, como la fibrótica y la atrófica (54), la tiroiditis de Riedel (55) y la tiroiditis IG4 (56)

La tiroiditis autoinmune con bocio se caracteriza por una infiltración linfocítica difusa con centros germinales ocasionales, folículos tiroideos de tamaño reducido que contienen escaso coloide y fibrosis. Aunque los folículos son pequeños, las células tiroideas individuales a menudo aparecen agrandadas y contienen un citoplasma granular y rosado (cambio oxifílico); estas células se conocen como células de Hürthle o Askanazy.

En la tiroiditis autoinmune atrófica, la glándula tiroidea es pequeña, con infiltración linfocitaria y tejido fibroso que reemplaza al parénquima tiroideo. Los receptores de anticuerpos TSH pueden detectarse en un pequeño porcentaje de casos.

En la tiroiditis de Riedel las principales características histológicas son la presencia de abundante tejido fibrótico, que se extiende más allá de la cápsula tiroidea en ausencia de células neoplásicas.

La tiroiditis IgG4 se caracteriza por altas concentraciones en tejido tiroideo y suero de IG4. El creciente interés por las enfermedades relacionadas con IG4 proporcionó recientemente una clasificación simplificada, donde la TA se divide en grupos positivos y negativos para IgG4, según la inmunohistoquímica para IgG4 e IgG. Los pacientes del grupo IgG4 positivo eran significativamente más jóvenes que los del grupo IgG4 negativo y mostraban un grado significativamente mayor de fibrosis del parénquima tiroideo. La puntuación de expresión inmunohistoquímica para TGF- β 1 fue mayor en el grupo IgG4 positivo que en el grupo IgG4 negativo, lo que sugiere que esta nueva clasificación podría tener implicaciones clínicas relevantes para el tratamiento de la TA.

El hipotiroidismo posterior se debe a la destrucción de las células foliculares del tiroideo al infiltrarse las células inmunitarias, lo que conduce a una exposición de los antígenos tiroideos (TPO y TG), aumentando aún más la producción de anticuerpos (Ac anti TPO y anti TG) y agravando la destrucción de los folículos tiroideos. 36 Klubo

1.5 Clínica

La sintomatología de la TA se caracteriza por manifestaciones locales y sistémicas. Los síntomas locales se deben a la compresión de las estructuras anatómicas del cuello, incluida la disfonía por afectación del nervio laríngeo recurrente, la disnea por compresión de la tráquea y la disfagia por compresión del esófago. Estas manifestaciones son raras, salvo en bocios de gran tamaño grado III. En cambio, el cuadro clínico dominante es el hipotiroidismo subclínico o clínico.

Aproximadamente el 25-30 % de los pacientes tienen diferentes grados de disfunción tiroidea, que irán desde el hipotiroidismo subclínico con niveles de hormonas tiroideas dentro de la normalidad y TSH elevada a hipotiroidismo clínico.

Los síntomas sistémicos más comunes se deben al hipotiroidismo clínico, que involucra a la mayoría de los órganos y tejidos con una variabilidad significativa, aunque a menudo precedida por manifestaciones subclínicas.

Debido a que las hormonas tiroideas actúan sobre múltiples órganos, las manifestaciones clínicas de la enfermedad son muy diversas. Los signos y síntomas del hipotiroidismo son consecuencia de la deficiencia de la hormona tiroidea en los tejidos diana entre los que se encuentran los siguientes:

Piel y anejos:

El hipotiroidismo produce una acumulación de ácido hialurónico que altera la composición de la sustancia de base en la dermis y en otros tejidos. Es el responsable de los rasgos engrosados y del aspecto edematoso (mixedema) en el hipotiroidismo florido. Se manifiesta alrededor de los ojos, en el dorso de las manos y pies, y en las

fosas supraclaviculares. Se produce macroglosia y engrosamiento de mucosas faríngea y laríngea. La piel está áspera y seca. Suele haber mayor tendencia a la aparición de hematomas por fragilidad capilar. El cabello tiene tendencia a caerse y las uñas se vuelven quebradizas.

Sistema cardiovascular:

El gasto cardíaco en reposo está disminuido por la reducción tanto del volumen sistólico como de la frecuencia cardíaca. En el hipotiroidismo primario grave, la silueta cardíaca está aumentada de tamaño, en buena medida por acumulación mixedematosa en pericardio, los tonos cardíacos tienen una intensidad disminuida.

Aparato respiratorio:

Hipoventilación. Puede coexistir apnea obstructiva del sueño como resultado de la macroglosia. La aparición de derrame pleural es escasa y rara vez condiciona la aparición de insuficiencia respiratoria.

Sistema nervioso central y periférico:

Todas las funciones intelectuales (pensamiento, memoria, aprendizaje), incluyendo el habla, están enlentecidas. Se produce letargo y somnolencia. También se incluyen como manifestaciones la fatiga, depresión, pérdida de memoria e incapacidad para concentrarse. La manifestación más extrema de hipotiroidismo severo es el coma mixedematoso. El depósito a nivel del nervio mediano puede producir síndrome del túnel carpiano.

Sistema muscular:

Son frecuentes la rigidez y los dolores musculares que empeoran con temperaturas frías. El retraso de la contracción y la relajación muscular produce una lentitud de movimientos y un retraso en los reflejos osteotendinosos. La creatinafosfocinasa (CPK) derivada del músculo esquelético estará elevada en función de la severidad del hipotiroidismo.

Sistema esquelético:

Su déficit en las primeras fases de la vida conlleva un retraso y desarrollo anormal de los centros epifisarios de la osificación (disgenesia epifisaria). La alteración del crecimiento lineal produce un enanismo en el que las extremidades son desproporcionadamente cortas en relación con el tronco y un cambio de la maduración del área facial propio del cretinismo hipotiroideo.

Función renal:

El hipotiroidismo produce una disminución del flujo sanguíneo renal, de la tasa de filtración glomerular y de la capacidad tubular reabsortiva.

Sistema hematopoyético:

La manifestación más frecuente es una anemia normocítica normocrómica leve. Con menor frecuencia la anemia es macrocítica, algunas veces por déficit de vitamina B12 o por anemia perniciosa, sobre todo si se asocia una gastritis autoinmune.

Aparato digestivo:

Puede producir estreñimiento por hipomotilidad del tránsito intestinal.

Función reproductora:

Los varones con hipotiroidismo pueden presentar disminución de la libido, oligozoospermia y disfunción eréctil. En mujeres aparece disminución de la libido y anovulación, así como sangrado menstrual por privación excesiva e irregular, debido a una alteración en la secreción de progesterona y persistencia de proliferación del endometrio. La fertilidad está reducida y pueden producirse abortos espontáneos.

Manifestaciones metabólicas:

Tanto la síntesis como la degradación de los lípidos está disminuida, especialmente esta última, por lo que el efecto neto es una acumulación de lípidos,

especialmente de baja densidad (LDL) y de triglicéridos.

1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de la TA se sustenta en datos clínicos del paciente, evaluación serológica de la autoinmunidad tiroidea y de la función tiroidea y la valoración radiológica mediante ecografía de la glándula tiroidea, que permite encontrar los hallazgos estructurales más característicos de la enfermedad (aunque la ecografía no es necesaria para el diagnóstico de la enfermedad, únicamente lo apoya).

1.6.1 Autoinmunidad y función tiroideas

El diagnóstico de la TA se confirma por la presencia de autoanticuerpos antitiroideos en el suero, generalmente a títulos elevados. Los Ac anti TPO son más frecuentes y se encuentran en concentraciones más elevadas que los Ac anti TG. Los Ac anti TPO séricos son la característica serológica más importante de la TA y están presentes en aproximadamente el 95% de los pacientes(3). En cambio, los anticuerpos antitiroglobulina están presentes en un porcentaje menor (60-80%) de los casos (5)Puede verse una TA seronegativa en el 5-10 % de los casos. En estos casos el aspecto ecográfico de la glándula tiroides puede ayudar al diagnóstico.

La prevalencia de anticuerpos antitiroideos difiere con las razas, está aumentado con la edad y se reduce con el hábito tabáquico.

Se ha demostrado que los niveles de Ac anti TG y TPO se correlacionan con mayor sintomatología y disminución de la puntuación en las escalas de calidad de vida, independientemente de la función tiroidea.

El hipotiroidismo primario se considera manifiesto cuando el nivel de la hormona estimulante del tiroides (TSH) es elevado y la tiroxina libre (T4 libre) es baja. El hipotiroidismo subclínico se define bioquímicamente como una TSH elevada acompañada de concentraciones normales de T4 libre y T3 libre.

En la hashitoxicosis los pacientes tienen una presentación clínica de tirotoxicosis, asociada a infiltración linfocitaria de la glándula tiroidea típica de la TA (57). La liberación de T4 y T3 almacenada a la circulación resulta en signos transitorios y síntomas del exceso de hormona tiroidea. El tratamiento requiere alivio sintomático con betabloqueantes y cede dentro de 3 a 24 meses dando lugar a un hipotiroidismo generalmente permanente (3)

1.6.2 Ecografía tiroidea

La evaluación radiológica del TA incluye principalmente la exploración ecográfica, donde se consideran características específicas la disminución de la ecogenicidad, la heterogeneidad, la hipervascularización y la presencia de micronódulos hipoecóicos con borde ecogénico (58).

1.7 Estudios que relacionaban la TA con el linfoma tiroideo y el CPT

El linfoma primario tiroideo no Hodgkin se asoció fuertemente con la TA (59,60). En un estudio se realizó el análisis genético de 35 tejidos cancerosos de pacientes con cáncer de tiroides y 35 tejidos y células sanguíneas de pacientes con TA. La investigación de la tecnología de chips genéticos mostró que *TSHR*, *BACH2*, *FOXE1*, *RNASET2*, *CTLA4*, *IL2RA* y otros genes relacionados con TA se expresaron en CPT. Estos resultados proporcionan una base para la detección de genes clave de diagnóstico de CPT, destacando la relación entre algunos genes relacionados con TA y sus polimorfismos en la patogénesis de CPT (61)

Un metaanálisis de 39 artículos de investigación originales mostró que la TA es un factor de riesgo de carcinoma papilar tiroideo (odds ratio combinado = 1,71; intervalo de confianza del 95 %, 1,57–1,80; $p < 0,00001$) y CPT (1,67, 1,51–1,85, $<0,00001$). Los pacientes con CPT combinado con TA tenían más probabilidades de tener carcinomas multifocales. La prevalencia de extensión extratiroidea, metástasis, mutación BRAFV600E y recurrencia fue significativamente menor en pacientes con CPT combinado con TA. La TA aumenta el riesgo de CPT, pero es un factor protector contra la progresión del CPT(62). Dos metaanálisis recientes uno de ellos, que incluyó

71 artículos publicados que tenían 44.034 pacientes, de los cuales 11.132 tenían TA, mostró que TA estaba asociada con mejores características clínico-patológicas y un mejor pronóstico entre los pacientes con CPT, como demostraba la reducida incidencia de extensión extratiroidea, metástasis ganglionares, metástasis a distancia y un incremento de la supervivencia libre de recurrencia(63). El otro mostraba datos similares al referido anteriormente, los pacientes con CPT con TA podrían tener una incidencia más baja de extensión extratiroidea, metástasis a distancia, metástasis ganglionares, invasión vascular y mejor pronóstico que los pacientes con CPT(64).

Por lo tanto, los pacientes con CPT y TA de acuerdo con los estudios revisados tenían más riesgo de CPT y mayor probabilidad de ser multifocal, pero menos prevalencia de extensión extratiroidea, de metástasis ganglionares y a distancia, mejor pronóstico y aumento de la supervivencia libre de recurrencia.

Fiore et al. demostraron que la prevalencia de CPT fue mayor en pacientes con TA nodular que en aquellos con bocio nodular no autoinmune. En pacientes bajo terapia con LT-4, tanto el valor de TSH como la incidencia de CPT fué más baja (65)

Los dos estudios revisados a continuación han demostrado la presencia de una enfermedad menos agresiva, menor estadio, menor persistencia de enfermedad, mayor tasa de curación y disminución de mortalidad en los pacientes con CPT y TA asociada.

De 9210 pacientes con CPT incluidos en el análisis, 1751 (19%) tenían TA. En el modelo de regresión logística, la TA se asoció negativamente con frecuencias de tamaño del tumor primario de 4 cm o más, extensión extratiroidea, extensión extraganglionar y metástasis a distancia. Los pacientes con TA tuvieron resultados significativamente superiores en comparación con los pacientes sin TA en términos de supervivencia específica de la enfermedad no ajustada a 10 años y supervivencia libre de recurrencia. Después de ajustar por sexo, edad, tamaño del tumor primario, extensión extratiroidea, metástasis en los ganglios linfáticos, metástasis a distancia,

extensión de la cirugía y ablación con yodo radiactivo, la TA se asoció con una disminución de la mortalidad relacionada con el CPT (66).

En otro estudio retrospectivo se analizaron 213 pacientes con CPT divididos de acuerdo con la presencia o ausencia de TA. Los pacientes con CPT y TA tenían una enfermedad menos agresiva en términos de estadio y metástasis a distancia y tuvieron un mejor resultado en términos de mayor tasa de curación y menos persistencia de enfermedad en comparación con el CPT sin TA asociada(67).

1.8 Tratamiento

El objetivo principal del tratamiento de la TA es el control del hipotiroidismo cuando aparece y consiste en la administración oral de una hormona sintética, la levotiroxina 4 (L-T4), a una dosis de 1,6-1,8 microgramos por kilo (68). La terapia de sustitución debe prolongarse durante toda la vida para mantener niveles normales de tirotropina (TSH) circulante.

La suplementación de selenio en pacientes con TA por el momento no se recomienda.

La asociación entre la deficiencia de vitamina D, la patogenia de la TA y la hipofunción tiroidea se ha demostrado en varios estudios (69–71) Teniendo en cuenta el bajo coste y los mínimos efecto secundario de la suplementación oral con vitamina D, se puede recomendar la detección de la deficiencia de vitamina D y la suplementación para pacientes con TA (69). Aunque de momento no se recomienda.

El papel de la cirugía para la TA está limitado para casos con compresión de estructuras anatómicas cervicales por bocios compresivos de gran tamaño o presencia de un nódulo con características de transformación maligna.

2. POLIMORFISMOS IMPLICADOS EN TA.

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 2 alelos, uno en cada copia del cromosoma, que se heredan del padre y madre de manera independiente. Así, las 3 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.

2.1 Polimorfismos de citocinas

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. 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 (27).

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 proinflamatorias 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.

IL 10:

La proteína IL-10 es un homodímero; cada una de sus subunidades tiene 178 aminoácidos de longitud. La IL-10 se clasifica como una citocina de clase 2. Es una citocina producida por células T activadas, células B, queratinocitos y monocitos.

IL-10 es capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF α y factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (72). También muestra una potente capacidad para suprimir la capacidad de

presentación de antígenos de las células presentadoras de antígenos; sin embargo, también estimula ciertas células T (Th2) y mastocitos y estimula la maduración de las células B y la producción de anticuerpos (73).

2.2 Polimorfismos de selenoproteínas

Se ha identificado uno de estos genes de susceptibilidad a la TH, SELENOS, que codifica un miembro de la familia de proteínas seleno, la selenoproteína S (SelS). En un estudio en población portuguesa se encontró que el SNP del promotor de SELENOS aumentaba el riesgo de TH. Un SNP funcional en el promotor SELENOS (rs28665122, -105G/A) está asociado con un mayor riesgo de TH. En el grupo de pacientes con TH existía una mayor proporción del genotipo SEPS1 GA que en el grupo control. La frecuencia del genotipo AA también fue mayor en el grupo TA que en el grupo control. Los portadores del alelo A presentan un riesgo aumentado de 2.22 de desarrollar TH. En concreto, la heterocigosidad u homocigosidad para el alelo menos prevalente (GA o AA, respectivamente) fue significativamente más frecuente en los pacientes con TH que en los controles sanos, aumentando el riesgo de TH en más del doble(20).

En otro estudio realizado en población china no se encontró asociación entre tres genes de selenoproteínas y la enfermedad tiroidea autoinmune. Diferente estado nutricional de selenio podría explicar los resultados contradictorios, así como la contribución de otras variantes genéticas en la enfermedad tiroidea autoinmune (74).

2.3 Polimorfismo de *NFE2L2*

En sujetos que no portaban el alelo de riesgo SELENOS conocido, la heterocigosidad u homocigosidad para cualquiera de los alelos menos prevalentes de *NFE2L2* SNP no modificó el riesgo de TH. Estos resultados son consistentes con la noción de que el genotipo del promotor *NFE2L2*, no es un factor de riesgo independiente para TH. Sin embargo, entre los sujetos que albergaban solo los alelos principales *NFE2L2*, la heterocigosidad u homocigosidad para el alelo menos

prevalente SELENOS SNP no se asoció con un mayor riesgo de TH, lo que sugiere un efecto protector de los alelos más prevalentes de *NFE2L2*. En apoyo adicional de un efecto de interacción, en los sujetos heterocigotos u homocigotos para el alelo de riesgo SELENOS, la heterocigosidad u homocigosis para cualquiera de los alelos menos prevalentes de *NFE2L2* SNP, aumentó significativamente el riesgo de TH, lo que sugiere un efecto predisponente de los alelos menos prevalentes de *NFE2L2* (75).

En resumen, estos resultados indican que cuando los tres SNP funcionales del promotor *NFE2L2* se consideran juntos y en combinación con el SNP funcional del promotor SELENOS, los alelos más prevalentes de *NFE2L2* eliminan el riesgo de TH asociado con el alelo menos prevalente de SELENOS, mientras que los alelos menos prevalentes de *NFE2L2* aumentan el riesgo (75).

Estos hallazgos indican que las bases para la interacción genética entre *NFE2L2* y SELENOS en modular el riesgo de TH podrían estar relacionadas con una retroalimentación positiva entre las vías de señalización de NRF2 y Selenoproteína S (75).

En otro estudio se ha demostrado que NRF2 regula la expresión de tiroglobulina. La activación genética constitutiva de NRF2 causa agrandamiento de la glándula tiroides e hipotiroidismo leve (76).

3. KEAP1 Y NRF2 IMPLICADOS EN LA TA Y OTRAS ENFERMEDADES TIROIDEAS

El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NRF2, codificado por *NFE2L2*), es un factor de transcripción que coordina las respuestas celulares al estrés oxidativo, electrofílico y nitrosativo. La proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (*KEAP1*) es una proteína rica en cisteína que facilita la rápida degradación proteasómica de NRF2 en condiciones basales. Uno de los principales sistemas antioxidantes endógenos es la vía centrada en NRF2 y su inhibidor citoplasmático

KEAP1. En los últimos años se han establecido muchas relaciones entre esta vía de señalización y la fisiopatología tiroidea, incluyendo varias patologías tiroideas como el bocio, hipotiroidismo, hipertiroidismo y cáncer.

NRF2 es una proteína que juega un papel central en la homeostasis tisular mediante la regulación positiva de la transcripción de una batería de genes de defensa antioxidante y la regulación negativa de la transcripción de citocinas proinflamatorias. En condiciones basales, NRF2 se une a su complejo inhibidor citoplasmático formado por la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (*KEAP1*) y Cullin 3 (Cul3), donde *KEAP1* se dirige a NRF2 para la poliubiquitinación por Cul3, que conduce a la degradación posterior a través del proteasoma. En condiciones de estrés oxidativo (EO), las cisteínas reactivas redox específicas de *KEAP1* se oxidan, lo que anula su capacidad para apuntar a NRF2 para poliubiquitinación y degradación. NRF2 se estabiliza y se acumula en el núcleo, donde se une a las secuencias de ADN denominadas elemento de respuesta antioxidante (ARE), que se encuentran en los promotores y potenciadores de sus numerosos genes diana. Un exceso descontrolado de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede causar estrés oxidativo, un factor involucrado en la patogénesis de un amplio espectro de enfermedades, incluyendo inflamación y cáncer. Un mecanismo de protección es la vía de señalización centrada en NRF2.

Un trabajo in vivo con ratones y ratas demostró que NRF2 promueve la transcripción y la síntesis de proteínas de moléculas antioxidantes y citoprotectoras, como Nqo1, Gpx2 y Txnrd1 en la glándula tiroidea. De este modo, NRF2 surge como un importante regulador de la fisiología del folículo tiroideo: aumenta los niveles de tiroglobulina necesarios para la síntesis de hormonas, previene su excesiva yodación y protege contra el daño oxidativo intratiroideo, especialmente en condiciones de sobrecarga de yodo (77).

La síntesis de la hormona tiroidea es un proceso complejo que comprende una serie de reacciones redox que utilizan H₂O₂. Los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) deben permanecer equilibrados para prevenir el EO. De la misma

forma las células foliculares tiroideas necesitan tener unos niveles de H₂O₂ equilibrados, similares a los de otras ROS, para prevenir el EO. Y necesitan disponer de un potente sistema antioxidante.

En diferentes estudios en los últimos años se ha demostrado que la vía de señalización antioxidante que comprende el factor de transcripción NRF2 y su inhibidor citoplasmático *KEAP1*, es el principal mecanismo empleado por el tiroides para su defensa antioxidante.

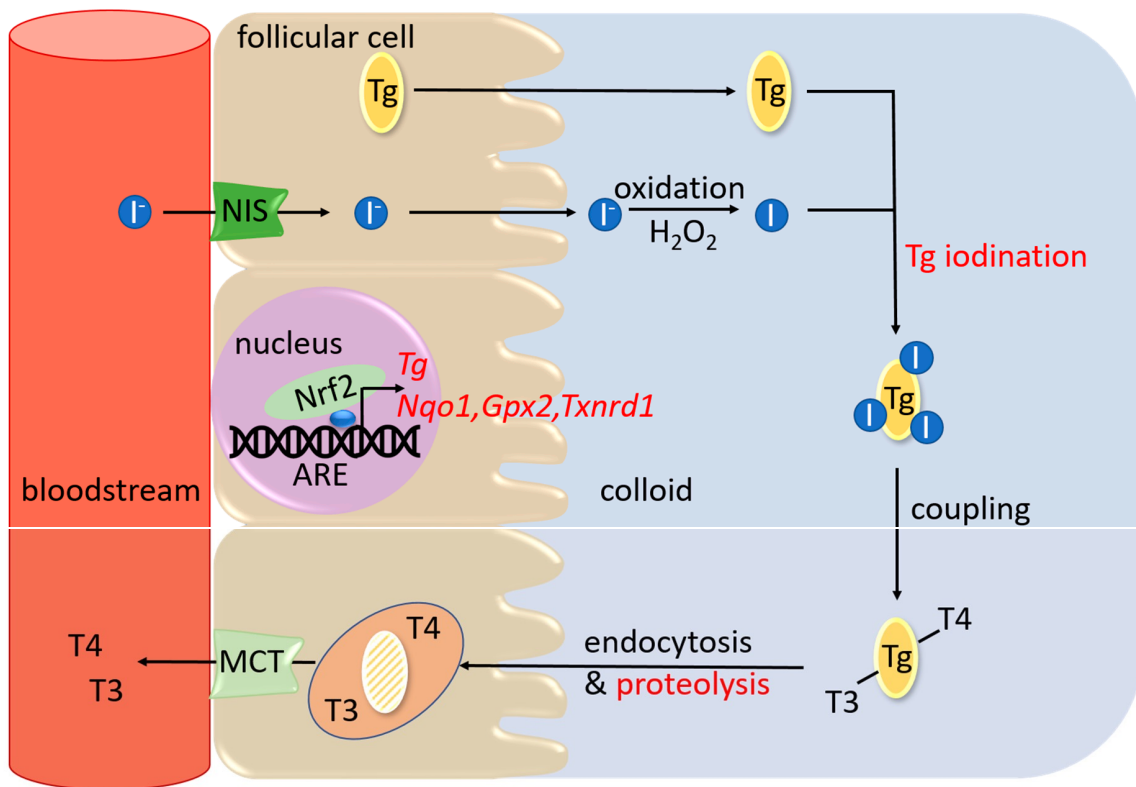


Figura 1: Representación esquemática simplificada de la síntesis de hormonas tiroideas.

3.1 KEAP1 en bocio familiar no tóxico

En un estudio reciente se demostró con modelos animales que la pérdida de función de *KEAP1* puede causar bocio, aunque no necesariamente con una apariencia nodular. Existía una disminución de los niveles plasmáticos de T₄, que se normalizaron unos años después, aparentemente por el aumento compensador de los niveles

plasmáticos de la TSH. Estos hallazgos sugieren que la activación genética crónica de NRF2 puede tener consecuencias negativas para la glándula tiroides (78).

Pacientes con bocio multinodular hereditario que albergaban mutaciones de pérdida de función de la línea germinal de *KEAP1*, suponían una mayor activación de NRF2 como se detalla a continuación. Una rara enfermedad genética denominada bocio multinodular familiar no tóxico se caracteriza por su aparición en familias (transmitida genéticamente de forma autosómica dominante o ligada al cromosoma X), una función tiroidea normal y la presencia de múltiples nódulos en la glándula tiroides. Uno de los genes asociados a esta rara enfermedad es *KEAP1*. Se han descrito dos mutaciones de pérdida de función en *KEAP1* en dos familias con dicha enfermedad.

Teshiba et al encontraron en la secuenciación directa de la variante *KEAP1* en el probando una mutación sin sentido en el exón 3 del gen: c.879_880delinsA, p. Asp294Thr, fs*23. Estos resultados sugirieron que la proteína *KEAP1* truncada no se genera probablemente debido a la descomposición del ARNm sin sentido, y que la expresión de la proteína *KEAP1* de tipo salvaje podría disminuir debido al bajo producto de transcripción, al menos en los tejidos tiroideos del paciente. Los niveles de ARNm del gen que codifica NRF2 (*NFE2L2*, para NFE2-like 2) no cambiaron, pero los niveles de ARNm de *GSTA4* (Glutación S-transferasa A4) y *GCLC* (glutamato cisteína ligasa, subunidad catalítica) aumentaron. Los datos indican que la mutación heterocigótica de pérdida de función de *KEAP1* conduce a la activación de NRF2. En este estudio se observó que aumentaba la expresión de los genes diana de *NFE2L2*, acompañada de una disminución de la expresión de *KEAP1* de tipo salvaje en los tejidos tiroideos del paciente. Los datos indican que la mutación heterocigótica de pérdida de función de *KEAP1* conduce a la activación de NRF2 (79).

La segunda mutación de la línea germinal se describió en una mujer japonesa de 47 años con bocio multinodular no tóxico coexistente y enfermedad de Graves. El análisis genético identificó una mutación de línea germinal heterocigota (c.1448G>A, p.R483H) en *KEAP1*, que afecta el dominio DC de la proteína *KEAP1*, responsable de la unión de NRF2. El análisis histológico de los nódulos tiroideos del paciente después

de la tiroidectomía total mostró una mayor acumulación nuclear de NRF2, lo que indica una interacción *KEAP1/NRF2* alterada (80).

Estos dos ejemplos independientes muestran que las mutaciones de pérdida de función en *KEAP1* pueden ser un evento impulsor en algunas formas raras de bocio multinodular no tóxico hereditario, y sugieren que la activación genética de NRF2 es un mecanismo bociógeno probable en tales casos.

Puede haber algunas particularidades con respecto a la señalización de *KEAP1/NRF2* en la glándula tiroides en comparación con otros tejidos: se puede suponer razonablemente que en los pacientes que albergaban mutaciones de pérdida de función de *KEAP1* en la línea germinal, NRF2 se activó en todos los tejidos. Sin embargo, solo el tiroides mostró un fenotipo clínico prominente que condujo al diagnóstico, sin informar de enfermedades extratiroides en los mismos pacientes (79,80) Por lo tanto, en teoría, es posible que la haploinsuficiencia de *KEAP1* pueda conducir a una activación más potente de NRF2 en el tiroides en comparación con otros tejidos, o que la glándula tiroides pueda ser más sensible que otros tejidos a aumentos similares en el estado de activación de la vía NRF2 o ambos.

3.2 Hipertiroidismo y activación de la señalización NRF2

El hipertiroidismo/tirotoxicosis se ha asociado con estrés oxidativo y con la activación de la señalización NRF2 en los tejidos diana de las hormonas tiroideas (78).

3.3 Vía de señalización *KEAP1/NRF2* en carcinoma papilar de tiroides (CPT)

3.3.1 Activación de NRF2 en CPT

En general, se sabe que la activación de NRF2 desempeña un papel doble en el cáncer, por un lado, protegiendo a las células normales contra el daño oxidativo y, por tanto, previniendo la carcinogénesis, mientras que por otro lado confiere una ventaja de supervivencia a las células cancerosas establecidas (81)

NRF2 se activa en CPT, donde regula la defensa antioxidante y promueve la

supervivencia de las células cancerosas (82).

3.3.2 Mutaciones de *KEAP1* en CPT

Muchas mutaciones o pérdida de heterocigosidad de *KEAP1* se han identificado en líneas celulares de cáncer de pulmón o tejidos cancerosos; las mutaciones o la pérdida de heterocigosidad dieron como resultado la inactivación de *KEAP1* o una expresión reducida de *KEAP1*, que regulaba al alza el nivel de proteína de NRF2 (83,84). En conjunto, estos resultados sugieren que la pérdida de la función de *KEAP1* puede resultar en una activación prolongada de NRF2 proporcionando células cancerosas con una ventaja de crecimiento debido a la regulación positiva de los genes de la vía de señalización de NRF2 (81).

En otro estudio se comprobó que NRF2 y Nqo1 fueron indetectables en el tejido normal; sus niveles fueron significativamente mayores en CPT que en lesiones benignas (p 0,0001 y p 0,024, respectivamente). El inhibidor de NRF2, *KEAP1*, estaba aumentado de forma variable en el CPT y sus niveles no se correlacionaron con NRF2, lo que no apoya la hipótesis indicada de niveles reducidos de dicho inhibidor como mecanismo para la activación de NRF2.

La señalización NRF2 puede también conferir beneficios a las células cancerosas: una activación constitutiva de NRF2 por mutaciones somáticas o eventos epigenéticos se encuentra en varios cánceres humanos y promueven la quimiorresistencia (7–10).

Dos estudios recientes en líneas celulares de cáncer de tiroides (principalmente anaplásico) mostraron que NRF2 implica resistencia a inhibidores del proteasoma (12,13) y han puesto de relieve la necesidad de resaltar la relevancia clínica de NRF2 al caracterizar su actividad en el cáncer de tiroides humano. y demostrar que la vía NRF2 se activa comúnmente en CPT.

La falta de mutaciones *KEAP1* y *NFE2L2* entre especímenes con alta abundancia de NRF2 sugiere que la activación de la vía en CPT es secundaria a algún otro fenómeno. La reducción de la expresión de *KEAP1* debido a la metilación del promotor también se ha determinado como posible mecanismo activador (77).

Las alteraciones de los genes que codifican el complejo *KEAP1/Cul3/Rbx1* E3-ubiquitina ligasa que se dirige a NRF2 para la degradación proteasómica, parecen ser extremadamente frecuentes en CPT, más del 80% de las muestras albergan una alteración del ADN en al menos un componente de este complejo. Los niveles de proteína NRF2 están regulados negativamente por el complejo ubiquitina – ligasa *KEAP1/CUL3/RBX1* E3. La alteración de cualquier componente del complejo es suficiente para activar NRF2. La hipermetilación del promotor es el mecanismo predominante que afecta a *KEAP1* y *CUL3*, mientras que la pérdida del número de copias afecta a *RBX1* en CPT (85).

En el siguiente estudio se encontraron mutaciones en el gen *KEAP1* en un subconjunto de CPT. La mutación homocigota p.M161I (c.483G>A) y la mutación heterocigota p.R261W (c.781C>T) se ubicaron en el dominio BTB (Broad-complex, Trambtrack, Bric-a-brac) y el dominio IVR (Intervening) de *KEAP1*, respectivamente. Las otras 4 mutaciones heterocigóticas se localizaron en el dominio DC, p.G379D (c.1136G>A) en Kelch 2, p.P412S (c.1234C>T) en Kelch 3, p.D579N (c.1735G>A), y p.E593K (c.1777G>A) en secuencias Kelch 6.

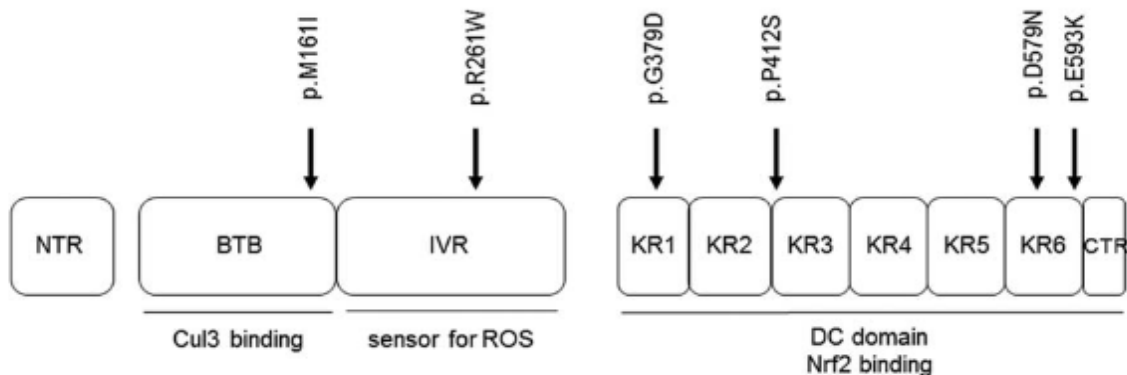


Figura 2: Mutaciones de la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (*KEAP1*) en carcinomas papilares de tiroides. Estructura de la proteína Keap1

Los análisis inmunohistoquímicos de las muestras mutadas en *KEAP1* demostraron un aumento de la expresión de NRF2 mediante la tinción nuclear de NRF2 de las células tumorales papilares, en contraste con la tinción negativa del tejido tiroideo folicular normal circundante. A pesar de que no se identificaron mutaciones en el gen *NFE2L2*, 6 de 131 pacientes con CPT (4,6%) presentaban mutaciones en

KEAP1. Las mutaciones de *KEAP1* identificadas en los pacientes con CPT se distribuyeron en el dominio BTB e IVR (33%) y el dominio DC (66%), que son importantes para su función. Los dominios BTB e IVR son necesarios para la unión de Cul3 y la ubiquitinación de NRF2, en tanto que las repeticiones Kelch de *KEAP1* están involucradas en la interacción con el dominio Neh2 de NRF2.

Los análisis inmunohistoquímicos del CPT mutado en *KEAP1* revelaron una sobreexpresión de NRF2 en comparación con el tejido tiroideo benigno adyacente, lo que sugiere un papel potencial de *KEAP1* en la tumorigénesis tiroidea.

Algunos estudios han asociado la activación de la vía *KEAP1* /NRF2 con una enfermedad más agresiva. El hallazgo de mutaciones en *KEAP1* en pacientes con CPT más agresivo plantea la cuestión de si este gen es importante para la tumorigénesis o la agresividad de la enfermedad. En este estudio se identificaron mutaciones *KEAP1* sólo en pacientes con características de mal pronóstico. Observamos una alta frecuencia de metástasis en los ganglios linfáticos (67 %), extensión extratiroidea (67 %) y enfermedad metastásica a distancia en 2 de 5 sujetos (40 %) en un período de seguimiento de 8,8 años.

En el estudio se presupone que la coexistencia de mutaciones BRAF y *KEAP1* en CPT podría contribuir a un mal pronóstico; sin embargo, el escaso número de casos con ambas mutaciones limitó el poder estadístico de este análisis (86).

Recientemente se identificaron mutaciones ocasionales de *NFE2L2* y *KEAP1* como parte de un análisis de secuenciación del exoma completo de cohortes de pacientes con carcinoma de tiroides (CHC) de células de Hürthle (oncocítico) (87,88)

4. ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE *KEAP1* CON PATOLOGÍAS EXTRATIROIDEAS

El silenciamiento del gen *KEAP1* por hipermetilación se ha descrito en varios tipos de cáncer (49). Específicamente, la hipermetilación del gen *KEAP1* se asocia con NRF2 estabilizado y una mayor expresión de los genes diana de NRF2 en cáncer de pulmón (45-89) , colorrectal (50) y de próstata (51). En los cánceres que albergan

dichas alteraciones epigenéticas, el pronóstico suele ser peor porque la evolución del cáncer suele ser más rápida (49). El SNP rs1048290 *KEAP1* genotipo CC y alelo C están asociados con un riesgo incrementado de carcinoma colorrectal (CCR), mientras que los haplotipos rs11545829-rs11545829 GT están asociados con un riesgo reducido de CCR (90). Los SNP en *KEAP1* estaban significativamente relacionados con tuberculosis pulmonar (PTB) en comparación con infección tuberculosa latente (LTBI). En comparación con el alelo rs11545829G, el alelo A tenía un 30% menos de riesgo de desarrollar PTB ($P = 0,034$, $OR = 0,70$, IC del 95 %: 0,51-0,97). El genotipo *KEAP1* rs1048290 GC tuvo un 38% menos de riesgo de desarrollar infección tuberculosa latente (LTBI), en comparación con el genotipo CC (91). Otro estudio sugiere que la mutación *KEAP1* rs11545829 SNP homocigoto AA puede ser un factor protector para el riesgo de DM2, especialmente para pacientes con DM2 con nivel urinario de arsénico total >0.032 mg/L (92). *KEAP1* (rs1048290) se asoció con EPOC en fumadores y no fumadores (93).

5. ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE NRF2 CON PATOLOGÍAS EXTRATIROIDEAS Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES

5.1 Patologías extratiroideas

El polimorfismo rs6726395 en *NRF2* puede contribuir al desarrollo de enfisema asociado a la edad en fumadores (94). El genotipo *NRF2* rs6721961 AA podría estar relacionado con cáncer de mama de aparición temprana (95). En una población finlandesa, los portadores del alelo rs6721961 T ($OR 4,656$; IC 1,35–16,06) y las personas con el alelo rs2706110 A tenían un mayor riesgo de cáncer de mama ($OR 2,079$; IC 1,175–3,679)(96). Los polimorfismos del promotor *NRF2* están significativamente asociados con el desarrollo de inflamación de la mucosa gástrica, ya sea de forma independiente o interactuando con la infección por *H. pylori* (97). En otro estudio rs2706110 G>A en el gen *NFE2L2* y rs1048290 C>G en el gen *KEAP1* mostraron un riesgo significativo y un efecto protector contra epilepsia resistente a

fármacos (DRE), respectivamente. (98). El genotipo GA del polimorfismo NRF2 rs1303586 y genotipo CT del polimorfismo NRF2 rs2706110 se asociaron con disminución de carcinoma de células escamosas faríngeo y laríngeo (99). NRF2 rs2706110 (C>T) también se asoció con un mayor riesgo de enfermedades cerebrovasculares. Sujetos con genotipo TT tenían un riesgo de 4,9 veces en comparación con aquellos con CC ($p=0,017$, IC 1,337-18,227). En este estudio, el genotipo TT se asoció con un mayor riesgo cerebrovascular (100). El metaanálisis de la cohorte extendida (tamaño de caso 1038, incluidos pacientes italianos, malteses y alemanes) identificó alelos de riesgo NRF2 individuales. Mientras que los alelos intrónicos rs7557529 T y rs2886161 C, y el promotor rs35652124 C aumentaron el riesgo de enfermedad de parkinson con una edad más temprana al inicio de la enfermedad, el alelo intrónico rs1806649 T fue protector para la enfermedad de Parkinson (101). Bergström et al demostraron que el haplotipo compuesto NRF2 (rs7557529 C/rs35652124 T/rs6706649 C/rs671961 G/rs2886161 T/rs1806649 C/rs2001350 T) se asoció con una disminución del riesgo de esclerosis lateral amiotrófica esporádica en una cohorte sueca (AAO +4,0 años; CI 1.1 a 7.0) (102). En mujeres japonesas no fumadoras, el alelo T rs6721961 en el promotor NRF2 proximal se asoció significativamente con la susceptibilidad al adenocarcinoma de pulmón ($p = 0,014$)(103).

5.2 Enfermedades autoinmunes

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónica que se encuentra con mayor frecuencia en mujeres que en hombres. Afecta órganos como la piel, las articulaciones, los riñones y el cerebro; la inflamación recurrente puede provocar nefritis de los glomérulos y túbulos de los riñones. El estudio de asociación del genoma completo (GWAS) en humanos identificó un locus de rasgo cuantitativo sugestivo cerca de NRF2 (104). En una población mestiza mejicana de 362 mujeres con LES de inicio en la infancia (212 con nefritis), el genotipo rs35652124 C/T se asoció significativamente con nefritis (OR 1,81; IC 1,04-3,12) (105). Los mismos

SNP no se asociaron estrechamente con el riesgo de LES en una cohorte japonesa (106). El alelo T rs6721961 aumentó el riesgo de vitíligo en una población china Han (OR 2,902; IC 1,624–5,188) (107).

6. IL 10 IMPLICADA EN LA TA Y OTRAS ENFERMEDADES TIROIDEAS

Los polimorfismos genéticos funcionales que alteran la expresión génica de citoquinas son factores genéticos candidatos que podrían modular el desarrollo y progresión de la TA.

IL-10 es una citocina inmunomoduladora que suprime la síntesis de citocinas proinflamatorias y por otra parte es inmunosupresora, lo cual puede facilitar el desarrollo del cáncer al permitir que el tumor escape de la respuesta inmunitaria.

Entre los estudios que relacionan los polimorfismos de dicha citocina IL 10 y el tiroides están los siguientes:

El primer estudio fue diseñado para comparar la distribución del genotipo -1082A/GIL-10 y +1188A/C3'UTRIL-12B en 130 pacientes con TA con un grupo de 157 controles sanos en un intento de determinar una asociación con el desarrollo de HT. La combinación del genotipo AA de 3'UTRIL-12B con GG de -1082IL-10 se asoció con un riesgo tres veces mayor (OR = 3,188; P = 0,022) de desarrollar TA en comparación con individuos con presencia del alelo 3'UTR C (AC+CC) simultáneamente con el genotipo AA de -1082IL-10. En este estudio se observó un riesgo más alto de TA eutiroidea para individuos con genotipo CC. El polimorfismo de IL 10 (rs1800896) mostró una frecuencia significativamente más alta del genotipo GG homocigoto en pacientes con TA frente a los controles (108).

Un metaanálisis mostraba la asociación entre polimorfismos de IL 10 y la enfermedad tiroidea autoinmune. Al estudiar el polimorfismo de IL 10-1082 G/A se encontró una asociación significativa entre la enfermedad tiroidea autoinmune y el

alelo IL 10-1082 G y el genotipo GC+GA. Dicho metaanálisis no mostraba una asociación entre el alelo IL 10 1082 G y la enfermedad tiroidea autoinmune en sujetos del Oriente Medio; sin embargo, se encontró asociación entre dicho alelo en la población asiática(109).

El polimorfismo funcional 592 A/C en el gen IL 10 está asociado con la gravedad de la TA, pero no con los niveles séricos de Ig G4 (110).

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune heterogénea y se asocia frecuentemente con otras enfermedades autoinmunes específicas de órganos, incluida la enfermedad tiroidea autoinmune (ETA). Se sabe que los pacientes diabéticos tipo 1 con ETA muestran características clínicas e inmunológicas distintas de los pacientes sin ETA. Este estudio investigó si los polimorfismos de la región promotora del gen de la interleucina-10 (IL-10) están asociados con la susceptibilidad a la diabetes tipo 1 y ETA. Se analizó la frecuencia de los polimorfismos -1082G/A, -819C/T y -592C/A en 54 pacientes diabéticos tipo 1 con ETA, 74 pacientes diabéticos tipo 1 sin ETA, 124 pacientes no diabéticos con ETA y 107 sujetos sanos en un estudio de casos y controles. No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de alelos y genotipos de tres polimorfismos no sólo en pacientes diabéticos tipo 1 con ETA en comparación con controles normales, sino también entre pacientes no diabéticos con ETA y controles sanos. La distribución de los haplotipos del gen IL-10 también fue similar entre ambos grupos de pacientes y los controles normales. Estos resultados sugieren que los polimorfismos de la región promotora del gen IL-10 no están asociados con la susceptibilidad genética a la diabetes tipo 1 y ETA (111).

En otro estudio se demostró que la frecuencia del alelo IL-10-1082 era mayor entre los pacientes con carcinoma papilar de tiroides (CPT) en los controles sanos. De hecho, los pacientes con genotipo GG IL-10-1082 tienen el doble de riesgo de desarrollar cáncer de tiroides según el genotipo AA. Además, la presencia concomitante del alelo IL-10-1082 G (genotipos GC AG) junto con el genotipo IL-6-174 CG tiene un riesgo casi dos veces mayor de cáncer de tiroides. En este estudio se

sugiere que el alelo IL-10-1082 G está asociado con un mayor riesgo de CPT(112) .

7. IL 10 IMPLICADA EN OTRAS ENFERMEDADES EXTRATIROIDEAS Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES

7.1 Enfermedades extratiroideas

Este estudio sugiere que los polimorfismos rs1800872 y rs1800896 del gen *IL10* están asociados con el cáncer de cuello uterino en mujeres de Bangladesh. Los genotipos CA y AA de rs1800872 aumentaron significativamente el riesgo de cáncer de cérvix. También se observó un aumento del riesgo para el modelo dominante, el modelo recesivo y el modelo de alelos (A vs. C) de rs1800872 (113). Un metaanálisis incluyó 8 estudios que contenían 1393 casos de cáncer de cuello uterino y 1307 controles. Los datos agregados bajo el modelo heterocigoto y el modelo de herencia dominante (OR = 0,66, IC del 95%: 0,55-0,80) indicaron una asociación significativa entre rs1800872 y el bajo riesgo de cáncer de cuello uterino en toda la población. Los datos agregados bajo el modelo de herencia dominante muestran que rs1800872 está significativamente asociado con la reducción del riesgo de tumores cervicales en toda la población. La variante AC/AA + AC de rs1800872 indica un efecto protector en el desarrollo de cáncer de cuello uterino (114). En un metaanálisis se encontró un aumento del riesgo de cáncer de mama asociado con el polimorfismo rs1800872. También se realizó un agrupamiento de los estudios por etnia, pero no se pudo demostrar una asociación del polimorfismo IL-10 rs1800872 con el riesgo de cáncer de mama en asiáticos y caucásicos (115). En otro metaanálisis se incluyeron un total de 23 estudios (7250 casos de cáncer y 7675 controles sin casos). Un mayor riesgo de cáncer de mama en asiáticos se asoció con el polimorfismo IL-10 rs1800872 (AA vs CC: OR = 0,74, IC del 95 % = 0,55-0,99, p = 0,04; A vs C: OR = 0,85, IC del 95 % = 0,74-0,98, p = 0,03). El polimorfismo rs1800872 (A frente a C: OR = 0,65, IC del 95% 0,43-0,98, p = 0,04) se asoció con riesgo de cáncer de mama en caucásicos. Los polimorfismos rs1800871 y rs1800872 (A frente a C) se asociaron con el riesgo de cáncer de mama en caucásicos. Por lo tanto, esto puede proporcionar nuevas ideas

para predecir y diagnosticar la susceptibilidad a cáncer de mama a través de la detección del polimorfismo del gen IL-10 (116). IL-10 rs1800871 e IL-10 rs1800872 pueden estar asociadas con el desarrollo de Adenoma de hipófisis inactiva (117). El polimorfismo rs1800872 se correlacionó significativamente con la DM en los asiáticos. Los hallazgos indican que los polimorfismos rs1800871, rs1800872 y rs1800896 pueden servir como biomarcadores genéticos de DM (118). Los resultados de este estudio mostraron que los genes TNF- α (GA de rs361525 y rs1800629) e IL-10 (AA de rs1800872 y GA de rs1800896) están significativamente relacionados con el desarrollo de DM tipo 2. La presencia de una combinación de genotipos AA-GA para los genes TNF- α e IL-10 elevaba el riesgo de DM2. Además, las personas con haplotipos AAAA, AACA y AAAG experimentan un mayor riesgo de DM tipo 2. En conclusión, existe una asociación significativa entre los polimorfismos del promotor del gen del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-10 y el desarrollo de DM tipo 2 (119). Los análisis de este estudio muestran la asociación entre el cáncer de cuello uterino y el polimorfismo IL-10 c.-592C>A, lo que demuestra que la presencia del alelo A se asocia de forma independiente con mayores riesgos de desarrollo de cáncer de cuello uterino (120).

7.2 Enfermedades autoinmunes

Se ha relacionado el polimorfismo rs1800872 de IL-10 con un aumento del riesgo de Esclerosis Múltiple (121) El riesgo de enfermedad celiaca se asoció con los portadores del alelo T menos frecuente de rs1800871T/C y del alelo A menos frecuente de rs1800872A/C, con un modelo dominante (OR = 2,79; IC del 95 %: 1,27-6,09; p = 0,01) (122). Un metaanálisis mostró que los polimorfismos IL-10 rs1800871, IL-10 rs1800872 e IL-10 rs1800896 pueden influir en la predisposición a la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (123). El presente estudio sugiere que los polimorfismos y los haplotipos IL10 -819(C/T), -1082(G/A) y -592(C/A) están asociados con la susceptibilidad al LES, mayor actividad de la enfermedad y niveles elevados de IL10 (124) Se ha relacionado también que el alelo IL-10 rs1800872 A/C podría aumentar el riesgo de Artritis Reumatoide (AR). El alelo rs1800872 A/C de IL-10 también podría

afectar la reacción inflamatoria de IL-10 en pacientes con AR (125). Los polimorfismos IL-10 -819C/T (rs1800871) y -592C/A (rs1800872) contribuyen a la susceptibilidad a Colitis Ulcerosa (126).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

La Tiroiditis Autoinmune es una enfermedad tiroidea con un aumento de la incidencia en los últimos años y la principal causa de hipotiroidismo en zonas con ingesta suficiente de yodo.

Uno de los principales sistemas antioxidantes endógenos es la vía de señalización centrada en NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) y su inhibidor citoplasmático *KEAP1* (Kelch-like ECH-associated protein 1). En los últimos años se han establecido muchas relaciones entre esta vía de señalización y la fisiopatología tiroidea, además de varias patologías tiroideas incluyendo el bocio, hipotiroidismo, hipertiroidismo y cáncer. Sobre esta base se establece la posibilidad de que polimorfismos de dichos genes estén involucrados en la génesis de la TA.

Se establece también la hipótesis de que polimorfismos de la citocina IL 10 puedan estar implicados en la generación de la TA.

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 genotípicas de los polimorfismos rs1048290 y rs11545829 de *KEAP1*, rs2706110 de *NFE2L2* y rs1800872 de *IL10* entre pacientes con tiroiditis autoinmune y controles sanos, 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 genotípicas 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.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SUJETOS DEL ESTUDIO

1.1 Pacientes

El conjunto de muestras a estudiar está constituido por pacientes diagnosticados de tiroiditis autoinmune que presentaron positividad de anticuerpos antitiroideos (anti-tiroglobulina, anti-peroxidasa, o ambos).

Los pacientes 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.

En este estudio se incluyeron un total de 201 casos de pacientes con tiroiditis autoinmune.

De cada paciente se recogieron 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.
- Presencia coadyuvante de bocio y tamaño de este según la clasificación de la OMS (Organización Mundial de la Salud) (Figura 3).

- Anticuerpos anti-tiroglobulina y anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea. Se recoge el dato como positividad o negatividad sin considerar el valor numérico, dada la heterogeneidad de los estudios de valoración, al modificarse la técnica de detección en el laboratorio en función del año de diagnóstico de los pacientes.
- Función tiroidea en el momento del diagnóstico: Eutiroidismo, hipotiroidismo o hipertiroidismo.

Clasificación de la Organización Mundial de la Salud, 1979	
Grado 0	Sin bocio palpable o palpable menor a la falange terminal del dedo pulgar del examinado
0a	Glándula no palpable
0b	Glándula palpable menor que la falange terminal del dedo pulgar del examinado no visible con el cuello extendido
Grado I	Bocio palpable pero no visible con el cuello en posición normal
Ia	Bocio palpable pero no visible con el cuello extendido
Ib	Bocio palpable visible con el cuello en extensión
Grado II	Bocio fácilmente visible con el cuello en posición normal
Grado III	Bocio visible a distancia

Modificada por Thyly, 1980.

Figura 3: Clasificación de bocio por tamaño según OMS

1.2 Controles

Se emplearon 333 muestras de pacientes sin tiroiditis autoinmune como controles. Estos pacientes tenían una edad superior a 40 años y fueron reclutados por el Servicio de Reumatología en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca entre enero de 1990 y febrero de 2016

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 de sangre periférica fueron obtenidas mediante venopunción en la región antecubital previa firma del consentimiento informado en condiciones estériles en tubos “Venoject” de 10 ml con EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético) y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento. Las muestras fueron enviadas a la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca. Todas estas 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 DNA a partir 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 agua bidestilada (ddH₂O) durante 30 minutos, 1500 rpm, a 4°C). La primera centrifugación de los tubos de sangre periférica da 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, se procedió a lisar los glóbulos rojos con agua bidestilada, y a continuación se lavaron las células mononucleadas con tampón Fornace (50 mM tris (hidroximetil) aminometano ácido clorhídrico- Tris-HCl pH: 7,5, 25 mM cloruro potásico (KCl) y 5 mM cloruro magnésico (MgCl₂)) el cual proporcionó la osmolaridad necesaria para no romper los leucocitos. Se precipitaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos.

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.

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

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 de 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 *ependorf*, 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.

La concentración y el grado de contaminación proteica del ADN se calculó 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 ARNs_a (ribonucleasa) y purificando nuevamente.

La muestra de ADN con una concentración aproximada entre 1000 y 1500 µg/ml se almacenó en tubos *ependorf* 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.

En este trabajo se han estudiado polimorfismos de cambio de un único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) de diversos genes. 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>).

Tabla 1: Resumen de polimorfismos estudiados

GEN	POLIMORFISMO	LOCALIZACIÓN	POSICIÓN	MUTACIÓN
KEAP1	rs1048290	REGIÓN CODIFICANTE	1413	C > G
	rs11545829	REGIÓN CODIFICANTE	1611	C > T
NFE2L2	rs2706110	INTERGÉNICA		C > T
IL10	rs1800872	AGUAS ABAJO DEL TRANSCRITO <i>IL10</i>		T > G

3.1.1 Polimorfismos en el gen KEAP1 (rs1048290) y (rs11545829)

El gen *KEAP1* codifica para la proteína KEAP-1 y se encuentra en el brazo corto

del cromosoma 19, localización 19 p13.2 [OMIM * (Online Mendelian Inheritance in Man). En este trabajo se estudiaron dos polimorfismos rs1048290 y rs11545829. El primero de ellos, se localiza en la región codificante, en la posición 1413 y supone un cambio de C por G. Se trata de una mutación intragénica, en la región exónica, con sustitución de una base mediante transición. En el caso del polimorfismo rs11545829, este se localiza en la región codificante, en la posición 1611 y supone un cambio de C por T. Se trata de una mutación intragénica, en región exónica, con sustitución de una base mediante transición.

3.1.2 Polimorfismo en el gen *NFE2L2* (rs2706110)

El gen *NFE2L2* codifica la proteína NRF2 y se encuentra en el brazo largo del cromosoma 2, localización [OMIM * (Online Mendelian Inheritance in Man). En este trabajo se estudió el SNP rs2706110 localizado en la región intergénica aguas abajo de *NFE2L2*, que supone un cambio de C por T.

3.1.3 Polimorfismo en el gen *IL10* (rs1800872)

El gen *IL10* codifica IL-10 y se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1, localización [OMIM * (Online Mendelian Inheritance in Man). En este trabajo se analizó el SNP rs1800872 localizado aguas arriba del transcrito de *IL10*. Supone un cambio de T por G.

3.2 Estudio de polimorfismos mediante PCR en tiempo real.

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 (Real Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea sobre la misma mezcla sin necesidad de realizarlos por separado. 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 este trabajo se emplearon sondas Taqman® para el estudio de los polimorfismos. 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 3). 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).

Tabla 2: 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	520	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

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).

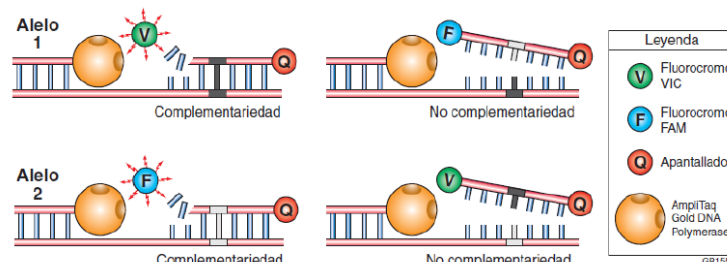


Figura 4: Mecanismo de discriminación alélica mediante sondas Taqman empleando fluorocromos VIC y FAM. Figura tomada de la Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System.

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.

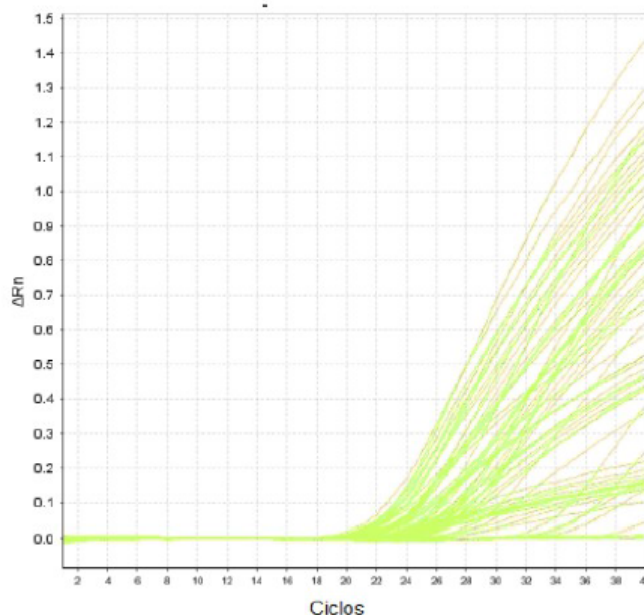


Figura 5: Emisión de fluorescencia en una qRT-PCR a medida que tienen lugar los ciclos de amplificación (StepOne®).

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 realizó 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. 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.
- 2 μ l = 10 ng de ADN (concentración = 10 μ g/ml).

Como control se emplearon pocillos de cada placa con el mismo sustrato, pero sin ADN.

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):

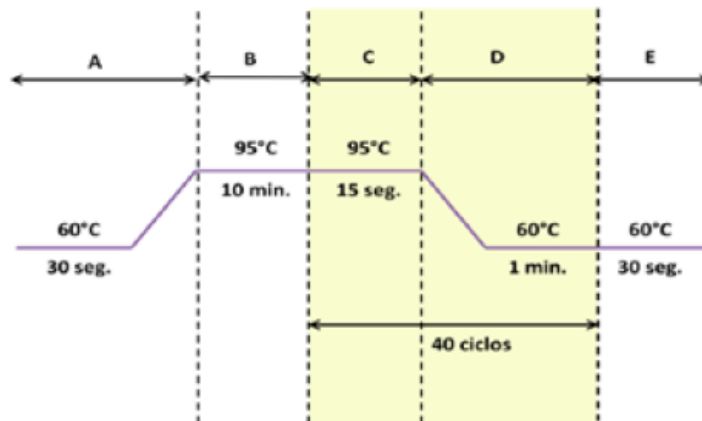


Figura 6: Esquema representativo del programa del termociclador para la realización del genotipado de los polimorfismos en nuestro estudio mediante PCR a tiempo real, donde B es el tiempo de desnaturalización previa, C es el tramo de desnaturalización y anillamiento de los oligonucleótidos y las sonda 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).

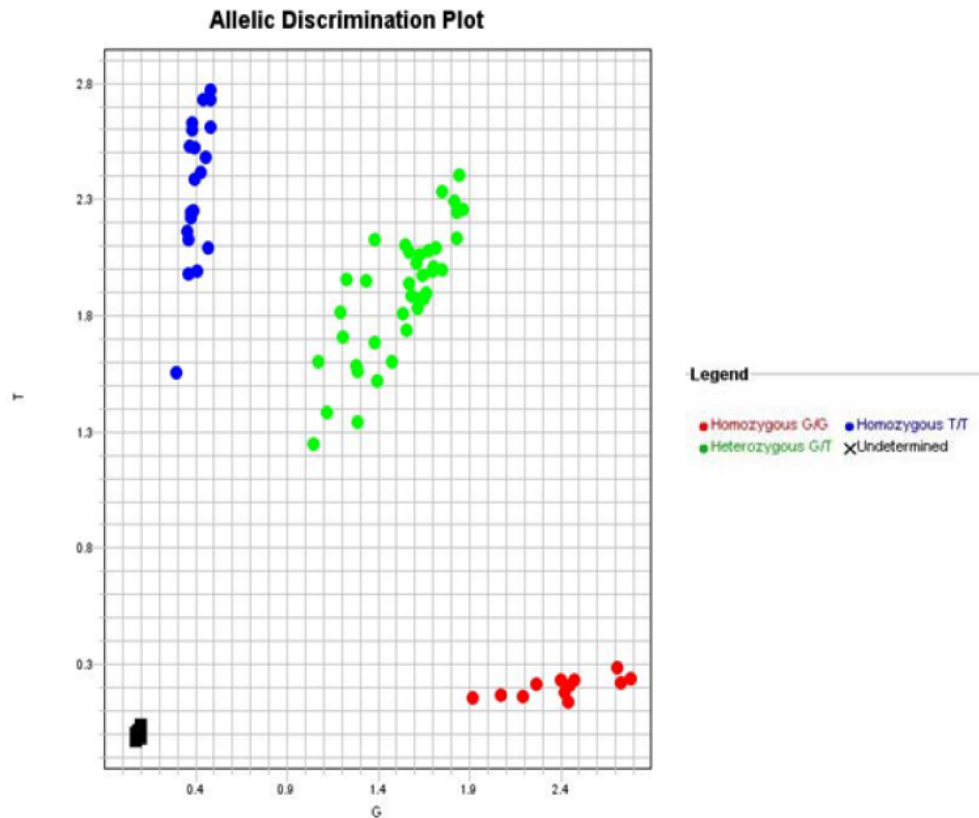


Figura 7: Gráfico de discriminación alélica en el que cada nube de puntos representa a un genotipo: los dos tipos de homocigotos en los extremos y los heterocigotos en el centro. Los cuadrados negros se corresponden con los controles negativos.

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

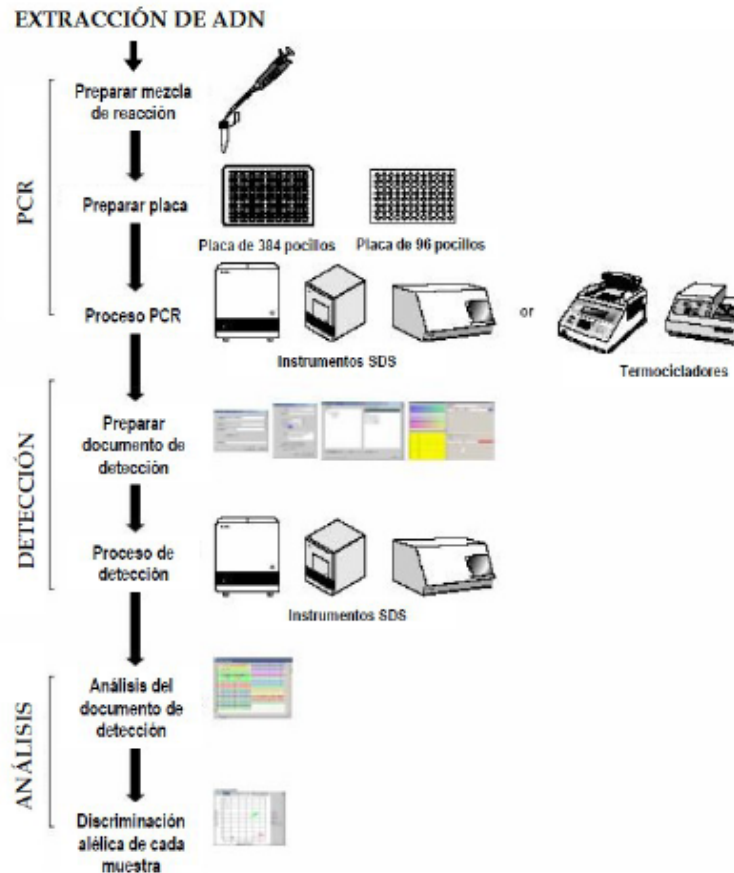


Figura 8: Proceso de discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman®

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo para conocer las características de los sujetos a estudio en lo referente a las variables clínicas referidas. Para las variables cuantitativas se calcularon la media, la mediana y la desviación típica. En el caso de las variables categóricas nominales y ordinales se calculó la proporción de pacientes en cada categoría. Se completó el estudio estadístico con un apartado de estadística inferencial donde se realizaron 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 (194). 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 la existencia de asociación entre alguno de los genotipos o alelos estudiados y los diferentes grupos de comparación en función de las variables clínicas se realizaron tablas de contingencia 3x2 conteniendo las frecuencias de cada uno de los 3 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 los grupos. Para determinar si las diferencias en la distribución genotípica entre los dos grupos eran estadísticamente significativas, y no se debía simplemente al azar, se realizó 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, se realizó 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. En los intervalos de confianza del 95% de los OR, aquellos IC 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 realizaron con el programa informático SPSS, (versión 25.0; SPSS Inc., Chicago, IL). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor asociado a la prueba estadística era 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:

- 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.

RESULTADOS

1. Datos clínicos de los pacientes con TA

En primer lugar, se recogieron los datos clínicos (edad, sexo, antecedentes familiares de TA, consumo de sal yodada, procedencia de una zona endémica de bocio, grado de bocio, función y autoinmunidad tiroidea) de los individuos que formaban el grupo de casos. Este grupo está constituido por 201 pacientes diagnosticados de TA que presentaron positividad de anticuerpos antitiroideos (anti-tiroglobulina, anti-peroxidasa, o ambos) cuyas características clínicas se describen a continuación.

1.1 Edad

La media de edad de los pacientes de nuestro estudio fue de 40 años.

1.2 Sexo

De todos los pacientes con TA, 192 (96%) eran mujeres y 9 (4%) hombres (Tabla 4, Figura 9).

Tabla 3: Distribución de los pacientes de acuerdo con el sexo

SEXO	%	N
MUJER	96	192
HOMBRE	4	9

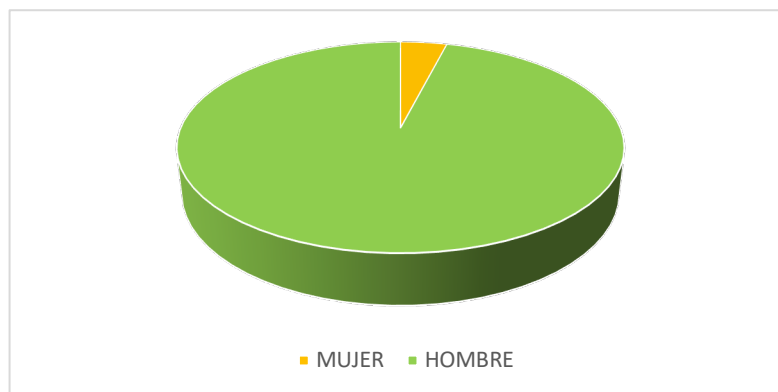


Figura 9: Distribución de los pacientes de acuerdo con el sexo

1.3 Antecedentes familiares

Del total de pacientes, 110 (55%) presentaban antecedentes familiares de patología tiroidea, mientras que 74 (37%) no los tenían y 17 (8%) lo desconocían o no estaba recogido en la historia clínica. Los datos se recogen en la tabla 5 y en la figura 8.

Tabla 4: Distribución de los pacientes de acuerdo con los antecedentes familiares

ANTECEDENTES FAMILIARES DE PATOLOGÍA TIROIDEA	%	N
SÍ	55	110
NO	37	74
DESCONOCIDO	8	17

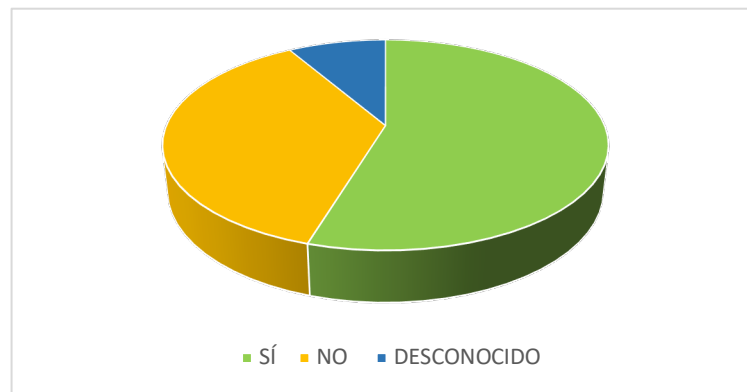


Figura 10: Distribución de los pacientes de acuerdo con los antecedentes familiares

1.4 Consumo de sal yodada

En referencia al consumo de sal yodada, 49 pacientes (25%) consumían este tipo de sal, mientras que 57 pacientes (28%) no la consumían y 95 (47%) lo desconocían o no aparecía recogido en la historia clínica. Los datos quedan recogidos en la tabla 6 y la figura 9.

Tabla 5: Distribución de los pacientes de acuerdo con el consumo de sal yodada

CONSUMO SAL YODADA	%	N
SÍ	25	49

NO	28	57
DESCONOCIDO	47	95

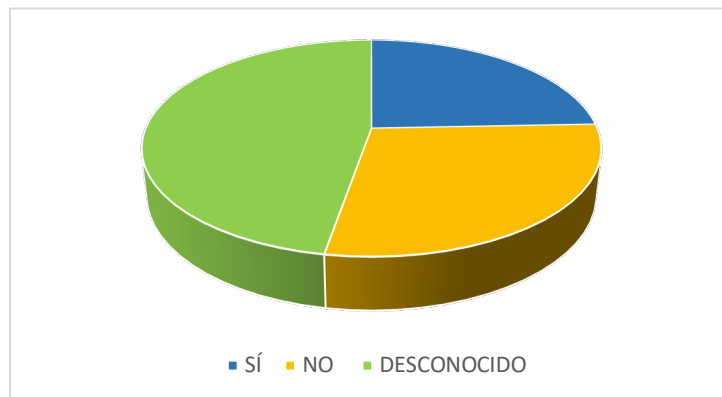


Figura 11: Distribución de los pacientes de acuerdo con el consumo de sal yodada

1.5 Procedencia de zona endémica

Respecto a si han residido en zona endémica de bocio, como se muestra en la tabla 7, un total de 112 pacientes (56%) no proceden de estas regiones, mientras que 67 (33%) lo desconocen y sólo 22 pacientes (11%) proceden de una zona endémica de bocio. Los datos quedan recogidos en la tabla 7 y la figura 10.

Tabla 6: Distribución de los pacientes de acuerdo con la procedencia de zona endémica

ZONA ENDÉMICA	%	N
SÍ	11	22
NO	56	112
DESCONOCIDO	33	67

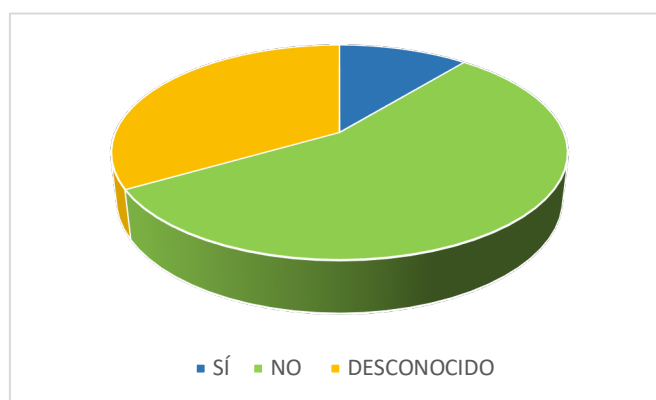


Figura 12: Distribución de los pacientes de acuerdo con la procedencia de zona endémica

1.6 Grado de bocio

El grado de bocio se confirmó por exploración tiroidea y mediante realización de ecografía tiroidea. De los 201 pacientes, 54 (27%) no tenían bocio, 5 pacientes (5%) tenían un bocio grado 0a, 47 pacientes (23%) presentaban un bocio grado 0b, 54 pacientes (27%) tenían un bocio grado I, 31 pacientes (15%) tenían un bocio grado II, 2 pacientes (1%) tenían un bocio grado III y un solo paciente (1%) tenían un nódulo único como se refleja en la tabla 8 y en la figura 11.

Tabla 7: Distribución de los pacientes de acuerdo con el grado de bocio

BOCIO	%	N
No bocio	27	54
Oa	5	10
Ob	23	47
I	27	54
II	15	31
III	1	2
Nódulo único	1	3

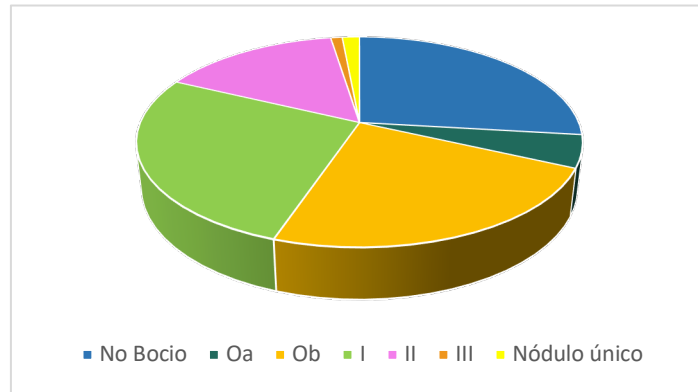


Figura 13: Distribución de los pacientes de acuerdo con el grado de bocio

1.7 Función tiroidea

En cuanto a la distribución de los 201 pacientes de acuerdo con la función tiroidea, 28 pacientes (14%) estaban eutiroideos, 166 pacientes (83%) estaban hipotiroideos mientras que 7 pacientes (3%) estaban hipertiroideos. Estos resultados quedan recogidos en la tabla 9 y la figura 12.

Tabla 8: Distribución de los pacientes de acuerdo con la función tiroidea

FUNCIÓN TIROIDEA	%	N
EUTIROIDEO	14	28
HIPOTIROIDEO	83	166
HIPERTIROIDEO	3	7

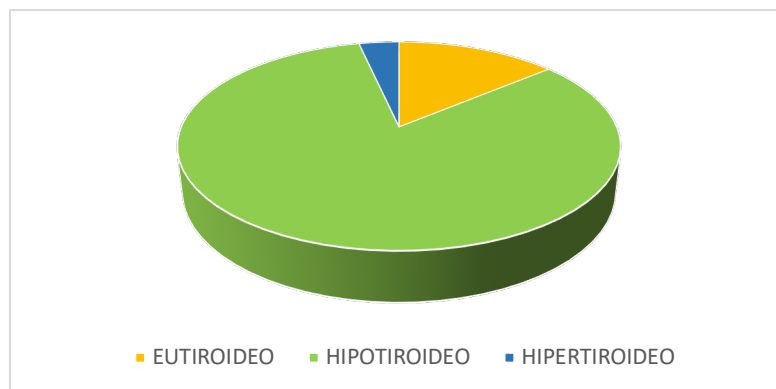


Figura 14: Distribución de los pacientes de acuerdo con la función tiroidea

1.8 Autoinmunidad tiroidea

1.8.1 Anticuerpos anti-tiroglobulina

Respecto a los anticuerpos anti-tiroglobulina, 123 pacientes (61%) presentaban positividad para los mismos, mientras que 75 pacientes (37%) eran negativos y tan solo en 1 paciente (1%) no estaban disponibles. Los resultados se reflejan en la tabla 10 y en la figura 13.

Tabla 9: Distribución de los pacientes de acuerdo con los Ac anti TG

AC ANTI TG	%	N
POSITIVOS	61	123
NEGATIVOS	37	75
NO DISPONIBLE	1	3

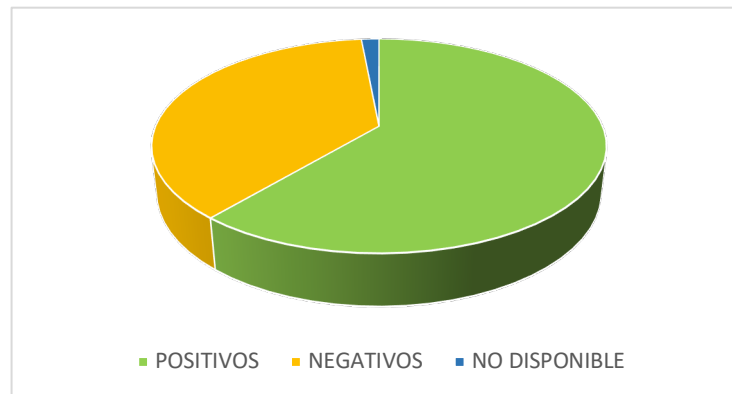


Figura 15: Distribución de los pacientes de acuerdo con los Ac anti TG

1.8.2 Anticuerpos anti TPO

Respecto a los anticuerpos anti TPO 190 paciente (95%) presentaban positividad para los mismos, mientras que en 10 pacientes (5%) eran negativos y tan solo en 1 (0%) paciente no estaban disponibles. Como se refleja en la tabla 11 y en la figura 14.

Tabla 10: Distribución de los pacientes de acuerdo con los Ac anti TPO

AC ANTI TPO	%	N
SÍ	95	190
NO	5	10
NO DISPONIBLE	0	1

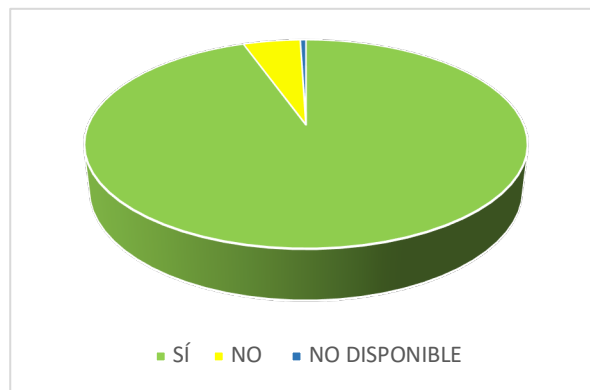


Figura 16: Distribución de los pacientes de acuerdo con los Ac anti TPO

2. Datos clínicos comparados

2.1 Antecedentes familiares y autoinmunidad

Del total de pacientes un 55% tenían antecedentes familiares, mientras que un 37% no los tenían y un 8% lo desconocían. De los pacientes con antecedentes familiares un 94% tenían Ac anti TPO positivos, mientras que un 6% los tenían negativos. Y un 63% tenían Ac anti TG positivos, un 36% los tenían negativos y un 1% no fueron determinados. De los pacientes sin antecedentes familiares un 95% tenían

Ac anti TPO positivos, un 4% los tenían negativos y un 1% no fueron determinados. Y un 34% tenían Ac anti TG positivos, un 64% los tenían negativos y un 3% no fueron determinados. La positividad de los ac anti TPO era similar entre los pacientes con y sin antecedentes familiares, mientras que los pacientes con antecedentes familiares tenían en mayor porcentaje positividad de los Ac anti TG.

Tabla 11: Distribución de los pacientes por antecedentes familiares

ANTECEDENTES FAMILIARES	
TOTAL	201
SÍ	110 (55%)
NO	74 (37%)
DESCONOCIDO	17 (8%)

Tabla 12: Distribución de los pacientes con antecedentes familiares y relación con autoinmunidad

CON ANTECEDENTES FAMILIARES Y AUTOINMUNIDAD	
AC ANTI TPO POSITIVOS	103 (94%)
AC ANTI TPO NEGATIVOS	7 (6%)
AC ANTI TG POSITIVOS	69 (63%)
AC ANTI TG NEGATIVOS	40 (36%)
NO DETERMINADOS	1 (1%)

Tabla 13: Distribución de los pacientes sin antecedentes familiares y relación con autoinmunidad

SIN ANTECEDENTES FAMILIARES Y AUTOINMUNIDAD	
AC ANTI TPO POSITIVOS	70 (95%)
AC ANTI TPO NEGATIVOS	3 (4%)
NO DETERMINADOS	1 (1%)
AC ANTI TG POSITIVOS	25 (34%)
AC ANTI TG NEGATIVOS	47 (64%)
NO DETERMINADOS	2 (3%)

2.2 Consumo de yodo y autoinmunidad

De los pacientes que reconocían consumir yodo que eran un 24%, un 94% tenían Ac anti TPO positivos y un 6% tenían Ac anti TPO negativos. Por otro lado, un 65% tenían Ac anti TG positivos, mientras que un 33% eran negativos y un 2% no determinados. De acuerdo con nuestros datos parece que el consumo de yodo se relaciona con mayor positividad de los Ac anti TPO y los Ac anti TG. De los pacientes

que reconocían consumir yodo que eran un 28%, un 98% tenían Ac anti TPO positivos y un 2% tenían Ac anti TPO negativos. Por otro lado, un 65% tenían Ac anti TG positivos, mientras que un 35% eran negativos. El porcentaje de positividad de Ac anti TPO y Ac anti TG era similar entre los pacientes que consumían yodo y los que no lo consumían

Tabla 14: Distribución de los pacientes con consumo de yodo y relación con autoinmunidad

NO CONSUMO DE SAL YODADA Y AUTOINMUNIDAD	
AC ANTI TPO POSITIVOS	AC ANTI TPO NEGATIVOS
56 (98%)	1 (2%)
AC ANTI TG POSITIVOS	AC ANTI TG NEGATIVOS
37 (65%)	20 (35%)

Tabla 15: Distribución de los pacientes sin consumo de yodo y relación con autoinmunidad

CONSUMO DE YODO Y AUTOINMUNIDAD		
AC ANTI TPO POSITIVOS	AC ANTI TPO NEGATIVOS	
46 (94%)	3 (6%)	
AC ANTI TG POSITIVOS	AC ANTI TG NEGATIVOS	NO DETERMINADOS
32 (65%)	16 (33%)	1 (2%)

2.3 Grado de bocio y consumo yodo

Con respecto del grado de bocio atendiendo a ese 24% de pacientes que sí consumían sal yodada un 39% no tenían bocio, un 27% tenían bocio grado I, un 27% tenían bocio grado II, un 2% bocio grado III, mientras que un 6% tenían un tiroides nodular. Del 54% que no consumían sal yodada un 51% no tenían bocio, un 33% tenían un bocio grado I, un 16% tenían un bocio grado II, y ninguno tenían un bocio grado III y tiroides nodular. Entre los pacientes que consumían sal yodada había un porcentaje menor de pacientes sin bocio que en los que no consumían sal yodada.

Tabla 16: Distribución de los pacientes con consumo de yodo y relación con grado de bocio

GRADO DE BOCIO Y CONSUMO DE SAL YODADA A DIARIO Y OCASIONAL	
SÍ CONSUMO	49 (24%)
NO BOCIO	19 (39%)
BOCIO I	13 (26%)
BOCIO II	13 (27%)
BOCIO III	1 (2%)
NODULAR	3 (6%)

Tabla 17: Distribución de los pacientes sin consumo de yodo y relación con grado de bocio

GRADO DE BOCIO Y NO CONSUMO DE SAL YODADA	
NO CONSUMO	57 (54%)
NO BOCIO	29 (51%)
BOCIO I	19 (33%)
BOCIO II	9 (16%)
BOCIO III	0 (0%)
NODULAR	0 (0%)

2.4 Grado de bocio y procedencia de zona endémica

Respecto a la procedencia de zona endémica del 16% que procedían de zona endémica un 45% no tenían bocio, un 41% tenían un bocio grado I, un 9% tenían un bocio grado II, ninguno tenía un bocio grado III y un 5% tenían un tiroides nodular. Mientras que del 84% que no procedían de zona endémica, un 49% no tenían bocio, un 29% tenían un bocio grado I, un 18% tenían un bocio grado II, un 2% tenían un bocio grado III y un 2% tenían un tiroides nodular. De los que procedían de zona endémica un 45% no tenían bocio, mientras que un 50% tenían bocio. Es decir, había un mayor porcentaje de pacientes con bocio en los que procedían de zona endémica. Los pacientes que no procedían de zona endémica tenían un porcentaje de bocio y no bocio igual del 49%.

Tabla 18: Distribución de los pacientes procedentes de zona endémica y relación con grado de bocio

PROCEDENCIA DE ZONA ENDÉMICA			
SÍ	22 (16%)	NO	112 (84%)
NO BOCIO	10 (45%)	NO BOCIO	55 (49%)
BOCIO I	9 (41%)	BOCIO I	33 (29%)
BOCIO II	2 (9%)	BOCIO II	20 (18%)
BOCIO III	0 (0%)	BOCIO III	2 (2%)
NODULAR	1 (5%)	NODULAR	2 (2%)

2.5 Consumo de yodo y función tiroidea

Si establecemos una relación entre el consumo de yodo y la función tiroidea del 46% que consumen sal yodada, un 14% tenían función tiroidea normal, un 2% estaban hipertiroideos, un 59% tenían un hipotiroidismo subclínico y un 24% tenían un hipotiroidismo primario. Del 54% que no consumían sal yodada, un 16% estaban eutiroides, un 7% estaban hipertiroideos, un 60% manifestaban hipotiroidismo subclínico y un 18% un hipotiroidismo primario. Los pacientes que consumían yodo tenían mayor porcentaje de hipotiroidismo que aquellos que no consumían yodo.

Tabla 19: Distribución de los pacientes con consumo de yodo y relación con la función tiroidea

CONSUMO DE YODO Y FUNCIÓN TIROIDEA	
SÍ CONSUMO	49 (46%)
EUTIROIDEO	7 (14%)
HIPERTIROIDISMO	1 (2%)
HIPOTIROIDISMO SUBCLÍNICO	29 (59%)
HIPOTIROIDISMO PRIMARIO	12 (24%)

Tabla 20: Distribución de los pacientes sin consumo de yodo y relación con la función tiroidea

NO CONSUMO DE YODO Y FUNCIÓN TIROIDEA	
NO CONSUMO	57 (54%)
EUTIROIDEO	9 (16%)
HIPERTIROIDISMO	4 (7%)
HIPOTIROIDISMO SUBCLÍNICO	34 (60%)
HIPOTIROIDISMO PRIMARIO	10 (18%)

2.6 Grado de bocio y función tiroidea

Si relacionamos la función tiroidea con el grado de bocio del 3% que estaban hipertiroideos un 14% no presentaban bocio, un 29% tenían un bocio grado I, un 43% tenían un bocio grado II, ninguno de los pacientes hipertiroideos tenía un bocio grado III y un 14% tenían un tiroides nodular. Del 14% de pacientes eutiroideos un 36% no tenían bocio, un 36% tenían un bocio grado I, un 29% tenían un bocio grado II, ningún paciente tenía un bocio grado III y tiroides nodular. Del 59% con hipotiroidismo subclínico, un 64% no tenían bocio, un 23% tenían un bocio grado I, un 12% tenían un bocio grado II, ningún paciente tenía un bocio grado III y un 2% tenían un tiroides nodular. Del 24% con hipotiroidismo primario un 49% no tenían bocio, un 35% tenían un bocio grado I, un 12% tenían un bocio grado II, un 4% tenían un bocio grado III y ningún paciente tenía un tiroides nodular. Los pacientes que estaban hipertiroideos tenían un 72% de bocio, los eutiroideos tenían un porcentaje de bocio del 18%, ese porcentaje se elevaba al 35% en los que tenían un hipotiroidismo subclínico y al 51% en los que tenían un hipotiroidismo primario.

Tabla 21: Distribución de los pacientes hipertiroideos y relación con el grado de bocio

FUNCIÓN TIRODEA Y GRADO DE BOCIO	
HIPERTIROIDEOS	7 (3%)
NO BOCIO	1 (14%)
BOCIO I	2 (29%)
BOCIO II	3 (43%)
BOCIO III	0 (0%)
NODULAR	1 (14%)

Tabla 22: Distribución de los pacientes eutiroideos y relación con el grado de bocio

FUNCIÓN TIRODEA Y GRADO DE BOCIO	
EUTIROIDEOS	28 (14%)
NO BOCIO	10 (36%)
BOCIO I	10 (36%)
BOCIO II	8 (29%)
BOCIO III	0 (0%)
NODULAR	0 (0%)

Tabla 23: Distribución de los pacientes con hipotiroidismo subclínico y relación con el grado de bocio

FUNCIÓN TIRODEA Y GRADO DE BOCIO	
HIPOTIROIDISMO SUBCLÍNICO	118 (59%)
NO BOCIO	75 (64%)
BOCIO I	27 (23%)
BOCIO II	14 (12%)
BOCIO III	0 (0%)
NODULAR	2 (2%)

Tabla 24: Distribución de los pacientes con hipotiroidismo primario y relación con el grado de bocio

FUNCIÓN TIRODEA Y GRADO DE BOCIO	
HIPOTIROIDISMO PRIMARIO	49 (24%)
NO BOCIO	24 (49%)
BOCIO I	17 (35%)
BOCIO II	6 (12%)
BOCIO III	2 (4%)
NODULAR	0 (0%)

2.7 Función tiroidea y autoinmunidad

Estableciendo una relación entre la función tiroidea y la autoinmunidad del 14% de pacientes eutiroideos un 89% tenían Ac anti TPO positivos, un 11% negativos, un 57% tenían Ac anti TG positivos y un 43% tenían Ac anti TG negativos, un 46% tenían ambos positivos, mientras que ningún paciente tenía ambos anticuerpos negativos. Del 3% de pacientes hipertiroideos un 100% tenían Ac anti TPO positivos, ninguno tenía Ac anti TPO negativos, un 86% tenían Ac anti TG positivos y un 14% tenían Ac anti TG negativos, un 86% tenían ambos positivos, mientras que ningún paciente tenía ambos anticuerpos negativos. Del 58% de pacientes con hipotiroidismo subclínico un 97% tenían Ac anti TPO positivos, un 3% negativos, un 63% tenían Ac anti TG positivos y un 35% tenían Ac anti TG negativos, un 2% no fueron determinados, un 62% tenían ambos positivos, mientras que ningún paciente tenía ambos anticuerpos negativos. Del 24% de pacientes con hipotiroidismo primario un 90% tenían Ac anti TPO positivos, un 8% negativos y un 2% no determinados, un 63% tenían Ac anti TG positivos y un

35% tenían Ac anti TG negativos, un 2% no fueron determinados, un 57% tenían ambos positivos, mientras que un 2% tenían ambos anticuerpos negativos.

Tabla 25: Distribución de los pacientes hipertiroides y relación con la autoinmunidad

FUNCIÓN TIRODEA Y AUTOINMUNIDAD	
HIPERTIROIDEOS	7 (3%)
AC ANTI TPO POSITIVOS	7 (100%)
AC ANTI TPO NEGATIVOS	0 (0%)
AC ANTI TG POSITIVOS	6 (86%)
AC ANTI TG NEGATIVOS	1 (14%)
AMBOS POSITIVOS	6 (86%)
AMBOS NEGATIVOS	0 (0%)

Tabla 26: Distribución de los pacientes eutiroideos y relación con la autoinmunidad

FUNCIÓN TIRODEA Y AUTOINMUNIDAD	
EUTIROIDEO	28 (14%)
AC ANTI TPO POSITIVOS	25 (89%)
AC ANTI TPO NEGATIVOS	3 (11%)
AC ANTI TG POSITIVOS	16 (57%)
AC ANTI TG NEGATIVOS	12 (43%)
AMBOS POSITIVOS	13 (46%)
AMBOS NEGATIVOS	0 (0%)

Tabla 27: Distribución de los con hipotiroidismo subclínico y relación con la autoinmunidad

FUNCIÓN TIRODEA Y AUTOINMUNIDAD	
HIPOTIROIDISMO SUBCLÍNICO	117 (58%)
AC ANTI TPO POSITIVOS	114 (97%)
AC ANTI TPO NEGATIVOS	3 (3%)
AC ANTI TG POSITIVOS	74 (63%)
AC ANTI TG NEGATIVOS	41 (35%)
NO DETERMINADO	2 (2%)
AMBOS POSITIVOS	72 (62%)
AMBOS NEGATIVOS	0 (0%)

Tabla 28: Distribución de los con hipotiroidismo primario y relación con la autoinmunidad

FUNCIÓN TIRODEA Y AUTOINMUNIDAD	
HIPOTIROIDISMO PRIMARIO	49 (24%)
AC ANTI TPO POSITIVOS	44 (90%)
AC ANTI TPO NEGATIVOS	4 (8%)
NO DISPONIBLE	1 (2%)
AC ANTI TG POSITIVOS	31 (63%)
AC ANTI TG NEGATIVOS	17 (35%)
NO DISPONIBLE	1 (2%)
AMBOS POSITIVOS	28 (57%)
AMBOS NEGATIVOS	1 (2%)

3. Análisis genético de polimorfismos en los genes *KEAP1*, *NFE2L2* e *IL10* en pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos.

Una vez recogidos los datos clínicos de los pacientes con TA se procedió al estudio de distintos polimorfismos en los genes *KEAP1* (rs1048290, rs11545829), *NFE2L2* (rs2706110) e *IL10* (rs1800872) y se comparó la frecuencia de cada uno de los genotipos de estos polimorfismos en pacientes con un grupo de sujetos sin esta enfermedad. Los resultados de cada uno de estos polimorfismos se detallan a continuación.

2.1 Estudio de polimorfismos en el gen *KEAP1* en pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos

2.1.1 Análisis del polimorfismo rs1048290 del gen *KEAP1* en individuos con tiroiditis autoinmune e individuos sanos

En la tabla 29 se analiza la distribución genotípica del polimorfismo rs1048290 en los pacientes e individuos sanos y se observó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$). Analizando la distribución de los alelos C y G en estos grupos tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con TA e individuos sanos.

Tabla 29: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs1048290 del gen *KEAP1* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune (casos) e individuos sanos (controles).

SNP	Genotipo	Controles	Pacientes	p-valor	OR (95% IC)
KEAP1 (rs1048290)	CC	37 (11%)	23 (11,5%)	0,452	-
	GC	149 (44,5%)	99 (49,5%)		
	GG	149 (44,5%)	78 (39%)		
	CC+GC	186 (55,5%)	122 (61%)	0,250	0,798 (0,559-1,140)
	GG	149 (44,5%)	78 (39%)		
	CC	37 (11%)	23 (11,5%)	0,984	0,956 (0,550-1,661)
	CG+GG	298 (89%)	177 (88,5%)		
	C	223 (33,3%)	145 (36,3%)	0,357	0,877 (0,677-1,137)
G	447 (66,7%)	255 (63,8%)			

2.1.2 Análisis del polimorfismo rs11545829 del gen *KEAP1* en individuos con tiroiditis autoinmune e individuos sanos

En la tabla 30 se recoge la distribución genotípica del polimorfismo rs11545829 del gen *KEAP1*. Comparando la distribución genotípica entre pacientes con TA e individuos sanos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,034$) entre estos grupos. En concreto, el genotipo CC apareció en el 100% de los controles sanos mientras que aparecía en el 94,5% de los pacientes con TA. El genotipo TC no apareció en ninguno de los individuos sin la enfermedad; sin embargo, se encontró en 8 de los pacientes (4%). Por último, el genotipo TT no se encontró en ninguno de los controles y sí en 3 pacientes (1,5%).

En el estudio de dominancia, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,022$) entre los individuos sanos y los pacientes con TA, observándose cómo el genotipo TC+TT podría conferir riesgo al encontrarse en 11 pacientes (5,5%) y en ninguno de los controles.

Por último, se estudió la distribución alélica de este polimorfismo en estos grupos encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0,008$). Con estos resultados, se observa como el alelo T podría conferir riesgo para TA al encontrarse en 14 pacientes (3,5%) y ninguno de los controles.

Tabla 30: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs11545829 del gen *KEAP1* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune (casos) e individuos sanos (controles).

SNP	Genotipo	Controles	Pacientes	p-valor	OR (95 IC)
KEAP1 (rs11545829)	CC	119 (100%)	189 (94,5%)	0,034	-
	TC	0 (0%)	8 (4%)		
	TT	0 (0%)	3 (1,5%)		
	CC+TC	119 (100%)	197 (98,5%)	0,46	-
	TT	0 (0%)	3 (1,5%)		
	CC	119 (189%)	189 (94,5%)	0,022	-
	TC+TT	0 (0%)	11 (5,5%)		
	C	238 (100%)	386 (96,5%)	0,008	-
T	0 (0%)	14 (3,5%)			

2.2 Estudio del polimorfismo rs2706110 en el gen *NFE2L2* en pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos

En la tabla 31 se recoge la distribución genotípica y alélica del polimorfismo rs2706110 del gen *NFE2L2* en pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos. Como se puede observar en las distintas tablas, no existen diferencias significativas entre ambos grupos, encontrándose frecuencias genotípicas y alélicas similares entre individuos con o sin esta patología.

Tabla 31: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs2706110 del gen *NFE2L2* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune (casos) e individuos sanos (controles).

SNP	Genotipo	Controles	Pacientes	p-valor	OR (95% CI)
NRF2 (rs2706110)	TT	206 (61,5%)	121 (60,8%)	0,747	-
	CT	121 (36,1%)	71 (35,7%)		
	CC	8 (2,4%)	7 (3,5%)		
	TT+CT	327 (97,6%)	192 (96,5%)	0,622	1,490 (0,532-4,174)
	CC	8 (2,4%)	7 (3,5%)		
	TT	206 (61,5%)	121 (60,8%)	0,947	1,029 (0,718-1,475)
	CT+CC	129 (38,5%)	78 (39,2%)		
	T	533 (79,6%)	313 (69,6%)	0,783	1,057 (0,779-1,443)
C	137 (20,4%)	137 (21,4%)			

2.3 Análisis del polimorfismo rs1800872 en el gen *IL10* en pacientes con tiroiditis autoinmune e individuos sanos

En la tabla 32 se muestra la distribución genotípica y alélica del polimorfismo en los pacientes y los individuos sanos. Comparando la frecuencia de cada genotipo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. En el caso de la distribución alélica de los alelos C y G, se encontraron frecuencias similares entre ambos grupos.

Tabla 32: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs1800872 del gen *IL10* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune (casos) e individuos sanos (controles).

SNP	Genotipo	Controles	Pacientes	p-valor	OR (95% CI)
<i>IL10</i> (rs1800872)	GG	141 (57,1%)	115 (57,2%)	0,267	-
	TG	94 (38,1%)	69 (34,3%)		
	TT	12 (4,9%)	17 (8,5%)		
	GG+TG	235 (95,1%)	184 (91,5%)	0,178	1,809 (0,843-3,883)
	TT	12 (4,9%)	17 (8,5%)		
	GG	141 (57,1%)	115 (57,2%)	0,945	0,995 (0,683-1,449)
	TG+TT	106 (42,9%)	86 (42,8%)		
	G	376 (76,1%)	299 (74,4 %)	0,602	1,098 (0,809-1,489)
T	118 (23,9%)	103 (25,6%)			

4. Análisis de los polimorfismos en los genes *KEAP1*, *NFE2L2* e *IL10* en pacientes con tiroiditis autoinmune atendiendo a los datos clínicos

3.1 Estudio de los polimorfismos en los genes *KEAP1*, *NFE2L2* e *IL10* en pacientes con tiroiditis autoinmune con bocio e individuos sanos

Una vez estudiado la distribución genotípica y alélica de los distintos polimorfismos en pacientes e individuos sanos, se estudió si podría existir alguna diferencia entre los distintos polimorfismos en pacientes con TA con bocio e individuos sin la enfermedad. Como se observa en la tabla 33, existen diferencias

estadísticamente significativas ($p=0,034$) entre pacientes con TA y bocio e individuos sanos. El genotipo TC+TT podría conferir riesgo frente a la aparición de TA con bocio ($p=0,032$) dado que se encuentra en 5 pacientes (5,6%) y en ninguno de los controles.

En el análisis de la distribución alélica también se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0,007$). El alelo T podría conferir riesgo frente al desarrollo de TA con bocio estando presente en 7 pacientes (3,9%) y ninguno de los controles. Para los polimorfismos de los genes *NFE2L2*, de *IL10* y el polimorfismo rs1048290 de *KEAP1* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la distribución genotípica o alélica en pacientes con TA y bocio e individuos sanos (Tablas 34,35 y 36).

Tabla 33: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs11545829 del gen *KEAP1* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune con bocio (casos) e individuos sanos (controles).

SNP	Genotipo	Bocio	Controles	p-valor	OR (95% IC)
KEAP1 (rs11545829)	CC	85 (94,4%)	119 (100%)	0,034	-
	TC	3 (3,3%)	0 (0%)		
	TT	2 (2,2%)	0 (0%)		
	CC+TC	88 (97,8%)	119 (100%)	0,359	-
	TT	2 (2,2%)	0 (0%)		
	CC	85 (94,4%)	119 (100%)	0,032	-
	TC+TT	5 (5,6%)	0 (0%)		
	C	173 (96,1%)	238 (100%)	0,007	-
T	7 (3,9%)	0 (0%)			

Tabla 34: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs1048290 del gen *KEAP1* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune con bocio (casos) e individuos sanos (controles).

SNP	Genotipo	Bocio	Controles	p-valor	OR (95% IC)
KEAP1 (rs1048290)	CC	34 (38,2%)	149 (44,5%)	0,262	-
	GC	48 (53,9%)	149 (44,5%)		
	GG	7 (7,9%)	37 (11%)		
	CC+GC	82 (92,1%)	298 (89%)	0,497	1,454 (0,625-3,383)
	GG	7 (7,9%)	37 (11%)		
	CC	34 (38,2%)	149 (44,5%)	0,346	0,772 (0,478-1,246)
	CG+GG	55 (61,8%)	186 (55,5%)		
	C	116 (65,2%)	447 (66,7%)	0,765	0,933 (0,659-1,322)
G	62 (34,8%)	223 (33,3%)			

Tabla 35: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs2706110 del gen *NFE2L2* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune con bocio (casos) e individuos sanos (controles)

SNP	Genotipo	Bocio	Controles	p-valor	OR (95% IC)
<i>NFE2L2</i> (rs2706110)	TT	2 (2,2%)	8 (2,4%)	0,992	-
	CT	33 (36,7%)	121 (36,1%)		
	CC	55 (61,1%)	206 (61,5%)		
	TT+CT	35 (38,9%)	129 (38,5%)	1	1,016 (0,630-1,638)
	CC	55 (61,1%)	206 (61,5%)		
	TT	2 (2,2%)	8 (2,4%)	1	0,929 (0,194-4,453)
	CT+CC	88 (97,8%)	327 (97,6%)		
	T	37 (20,6%)	137 (20,4%)	1	1,007 (0,670-1,513)
C	143 (79,4%)	533 (79,6%)			

Tabla 36: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs1800872 del gen *IL10* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune con bocio (casos) e individuos sanos (controles).

SNP	Genotipo	Bocio	Controles	p-valor	OR (95% IC)
<i>IL10</i> (rs1800872)	GG	54 (60%)	141 (57,1%)	0,822	-
	TG	31 (34,4%)	94 (38,1%)		
	TT	5 (5,6%)	12 (4,9%)		
	GG+TG	85 (94,4%)	235 (95,1%)	1	0,868 (0,297-2,537)
	TT	5 (5,6%)	12 (4,9%)		
	GG	54 (60%)	141 (57,1%)	0,723	1,128 (0,690-1,843)
	TG+TT	36 (40%)	106 (42,9%)		
	G	139 (77,2%)	376 (76,1%)	0,843	1,064 (0,710-1,595)
T	41 (22,8%)	118 (23,9%)			

3.2 Estudio de los polimorfismos en los genes *KEAP1*, *NFE2L2* e *IL10* en pacientes con tiroiditis autoinmune sin bocio e individuos sanos

A continuación, se estudió si podrían existir diferencias entre los pacientes con TA sin bocio e individuos sin la enfermedad para los diferentes polimorfismos estudiados.

Como se observa en la tabla 37, existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,035$) entre pacientes con TA sin bocio e individuos sanos. En el análisis de dominancia se puede apreciar que los genotipos TC+TT se encuentran en un 5,5% de los pacientes con TA sin bocio mientras que no se encuentran en ninguno

de los individuos sin la enfermedad, por lo que dicho genotipo podría conferir riesgo a desarrollar TA en individuos sin bocio (p-valor 0,029). En las distribuciones alélicas también se encuentran diferencias estadísticamente significativas (p-valor 0,016). El alelo T estaría en 7 pacientes (3,2%) y en ninguno de los controles sanos por lo que dicho alelo conferiría riesgo para TA sin bocio.

En el resto de los polimorfismos estudiados, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con TA sin bocio y controles. (Tablas 38,39 y 40)

Tabla 37: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs11545829 del gen *KEAP1* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune sin bocio (casos) e individuos sanos (controles).

SNP	Genotipo	No bocio	Controles	p-valor	OR (95% IC)
KEAP1 (rs11545829)	CC	103 (94,5%)	119 (100%)	0,035	-
	TC	5 (4,6%)	0 (0%)		
	TT	1 (0,9%)	0 (0%)		
	CC+TC	108 (99,1%)	119 (100%)	0,965	-
	TT	1 (0,9%)	0 (0%)		
	CC	103 (94,5%)	119 (100%)	0,029	-
	TC+TT	6 (5,5%)	0 (0%)		
	C	211 (96,8%)	238 (100%)	0,016	-
T	7 (3,2%)	0 (0%)			

Tabla 38: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs1048290 del gen *KEAP1* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune sin bocio (casos) e individuos sanos (controles).

SNP	Genotipo	No bocio	Controles	p-valor	OR (95% IC)
KEAP1 (rs1048290)	CC	44 (40%)	149 (44,5%)	0,630	-
	GC	51 (46,4%)	149 (44,5%)		
	GG	15 (13,6%)	37 (11%)		
	CC+GC	95 (86,4%)	298 (89%)	0,573	1,272 (0,669-2,419)
	GG	15 (13,6%)	37 (11%)		
	CC	44 (40%)	149 (44,5%)	0,477	1,202 (0,775-1,862)
	CG+GG	66 (60%)	186 (55,5%)		
	C	139 (63,2%)	447 (66,7%)	0,380	1,168 (0,850-1,605)
G	81 (37%)	223 (33,3%)			

Tabla 39: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs2706110 del gen *NFE2L2* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune sin bocio (casos) e individuos sanos (controles).

SNP	Genotipo	No bocio	Controles	p-valor	OR (95% CI)
<i>NFE2L2</i> (rs2706110)	TT	5 (4,6%)	8 (2,4%)	0,478	-
	CT	37 (34,3%)	121 (36,1%)		
	CC	66 (61,1%)	206 (61,5%)		
	TT+CT	42 (38,9%)	129 (38,5%)	1	0,984 (0,631-1,536)
	CC	66 (61,1%)	206 (61,5%)		
	TT	5 (4,6%)	8 (2,4%)	0,383	0,504 (0,161-1,574)
	CT+CC	103 (95,4%)	327 (97,6%)		
	T	47 (21,8%)	137 (20,4%)	0,751	0,924 (0,636-1,343)
C	169 (78,2%)	533 (79,6%)			

Tabla 40: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs1800872 del gen *IL 10* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune sin bocio (casos) e individuos sanos (controles).

SNP	Genotipo	No bocio	Controles	p-valor	OR (95% IC)
<i>IL10</i> (rs1800872)	GG	61 (55,5%)	141 (57.1%)	0,101	-
	TG	37 (33,6%)	94 (38,1%)		
	TT	12 (10,9%)	12 (4,9%)		
	GG+TG	98 (89,1%)	235 (95.1%)	0,060	2,398 (1,041-5,522)
	TT	12 (10,9%)	12 (4.9%)		
	GG	61 (55,5%)	141 (57.1%)	0,864	1,069 (0,680-1,680)
	TG+TT	49 (44,5%)	106 (42.9%)		
	G	159 (72,3%)	376 (76.1%)	0,317	1,222 (0,853-1,753)
T	61 (27,7%)	118 (23.9%)			

3.3 Estudio de los polimorfismos en los genes *KEAP1*, *NFE2L2* e *IL10* en pacientes con tiroiditis autoinmune que presentan o no tienen bocio

En las tablas 41,42,43 y 44 se recogen las frecuencias genotípicas y alélicas de *KEAP1* (rs1048290), *NFE2L2* (2706110) e *IL10* (rs1800872) en pacientes con TA con y sin bocio. En ninguno de los polimorfismos estudiados, se encuentran diferencias significativas entre los pacientes en función de si presentan o no bocio.

Tabla 41: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs1048290 del gen *KEAP1* estudiada en pacientes

con tiroiditis autoinmune con bocio y pacientes con tiroiditis autoinmune sin bocio.

SNP	Genotipo	Bocio	No bocio	p-valor	OR (95% IC)
KEAP1 (rs1048290)	CC	34 (38,2%)	44 (40%)	0,352	-
	GC	48 (53,9%)	51 (46,4%)		
	GG	7 (7,9%)	15 (13,6%)		
	CC+GC	82 (92,1%)	95 (86,4%)	0,288	1,850 (0,719-4,757)
	GG	7 (7,9%)	15 (13,6%)		
	CC	34 (38,2%)	44 (40%)	0,911	0,927 (0,523-1,645)
	CG+GG	55 (61,8%)	66 (60%)		
	C	116 (65,2%)	139 (63,2%)	0,760	1,090 (0,722-1,647)
G	62 (34,8%)	81 (36,8%)			

Tabla 42: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del gen *KEAP1* (rs11545829) estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune con bocio y pacientes con tiroiditis autoinmune sin bocio.

SNP	Genotipo	Bocio	No bocio	p-valor	OR (95% CI)
KEAP1 (rs11545829)	CC	85 (94,4%)	103(94,5%)	0,687	-
	TC	3 (3,3%)	5 (4,6%)		
	TT	2 (2,2%)	1 (0,9%)		
	CC+TC	88 (97,8%)	108 (99,1%)	0,867	0,407 (0,036-4,567)
	TT	2 (2,2%)	1 (0,9%)		
	CC	85 (94,4%)	103 (94,5%)	1	0,990 (0,292-3,358)
	TC+TT	5(5,6%)	6 (5,5%)		
	C	173 (96,1%)	211 (96,8%)	0,927	0,820 (0,282-2,383)
T	7 (3,9%)	7 (3,2%)			

Tabla 43: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del gen *NFE2L2* (rs2706110) estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune con bocio y pacientes con tiroiditis autoinmune sin bocio.

SNP	Genotipo	Bocio	No bocio	p-valor	OR (95% CI)
NFE2L2 (rs2706110)	TT	2 (2,2%)	5 (4,6%)	0,642	-
	CT	33 (36,7%)	37 (34,3%)		
	CC	55 (61,1%)	66 (61,1%)		
	TT+CT	35 (38,9%)	42 (38,9%)	1	1 (0,563-1,775)
	CC	55 (61,1%)	66 (61,1%)		
	TT	2 (2,2%)	5 (4,6%)	0,598	0,468(0,089-2,473)
	CT+CC	88 (97,8%)	103 (95,4%)		
	T	37 (20,6%)	47 (21,8%)	0,866	0,930 (0,573-1,511)
C	143 (79,4%)	169 (78,2%)			

Tabla 44: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del gen *IL 10* (rs1800872) estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune con bocio y pacientes con tiroiditis autoinmune sin bocio.

SNP	Genotipo	Bocio	No bocio	p-valor	OR (95% CI)
<i>IL 10</i> (rs1800872)	GG	54 (60%)	61 (53.7%)	0,395	-
	TG	31 (34,4%)	37 (35.2%)		
	TT	5 (5,6%)	12 (11.1%)		
	GG+TG	85 (94,4%)	98 (88.9%)	0,273	2,082 (0,705-6,148)
	TT	5 (5,6%)	12 (11.1%)		
	GG	54 (60%)	61 (53.7%)	0,685	1.205 (0,685-2.,120)
	TG+TT	36 (40%)	49 (46.3%)		
G	139 (77,2%)	159 (71.3%)	0,824	1,301 (0,824-2,053)	
T	41 (22,8%)	61 (28.7%)			

3.4 Estudio de los polimorfismos en los genes *KEAP1*, *NFE2L2* e *IL10* en pacientes con tiroiditis autoinmune eutiroideos e hipotiroideos

En las tablas 45,46,47 y 48 se recogen las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de los genes *KEAP1* (rs1048290, rs11545829), *NFE2L2* (rs2706110) e *IL10* (rs1800872) y se comparan las frecuencias en pacientes con tiroiditis autoinmune eutiroideos e hipotiroideos. Las frecuencias de los distintos polimorfismos son similares en ambos tipos de pacientes.

Tabla 45: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs1048290 del gen *KEAP1* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune eutiroideos frente a pacientes con tiroiditis autoinmune hipotiroideos

SNP	Genotipo	Eutiroideo	Hipotiroideo	p-valor	OR (95% IC)
<i>KEAP1</i> (rs1048290)	CC	12 (42,9%)	64 (38,8%)	0,77	-
	GC	14 (50%)	82 (49,7%)		
	GG	2 (7,1%)	19 (11,5%)		
	CC+GC	26 (92,9%)	146 (38,8%)	0,720	1,692 (0,372-7,701)
	GG	2 (7,1%)	19 (61,2%)		
	CC	12 (42,9%)	64 (63,6%)	0,843	1,184 (0,526-2,664)
	CG+GG	16 (57,1%)	101 (36,4%)		
	C	38 (67,9%)	210 (63%)	0,647	1,206 (0,659-2,207)
G	18 (32,1%)	120 (37%)			

Tabla 46: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs11545829 del gen *KEAP1* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune eutiroideos frente a pacientes con tiroiditis autoinmune hipotiroideos.

SNP	Genotipo	Eutiroideo	Hipotiroideo	p-valor	OR (95% IC)
KEAP1 (rs11545829)	CC	25 (92,6%)	159 (95,8%)	0,609	-
	TC	1 (3,7%)	5 (3%)		
	TT	1 (3,7%)	2 (1,2%)		
	CC+TC	26 (96,3%)	164 (98,8%)	0,892	0,317 (0,028-3,623)
	TT	1 (3,7%)	2 (1,2%)		
	CC	25 (92,6%)	159 (95,8%)	0,813	0,550 (0,108-2,800)
	TC+TT	2 (7,4%)	7 (4,2%)		
C	51 (94,4%)	323 (97,3%)	0,487	0,474 (0,124-1,808)	
T	3 (5,6%)	9 (2,7%)			

Tabla 47: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs2706110 del gen *NFE2L2* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune eutiroideos frente a pacientes con tiroiditis autoinmune hipotiroideos.

SNP	Genotipo	Eutiroideo	Hipotiroideo	p-valor	OR (95% IC)
NFE2L2 (rs2706110)	TT	0 (0%)	7 (4,3%)	0,443	-
	CT	9 (32,1%)	60 (36,6%)		
	CC	19 (67,9%)	97 (59,1%)		
	TT+CT	9 (32,1%)	67 (40,9%)	0,508	0,686 (0,293-1,608)
	CC	19 (67,9%)	97 (59,1%)		
	TT	0 (0%)	7 (4,3%)	0,570	0,401 (0,022-7,258)
	CT+CC	28(100%)	157 (95,7%)		
	T	9 (16,1%)	74 (22,6%)	0,36	0,657 (0,308-1,404)
C	47 (83,9%)	254 (77,4%)			

Tabla 48: Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs1800872 del gen *IL 10* estudiada en pacientes con tiroiditis autoinmune eutiroideos frente a pacientes con tiroiditis autoinmune hipotiroideos.

SNP	Genotipo	Eutiroideo	Hipotiroideo	p-valor	OR (95% IC)
IL10 (rs1800872)	GG	17 (60,7%)	96 (57,8%)	0,933	-
	TG	9 (32,1%)	55 (33,1%)		
	TT	2 (7,1%)	15 (9%)		
	GG+TG	26 (92,9%)	151 (91%)	1	1,291 (0,279-5,982)
	TT	2 (7,1%)	15 (9%)		
	GG	17 (60,7%)	96 (57,8%)	0,937	1,127 (0,497-2,555)
	TG+TT	11 (39,3%)	70 (42,2%)		
G	43 (76,8%)	247 (74,4%)	0,830	1,138 (0,584-2,219)	
T	13 (23,2%)	85 (25,6%)			

DISCUSIÓN

1. Discusión de datos clínicos

La tiroiditis autoinmune es una enfermedad con una incidencia de 0,3-1,5 casos por cada 1000 personas (1). Aproximadamente el 20-30% de los pacientes sufren TH(12). Los antecedentes familiares no son los únicos factores que influyen en el desarrollo de la TA. De hecho, los factores ambientales también presentan un papel clave para el desarrollo de esta patología. En un gran estudio sueco de gemelos se establecía una heredabilidad estimada de 0,64 (16). Brix et al. mostraron en gemelos daneses que los gemelos monocigóticos exhibían una tasa de concordancia de más del 50%, mientras que los gemelos dicigóticos mostraban ausencia de concordancia (17). Al igual que lo descrito en la bibliografía, en nuestra población en estudio un 55% de los pacientes presentaban antecedentes familiares.

En cuanto a la clínica, el bocio es la característica más relevante de la tiroiditis de Hashimoto en su forma bociógena. En la forma atrófica, que se considera el resultado final de la destrucción autoinmunitaria del tiroides, no se observa bocio. La tiroiditis autoinmune atrófica puede corresponder a una fase final del fallo tiroideo. La variante fibrosa representa menos del 10% de todas las formas de TA y ya fue descrita en uno de los cuatro pacientes reportados inicialmente por el Dr. Hashimoto en 1912(3). En nuestra cohorte de pacientes un 53% no tenían bocio, un 27% tenían un bocio grado I y tan sólo un 16% tenían un bocio grado II/III, esto pone de manifiesto en concordancia con lo que comentaremos más adelante que los pacientes de nuestro estudio han sido diagnosticados en una etapa temprana de la enfermedad, sin un aumento compensador del tiroides importante en forma de bocio.

Los factores ambientales tienen un factor desencadenante de la TA ya que su prevalencia es mayor en zonas con ingesta adecuada de yodo.

La OMS y la International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders (ICCIDD) consideran que un país puede tener un adecuado aporte de yodo cuando

más del 90% de las familias consumen sal yodada (127). Los estudios realizados en población adulta y en población infantil muestran que el consumo de sal yodada es del 44% y del 69% respectivamente (128), cifras lejanas del 90% recomendado por la OMS. La OMS incluyó a España entre los países con una óptima nutrición de yodo donde el progresivo incremento del conocimiento y la aceptación por gran parte de los médicos de los efectos beneficiosos de la yodoprofilaxis y la adecuada transmisión de esta información a la población, mediante diferentes campañas sanitarias divulgativas, han contribuido de forma importante a la corrección del déficit de yodo en nuestro país. En un análisis realizado sobre la deficiencia de yodo en la provincia de Salamanca en el año 1973, González Villarón y Col encuentran una incidencia media del 38% en las localidades situadas en la Sierra de Bejar y en la de Francia (129).

En nuestra cohorte de pacientes un 47% desconocían si consumía sal yodada, este porcentaje incluye también los casos en los que no se recoge información sobre el consumo en la historia clínica mientras que un 25% sí reconocen el consumo de sal yodada y un 28% refieren no consumir sal yodada de forma habitual. Este porcentaje de consumo de sal yodada es inferior al consumo de sal yodada referido del 44% en adultos en los estudios mencionados.

Los resultados de las pruebas más frecuentes de función tiroidea dependen de la fase de la enfermedad. Rara vez las pruebas pueden sugerir una hiperfunción tiroidea con una TSH suprimida, pero sin evidencia de aumento de la producción de la hormona. Las concentraciones séricas de T4 y de T3 pueden permanecer normales. En esta fase, el paciente puede estar eumetabólico. Conforme aumenta la TSH, la respuesta glandular compensa inicialmente la alteración de la biosíntesis de las hormonas. Con el tiempo, la capacidad del tiroides para responder a la TSH disminuye y la concentración de T4 sérica disminuyen a valores inferiores a los normales. Sin embargo, la concentración sérica de T3 puede estar significativamente aumentada, lo que probablemente refleja una estimulación máxima por la elevación de la TSH de un tiroides que ya está fallando. Las fases iniciales de la secuencia de inicio, cuando la TSH sérica está aumentada, pero la T4 y la T3 aún están normales, se denominan

hipotiroidismo subclínico. La tasa de evolución hacia el hipotiroidismo en pacientes con niveles de TSH ligeramente elevados y Ac positivos es alrededor del 5% anual. Una vez que el hipotiroidismo se desarrolla suele ser permanente en la mayoría de los pacientes.

De los pacientes de nuestro estudio, el 14% estaban eutiroideos, un 59 % mostraban un hipotiroidismo subclínico mientras que un 24 % tenían hipotiroidismo. El hecho de que de nuestra cohorte de pacientes sólo un 24 % tenían hipotiroidismo manifiesto, probablemente está en relación con el hecho de que la evolución a hipotiroidismo manifiesto es extremadamente lenta en el tiempo como indican los diferentes estudios (130) y con el diagnóstico de la enfermedad en una etapa temprana, puesto que la edad media al diagnóstico de nuestros pacientes era de 40 años. En un estudio de seguimiento de 20 años de la cohorte de Whickham, se desarrolló hipotiroidismo clínico o bioquímico en el 55% de las mujeres que inicialmente tenían pruebas positivas para anticuerpos tiroideos y valores elevados de tirotrópina sérica (>6 mU por litro), pero valores de tiroxina sérica normales (una tasa de progresión del 4,3 por ciento por año). Entre las mujeres que inicialmente tenían un valor elevado de tirotrópina sérica o anticuerpos tiroideos (pero no ambos), las tasas de progresión a los 20 años fueron del 2,6% anual entre los sujetos con valores elevados de tirotrópina sérica y del 2,1% anual entre los que tenían anticuerpos antitiroideos, lo que resultó en tasas de hipotiroidismo manifiesto del 33 y el 27%, respectivamente, al final del período de seguimiento (130).

En referencia a la población seleccionada para nuestro estudio, la positividad de los Ac anti TG es del 61%, lo cual se corresponde con el porcentaje de positividad de dichos anticuerpos descrito en la bibliografía que estaría en un rango entre 60 y 80%(1).

Respecto a la positividad de los Ac anti TPO nuestros pacientes tenían un porcentaje de positividad del 95%, lo cual concuerda con los datos de la bibliografía

que demuestra que los pacientes con TA presentan un 95% de positividad de Ac anti TPO (1).

2. Polimorfismos en las vías de señalización antioxidante y su papel en la TA

Un exceso descontrolado de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede causar estrés oxidativo, un factor involucrado en la patogénesis de un amplio espectro de enfermedades, incluyendo inflamación y cáncer. En diferentes estudios se ha demostrado que la vía de señalización antioxidante que comprende el factor de transcripción NRF2 y su inhibidor citoplasmático KEAP1, es el principal mecanismo empleado por el tiroides para su defensa antioxidante.

Los polimorfismos de cambio de nucleótido único pueden alterar la función de las proteínas, por lo que SNPs en los genes que codifican NRF2 y KEAP1 podrían alterar la función antioxidante en patologías tiroidea como la TA. En la bibliografía revisada hasta el momento, no se ha encontrado relación entre los polimorfismos que hemos estudiado rs1048290 exón 4 y 11545829 exón 5 de *KEAP1*, ni rs2706110 3' región de *NFE2L2* y el riesgo de TA. Puesto que este gen está relacionado con la vía de señalización NRF2 y se ha relacionado dicha vía en los últimos años con diversas patologías tiroideas, como la autoinmunidad, el bocio, el hipotiroidismo, el hipertiroidismo y el cáncer (78), nos planteamos la posibilidad de que los polimorfismos de *NFE2L2* y *KEAP1* podrían conferir un aumento del riesgo de TA.

Ciertos polimorfismos de NRF2 se han relacionado además con otras enfermedades autoinmunes como el LES y el vitíligo (104,107).

Otros estudios han encontrado relación entre mutaciones en genes que codifican proteínas de dicha vía de señalización y enfermedades relacionadas con el tiroides como el CPT. De hecho, en el estudio de Danilovic DLS et al. se ha encontrado la presencia de mutaciones en el gen *KEAP1* en un subconjunto de CPT. A pesar de

no haber investigado directamente su papel funcional en la génesis tumoral tiroidea, la presencia de mutaciones en regiones que codifican áreas funcionales importantes de *KEAP1* y el aumento de la expresión de la proteína nuclear NRF2 de los tumores mutados sugieren que la interrupción de la interacción inhibidora de NRF2-*KEAP1* podría contribuir al desarrollo o progresión de los CPT (86).

Como se describió previamente, *KEAP1* se ha relacionado con distintas enfermedades tiroideas como bocio multinodular no tóxico familiar, pero en la literatura revisada no se ha encontrado ningún artículo hasta la actualidad que lo relacione con el riesgo aumentado de TA. Lo que se observó en dichos estudios es que las mutaciones con pérdida de función de *KEAP1*, conlleva un aumento de expresión de NRF2 que podría ser una causa de bocio multinodular no tóxico hereditario (79,80). En nuestro estudio encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica y alélica del polimorfismo rs11545829 de *KEAP1*. El genotipo TC+TT podría conferir riesgo para TA. El alelo T podría conferir riesgo para TA.

En la bibliografía revisada no hemos encontrado relación entre polimorfismos en el gen *KEAP1* y la TA. No obstante, en modelos animales se ha demostrado una relación entre bajos niveles del gen *KEAP1* y el hipotiroidismo subclínico o el bocio. Los niveles elevados de TSH con niveles normales de T4, que se observaban en ratones con niveles disminuidos de *KEAP1*(*KEAP1* KD), son indicativos de una forma leve de hipotiroidismo, denominada hipotiroidismo subclínico. Parece por lo tanto que niveles disminuidos de *KEAP1* se relacionan con hipotiroidismo subclínico alteración de la función tiroidea que encontramos en fases iniciales de la TA. Se ha demostrado además que los ratones *KEAP1* KD, a través de una activación de la vía NRF2, están protegidos contra enfermedades metabólicas como obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2, así como una enfermedad autoinmune como la diabetes tipo 1 (78). La disminución de *KEAP1* que conlleva una activación de NRF2 protegería contra el daño oxidativo intratiroideo. Existiendo en modelos animales descritas estas interacciones, podría establecerse como hipótesis que el polimorfismo estudiado provoque algún tipo de modificación en la proteína que implique niveles disminuidos de *KEAP1* que igual que protegen en modelos animales de otras enfermedades autoinmunes generen protección frente a TA. El polimorfismo rs11545829, se localiza

en el exón 5 y da lugar a una mutación silenciosa. No obstante, hay estudios que demuestran que estas mutaciones pueden influenciar la expresión de las proteínas y la maduración del RNA. Se han asociado con cambios en los niveles de expresión de la proteína. Esta hipótesis requeriría de futuros estudios para confirmar la relación del polimorfismo identificado en nuestro estudio y su relación con TA.

En un estudio reciente se demostró con modelos animales que la pérdida de función de *KEAP1* puede causar bocio, aunque no necesariamente con una apariencia nodular. Se describió una disminución de los niveles plasmáticos de T4, que se normalizaron en los últimos años, aparentemente por el aumento de los niveles plasmáticos de la TSH. Estos hallazgos sugieren que la activación genética de NRF2 puede tener consecuencias negativas para la glándula tiroides (78).

En el análisis por subgrupos encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el polimorfismo rs11545829 de *KEAP1*, el genotipo TC+TT podría conferir riesgo frente a la aparición de TA con bocio. El alelo T podría conferir riesgo frente al desarrollo de TA con bocio. En cuanto al estudio del polimorfismo rs11545829 de *KEAP1* en pacientes con TA sin bocio, encontramos también diferencias estadísticamente significativas. El genotipo TC+TT podría conferir riesgo a desarrollar TA sin bocio. El alelo T conferiría riesgo para TA sin bocio.

La vía de señalización *KEAP1*/NRF2 se ha relacionado con el carcinoma papilar de tiroides. En un estudio se ha encontrado niveles elevados de NRF2 en el CPT, pero no se correlacionaron con los de *KEAP1*(77), en otro estudio, sin embargo, los análisis inmunohistoquímicos del CPT con mutaciones de *KEAP1* revelaron una sobreexpresión de NRF2 en comparación con el tejido tiroideo benigno adyacente, lo que sugiere un papel potencial de *KEAP1* en la tumorigénesis tiroidea (86).

Un posible mecanismo relacionado con el CPT sería la metilación del promotor de *KEAP1*. Se han encontrado en diferentes estudios mutaciones de *KEAP1* en CPT y relacionadas con enfermedad más agresiva y en pacientes con características de

mal pronóstico (metástasis en ganglios linfáticos, extensión extra tiroidea y enfermedad metastásica a distancia) (86).

En el caso de los demás polimorfismos estudiados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica y alélica en los polimorfismos rs2706110 del gen *NFE2L2* ni en el polimorfismo rs1048290 de *KEAP1*. Puesto que se ha visto relación entre TA y CPT y este y la vía de señalización *NRF2/KEAP1*, sería una posible vía de futuros estudios investigar dichos polimorfismos de *KEAP1* y *NRF2* en pacientes con TA y carcinoma papilar de tiroides, para ver si podrían estar relacionados dichos polimorfismos con el carcinoma papilar tiroideo.

Diversos estudios proponen que polimorfismos genéticos que alteran la expresión de citoquinas podrían estar relacionados con el riesgo de TA. IL-10 es una citocina que suprime la producción de citocinas antiinflamatorias y la autoinmunidad por lo que polimorfismos en el gen que codifica esta citocina podría alterar su función y aumentar la respuesta inflamatoria. En concreto, la relación de polimorfismos en este gen con la enfermedad tiroidea autoinmune se ha estudiado en un metaanálisis (109). En este estudio, se establece la relación entre la enfermedad tiroidea autoinmune y los polimorfismos de *IL10* (-1082G/A (rs1800896), -819C/T (rs1800871) y -592C/A (rs1800872)) y encontró que el polimorfismo rs1800896 presentaba una asociación significativa entre la enfermedad tiroidea autoinmune en concreto el alelo G y el genotipo GC+GA en población asiática, no así en población del Oriente Medio. Este metaanálisis no encontró asociación entre los alelos -819C y -592C y la enfermedad tiroidea autoinmune (109). En nuestro trabajo, no se encontró una relación entre el polimorfismo rs1800872 de *IL 10* y el riesgo de TA, lo que coincide con el resultado encontrado en el metaanálisis previamente descrito. En un estudio la combinación del genotipo AA de 3'UTRIL-12B con GG de -1082IL-10 se asoció con un riesgo tres veces mayor de desarrollar TA en comparación con la presencia del alelo 3'UTR C (AC+CC) y simultáneamente con el genotipo AA de -1082IL-10. El polimorfismo de *IL 10* (rs1800896) mostró una frecuencia significativamente más alta del genotipo GG

homocigoto en pacientes con TA y el genotipo CC con TA eutiroidea (108). En otro estudio se concluyó que los polimorfismos de la región promotora del gen IL-10 (-1082G/A, -819C/T y -592C/A) estudiados no están asociados con la susceptibilidad genética a la diabetes tipo 1 y enfermedad tiroidea autoinmune (111)

En un estudio realizado en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca se encontró una relación con el riesgo de TA en dos polimorfismos -4147 C>G del gen ATG2B (rs3759601) y 106662741 C>G del gen ATG5 (rs2245214). Ser portador del alelo G (menos frecuente o mutado) supone un aumento del riesgo en el primer polimorfismo mientras que tiene un efecto protector en el segundo (27).

En nuestro estudio hemos encontrado que la presencia de polimorfismos en genes implicados en la respuesta celular al estrés oxidativo como *KEAP1* podría influir en el riesgo a desarrollar tiroiditis autoinmune. Demostramos por primera vez que la presencia del alelo T del polimorfismo rs11545829 del gen *KEAP1* podría conferir riesgo frente al desarrollo de tiroiditis autoinmune con bocio y sin bocio. Estos resultados no habían sido publicados anteriormente.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son:

1. En la serie estudiada los pacientes no se diferencian de los encontrados en otras series.
2. La presencia de polimorfismos en genes implicados en la respuesta celular al estrés oxidativo como *KEAP1* podría influir en el riesgo a desarrollar tiroiditis autoinmune. La presencia del alelo T del polimorfismo rs11545829 del gen *KEAP1* podría aumentar el riesgo de desarrollar tiroiditis autoinmune.
3. La presencia del alelo T del polimorfismo rs11545829 del gen *KEAP1* podría aumentar el riesgo a desarrollar tiroiditis autoinmune con bocio y sin bocio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ralli M, Angeletti D, Fiore M, D'Aguanno V, Lambiase A, Artico M, et al. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation. Vol. 19, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2020.
2. Klubo-Gwiedzinska J, Wartofsky L. Hashimoto thyroiditis: an evidence-based guide to etiology, diagnosis and treatment. Vol. 132, *Polish Archives of Internal Medicine*. Medycyna Praktyczna Cholerzyn; 2022.
3. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4–5):391–7.
4. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, et al. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1977 Dec;7(6):481–93.
5. McLachlan SM, Rapoport B. Breaking tolerance to thyroid antigens: changing concepts in thyroid autoimmunity. *Endocr Rev*. 2014 Feb;35(1):59–105.
6. Ehlers M, Thiel A, Bernecker C, Porwol D, Papewalis C, Willenberg HS, et al. Evidence of a combined cytotoxic thyroglobulin and thyroperoxidase epitope-specific cellular immunity in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Apr;97(4):1347–54.
7. Kotani T, Aratake Y, Hirai K, Fukazawa Y, Sato H, Ohtaki S. Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity*. 1995;20(4):231–6.
8. Shevach EM. Suppressor T cells: Rebirth, function and homeostasis. *Curr Biol*. 10(15): R572–5.
9. Pan D, Shin YH, Gopalakrishnan G, Hennessey J, De Groot LJ. Regulatory T cells in Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Oct;71(4):587–93.
10. Mao C, Wang S, Xiao Y, Xu J, Jiang Q, Jin M, et al. Impairment of regulatory capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells mediated by dendritic cell polarization and hyperthyroidism in Graves' disease. *J Immunol*. 2011 Apr 15;186(8):4734–43.
11. Cui X, Liu Y, Wang S, Zhao N, Qin J, Li Y, et al. Circulating Exosomes Activate Dendritic Cells and Induce Unbalanced CD4+ T Cell Differentiation in Hashimoto Thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 Oct 1;104(10):4607–18.
12. Ragusa F, Fallahi P, Elia G, Gonnella D, Paparo SR, Giusti C, et al. Hashimoto's thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy. Vol. 33, *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. Bailliere Tindall Ltd; 2019.
13. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol*. 2009 Aug;10(8):864–71.
14. Figueroa-Vega N, Alfonso-Pérez M, Benedicto I, Sánchez-Madrid F, González-Amaro R, Marazuela M. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Feb;95(2):953–62.
15. Ruggeri RM, Saitta S, Cristani M, Giovinazzo S, Tigano V, Trimarchi F, et al. Serum interleukin-23 (IL-23) is increased in Hashimoto's thyroiditis. *Endocr J*. 2014;61(4):359–63.

16. Weetman AP. An update on the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Endocrinol Invest* [Internet]. 2021;44(5):883–90. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01477-1>
17. Brix TH, Kyvik KO, Hegedü's L, Hegedü's H. A Population-Based Study of Chronic Autoimmune Hypothyroidism in Danish Twins* [Internet]. Vol. 85, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Printed. 2000. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/85/2/536/2852381>
18. Bliddal S, Nielsen CH, Feldt-Rasmussen U. Recent advances in understanding autoimmune thyroid disease: the tallest tree in the forest of polyautoimmunity. *F1000Res*. 2017; 6:1776.
19. Brand O, Gough S, Heward J. HLA, CTLA-4 and PTPN22: the shared genetic master-key to autoimmunity? *Expert Rev Mol Med*. 2005 Oct 17;7(23):1–15.
20. Santos LR, Durães C, Mendes A, Prazeres H, Alvelos MI, Moreira CS, et al. A polymorphism in the promoter region of the selenoprotein S gene (SEPS1) contributes to hashimoto's thyroiditis susceptibility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014;99(4).
21. Jia X, Wang B, Yao Q, Li Q, Zhang J. Variations in CD14 Gene Are Associated with Autoimmune Thyroid Diseases in the Chinese Population. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9:811.
22. Ueda S, Oryoji D, Yamamoto K, Noh JY, Okamura K, Noda M, et al. Identification of independent susceptible and protective HLA alleles in Japanese autoimmune thyroid disease and their epistasis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Feb;99(2): E379–83.
23. Ji R, Feng Y, Zhan WW. Updated analysis of studies on the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene A49G polymorphism and Hashimoto's thyroiditis risk. *Genet Mol Res*. 2013 Apr 26;12(2):1421–30.
24. Zaaber I, Mestiri S, Marmouch H, Mahjoub S, Abid N, Hassine M, et al. Polymorphisms in TSHR and IL1RN genes and the risk and prognosis of Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity*. 2014 Mar;47(2):113–8.
25. Li ZH, Han J, Wang YF, Dai J, Zhang H, Li CX, et al. Association between Polymorphism of Interleukin-23 Receptor and Hashimoto's Thyroiditis in Chinese Han Population of Shandong. *Chin Med J (Engl)*. 2015 Aug 5;128(15):2050–3.
26. Karakaya D, Çakmak Genc G, Karakas Celik S, Aktas T, Bayraktaroglu T, Dursun A. Association between IL-18 gene polymorphisms and Hashimoto thyroiditis. *Mol Biol Rep*. 2021 Oct;48(10):6703–8.
27. Iglesias R. Estudio de polimorfismos genéticos en tiroiditis autoinmune. [Salamanca]; 2015.
28. Mikulska AA, Karaźniewicz-Łada M, Filipowicz D, Ruchała M, Główka FK. Metabolic Characteristics of Hashimoto's Thyroiditis Patients and the Role of Microelements and Diet in the Disease Management—An Overview. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
29. 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):12895–912.
30. Hu Y, Feng W, Chen H, Shi H, Jiang L, Zheng X, et al. Effect of selenium on thyroid autoimmunity and regulatory T cells in patients with Hashimoto's thyroiditis: A prospective randomized-controlled trial. *Clin Transl Sci*. 2021 Jul 1;14(4):1390–402.

31. Rostami R, Nourooz-Zadeh S, Mohammadi A, Khalkhali HR, Ferns G, Nourooz-Zadeh J. Serum selenium status and its interrelationship with serum biomarkers of thyroid function and antioxidant defense in hashimoto's thyroiditis. *Antioxidants*. 2020 Nov 1;9(11):1–14.
32. Tian X, Li N, Su R, Dai C, Zhang R. Selenium Supplementation May Decrease Thyroid Peroxidase Antibody Titer via Reducing Oxidative Stress in Euthyroid Patients with Autoimmune Thyroiditis. *Int J Endocrinol*. 2020;2020.
33. Wang LF, Sun RX, Li CF, Wang XH. The effects of selenium supplementation on antibody titres in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Endokrynol Pol*. 2021 Dec 30;72(6):666–7.
34. Wichman J. Selenium Supplementation Significantly Reduces Thyroid Autoantibody Levels in Patients with Chronic Autoimmune Thyroiditis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid*. 2016 Dec 1;26(12):1681–92.
35. Esposito D, Rotondi M, Accardo G, Vallone G, Conzo G, Docimo G, et al. Influence of short-term selenium supplementation on the natural course of Hashimoto's thyroiditis: clinical results of a blinded placebo-controlled randomized prospective trial. *J Endocrinol Invest*. 2017 Jan;40(1):83–9.
36. 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;3(1):25–31.
37. Chaudhary S, Dutta D, Kumar M, Saha S, Mondal SA, Kumar A, et al. Vitamin D supplementation reduces thyroid peroxidase antibody levels in patients with autoimmune thyroid disease: An open-labeled randomized controlled trial. *Indian J Endocrinol Metab*. 2016;20(3):391–8.
38. Chahardoli R, Saboor-Yaraghi AA, Amouzegar A, Khalili D, Vakili AZ, Azizi F. Can Supplementation with Vitamin D Modify Thyroid Autoantibodies (Anti-TPO Ab, Anti-Tg Ab) and Thyroid Profile (T3, T4, TSH) in Hashimoto's Thyroiditis? A Double Blind, Randomized Clinical Trial. *Horm Metab Res*. 2019 May;51(5):296–301.
39. Zhang J, Chen Y, Li H, Li H. Effects of vitamin D on thyroid autoimmunity markers in Hashimoto's thyroiditis: systematic review and meta-analysis. *J Int Med Res*. 2021 Dec;49(12):3000605211060675.
40. Wang S, Wu Y, Zuo Z, Zhao Y, Wang K. The effect of vitamin D supplementation on thyroid autoantibody levels in the treatment of autoimmune thyroiditis: a systematic review and a meta-analysis. *Endocrine*. 2018 Mar;59(3):499–505.
41. Vahabi Anaraki P, Aminorroaya A, Amini M, Momeni F, Feizi A, Iraj B, et al. Effect of Vitamin D deficiency treatment on thyroid function and autoimmunity markers in Hashimoto's thyroiditis: A double-blind randomized placebo-controlled clinical trial. *J Res Med Sci*. 2017; 22:103.
42. Ralli M, De Virgilio A, Artico M, Longo L, de Vincentiis M, Greco A. New insights into the etiopathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis: The role of genetics and epigenetics. *Autoimmun Rev*. 2018 Oct;17(10):1065–6.
43. Wang B, Shao X, Song R, Xu D, Zhang JA. The Emerging Role of Epigenetics in Autoimmune Thyroid Diseases. *Front Immunol*. 2017; 8:396.
44. Cañas CA, Cañas F, Bonilla-Abadía F, Ospina FE, Tobón GJ. Epigenetics changes associated to environmental triggers in autoimmunity. *Autoimmunity*. 2016;49(1):1–11.

45. Marsit CJ. Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. *J Exp Biol.* 2015 Jan 1;218(Pt 1):71–9.
46. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet.* 2012 Jan 4;13(2):97–109.
47. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet.* 2012 Jan 4;13(2):97–109.
48. Dik S, Scheepers PTJ, Godderis L. Effects of environmental stressors on histone modifications and their relevance to carcinogenesis: a systematic review. *Crit Rev Toxicol.* 2012 Jul;42(6):491–500.
49. Turner M, Galloway A, Vigorito E. Noncoding RNA and its associated proteins as regulatory elements of the immune system. *Nat Immunol.* 2014 Jun;15(6):484–91.
50. Ranzani V, Rossetti G, Panzeri I, Arrigoni A, Bonnal RJ, Curti S, et al. The long intergenic noncoding RNA landscape of human lymphocytes highlights the regulation of T cell differentiation by linc-MAF-4. *Nat Immunol.* 2015 Mar;16(3):318–25.
51. Wang B, Shao X, Song R, Xu D, Zhang JA. The Emerging Role of Epigenetics in Autoimmune Thyroid Diseases. *Front Immunol.* 2017; 8:396.
52. Tomer Y. Mechanisms of autoimmune thyroid diseases: from genetics to epigenetics. *Annu Rev Pathol.* 2014; 9:147–56.
53. Limbach M, Saare M, Tserel L, Kisand K, Eglit T, Sauer S, et al. Epigenetic profiling in CD4+ and CD8+ T cells from Graves' disease patients reveals changes in genes associated with T cell receptor signaling. *J Autoimmun.* 2016 Feb; 67:46–56.
54. SM Katz, AL Vickery Jr. The fibrous variant of Hashimoto s thyroiditis. *Hum Pathol.* 1974;161–70.
55. Hennessey J V. Clinical review: Riedel's thyroiditis: a clinical review. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;96(10):3031–41.
56. Stone JH, Khosroshahi A, Deshpande V, Chan JKC, Heathcote JG, Aalberse R, et al. Recommendations for the nomenclature of IgG4-related disease and its individual organ system manifestations. *Arthritis Rheum.* 2012 Oct;64(10):3061–7.
57. Fatourechí V, McConahey WM, Woolner LB. Hyperthyroidism associated with histologic Hashimoto's thyroiditis. *Mayo Clin Proc.* 1971 Oct;46(10):682–9.
58. Anderson L, Middleton WD, Teefey SA, Reading CC, Langer JE, Desser T, et al. Hashimoto thyroiditis: Part 2, sonographic analysis of benign and malignant nodules in patients with diffuse Hashimoto thyroiditis. *AJR Am J Roentgenol.* 2010 Jul;195(1):216–22.
59. Hayashi T, Hirokawa M, Kuma S, Higuchi M, Suzuki A, Kanematsu R, et al. Clinicopathological features of primary thyroid Burkitt's lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Diagn Pathol.* 2020 Feb 8;15(1):13.
60. Holm LE, Blomgren H, Löwhagen T. Cancer risks in patients with chronic lymphocytic thyroiditis. *N Engl J Med.* 1985 Mar 7;312(10):601–4.
61. Zhang L, Zhou L, Feng Q, Li Q, Ge M. Mutation of Hashimoto's Thyroiditis and Papillary Thyroid Carcinoma Related Genes and the Screening of Candidate Genes. *Front Oncol.* 2021 Dec 21;11.
62. Xu J, Ding K, Mu L, Huang J, Ye F, Peng Y, et al. Hashimoto's Thyroiditis: A "Double-Edged Sword" in Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Feb 24;13.

63. Moon S, Chung HS, Yu JM, Yoo HJ, Park JH, Kim DS, et al. Associations between Hashimoto thyroiditis and clinical outcomes of papillary thyroid cancer: A meta-analysis of observational studies. *Endocrinology and Metabolism*. 2018 Dec 1;33(4):473–84.
64. Tang Q, Pan W, Peng L. Association between Hashimoto thyroiditis and clinical outcomes of papillary thyroid carcinoma: A meta-analysis. *PLoS One*. 2022 Jun 1;17(6 June).
65. Fiore E, Rago T, Latrofa F, Provenzale MA, Piaggi P, Delitala A, et al. Hashimoto's thyroiditis is associated with papillary thyroid carcinoma: Role of TSH and of treatment with L-thyroxine. *Endocr Relat Cancer*. 2011 Aug;18(4):429–37.
66. Xu S, Huang H, Qian J, Liu Y, Huang Y, Wang X, et al. Prevalence of Hashimoto Thyroiditis in Adults with Papillary Thyroid Cancer and Its Association with Cancer Recurrence and Outcomes. *JAMA Netw Open*. 2021.
67. Batool S, Das B, Arif M, Islam N. FREQUENCY OF HASHIMOTO THYROIDITIS IN PAPILLARY THYROID CANCER PATIENTS AND ITS IMPACT ON THEIR OUTCOME [Internet]. Vol. 34, *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2022. Available from: <http://www.jamc.ayubmed.edu.pk>
68. Wiersinga WM. Thyroid hormone replacement therapy. *Horm Res*. 2001;56 Suppl 1:74–81.
69. Lontiris MI, Mazokopakis EE. A concise review of Hashimoto thyroiditis (HT) and the importance of iodine, selenium, vitamin D and gluten on the autoimmunity and dietary management of HT patients. Points that need more investigation. *Hell, J Nucl Med*. 2017;20(1):51–6.
70. Roehlen N, Doering C, Hansmann ML, Gruenwald F, Vorlaender C, Bechstein WO, et al. Vitamin D, FOXO3a, and Sirtuin1 in Hashimoto's Thyroiditis and Differentiated Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9:527.
71. Chao G, Zhu Y, Fang L. Correlation Between Hashimoto's Thyroiditis-Related Thyroid Hormone Levels and 25-Hydroxyvitamin D. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020; 11:4.
72. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993; 11:165–90.
73. Zdanov A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weatherbee J, Wlodawer A. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure*. 1995 Jun 15;3(6):591–601.
74. Xiao L, Yuan J, Yao Q, Yan N, Song R, Jiang W, et al. A case-control study of selenoprotein genes polymorphisms and autoimmune thyroid diseases in a Chinese population. *BMC Med Genet*. 2017 May 12;18(1).
75. Santos LR, Durães C, Ziros PG, Pestana A, Esteves C, Neves C, et al. Interaction of genetic variations in nfe2l2 and selenos modulates the risk of hashimoto's thyroiditis. *Thyroid*. 2019 Sep 1;29(9):1302–15.
76. Chartoumpakis D v., Fu CY, Ziros PG, Sykiotis GP. Patent review (2017–2020) of the keap1/nrf2 pathway using patseer pro: Focus on autoimmune diseases. Vol. 9, *Antioxidants*. MDPI; 2020. p. 1–14.
77. Renaud CO, Ziros PG, Chartoumpakis D v., Bongiovanni M, Sykiotis GP. Keap1/Nrf2 Signaling: A New Player in Thyroid Pathophysiology and Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Aug 2;10.

78. Thanas C, Ziros PG, Chartoumpakis D V., Sykiotis GP, Renaud CO. The keap1/nrf2 signaling pathway in the thyroid—2020 update. Vol. 9, Antioxidants. MDPI; 2020. p. 1–14.
79. Teshiba R, Tajiri T, Sumitomo K, Masumoto K, Taguchi T, Yamamoto K. Identification of a KEAP1 Germline Mutation in a Family with Multinodular Goitre. PLoS One. 2013 May 28;8(5).
80. Nishihara E, Hishinuma A, Kogai T, Takada N, Hirokawa M, Fukata S, et al. A novel germline mutation of KEAP1 (R483H) associated with a non-toxic multinodular goiter. Front Endocrinol (Lausanne). 2016 Sep 20;7(SEP).
81. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Dual roles of Nrf2 in cancer. Vol. 58, Pharmacological Research. 2008. p. 262–70.
82. Renaud CO, Ziros PG, Chartoumpakis D v., Bongiovanni M, Sykiotis GP. Keap1/Nrf2 Signaling: A New Player in Thyroid Pathophysiology and Thyroid Cancer. Front Endocrinol (Lausanne). 2019 Aug 2;10.
83. Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, Nakamura Y, Scharlock M, Ohtsuji M, et al. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. Mol Cell. 2006 Mar 3;21(5):689–700.
84. Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. PLoS Med. 2006 Oct;3(10):e420.
85. Martinez VD, Vucic EA, Pikor LA, Thu KL, Hubaux R, Lam WL. Frequent concerted genetic mechanisms disrupt multiple components of the NRF2 inhibitor KEAP1/CUL3/RBX1 E3-ubiquitin ligase complex in thyroid cancer. Mol Cancer. 2013 Oct 20;12(1).
86. Danilovic DLS, de Mello ES, Frazzato EST, Wakamatsu A, de Lima Jorge AA, Hoff AO, et al. Oncogenic mutations in KEAP1 disturbing inhibitory Nrf2-Keap1 interaction: Activation of antioxidative pathway in papillary thyroid carcinoma. Head Neck. 2018 Jun 1;40(6):1271–8.
87. Gopal RK, Kübler K, Calvo SE, Polak P, Livitz D, Rosebrock D, et al. Widespread Chromosomal Losses and Mitochondrial DNA Alterations as Genetic Drivers in Hürthle Cell Carcinoma. Cancer Cell. 2018 Aug 13;34(2):242-255.e5.
88. Ganly I, Makarov V, Deraje S, Dong Y, Reznik E, Seshan V, et al. Integrated Genomic Analysis of Hürthle Cell Cancer Reveals Oncogenic Drivers, Recurrent Mitochondrial Mutations, and Unique Chromosomal Landscapes. Cancer Cell. 2018 Aug 13;34(2):256-270.e5.
89. Zhang Y, Fan H, Fang S, Wang L, Chen L, Jin Y, et al. Mutations and expression of the NFE2L2/KEAP1/CUL3 pathway in Chinese patients with lung squamous cell carcinoma. J Thorac Dis. 2016;8(7):1639–44.
90. Gao L, Yuan F, Che G, Xiao X, Nie X, Wang Y, et al. Epigenetic modifications but not genetic polymorphisms regulate KEAP1 expression in colorectal cancer. J Cell Biochem. 2019 Aug 1;120(8):12311–20.
91. Wu S, Ding X, Yang Q, Wang M, He JQ. Association of Three SNPs Loci of Kelch-Like-ECH-Associated Protein 1 (Human) with Tuberculosis in Chinese Han Population. Int J Gen Med. 2022; 15:6365–72.

92. Fan C, Zhan Z, Zhang X, Lou Q, Guo N, Su M, et al. Research for type 2 diabetes mellitus in endemic arsenism areas in central China: role of low level of arsenic exposure and KEAP1 rs11545829 polymorphism. *Arch Toxicol.* 2022 Jun 1;96(6):1673–83.
93. Korytina GF, Akhmadishina LZ, Aznabaeva YG, Kochetova O v, Zagidullin NS, Kzhyshkowska JG, et al. Associations of the NRF2/KEAP1 pathway and antioxidant defense gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Gene.* 2019 Apr 15; 692:102–12.
94. Sugitani A, Asai K, Watanabe T, Suzumura T, Kojima K, Kubo H, et al. A Polymorphism rs6726395 in Nrf2 Contributes to the Development of Emphysema-Associated Age in Smokers Without COPD. *Lung.* 2019 Oct 1;197(5):559–64.
95. al Azhary NM, Kamel MM, Ismail YM, Mahmoud AA, Radwan EM. The role of genetic polymorphisms in Nrf2 and P73 in Egyptian women with breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2016 Nov 1;17(11):4945–9.
96. Hartikainen JM, Tengström M, Kosma VM, Kinnula VL, Mannermaa A, Soini Y. Genetic polymorphisms and protein expression of NRF2 and Sulfiredoxin predict survival outcomes in breast cancer. *Cancer Res.* 2012 nov 1;72(21):5537–46.
97. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, et al. The relationship between *Helicobacter pylori* infection and promoter polymorphism of the Nrf2 gene in chronic gastritis. *Int J Mol Med.* 2007 Jan;19(1):143–8.
98. Liu Z, Yin X, Liu L, Tao H, Zhou H, Ma G, et al. Association of KEAP1 and NFE2L2 polymorphisms with temporal lobe epilepsy and drug resistant epilepsy. *Gene.* 2015 Oct 25;571(2):231–6.
99. Rajabi-Moghaddam M, Abbaszadeh H. Gene polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy.* 2022;27(6):1058–76.
100. Kunnas T, Määttä K, Nikkari ST. Genetic polymorphisms of transcription factor NRF2 and of its host gene sulfiredoxin (SRXN1) are associated with cerebrovascular disease in a Finnish cohort, the TAMRISK study. *Int J Med Sci.* 2016 Apr 10;13(5):325–9.
101. von Otter M, Bergström P, Quattrone A, de Marco EV, Annesi G, Söderkvist P, et al. Genetic associations of Nrf2-encoding NFE2L2 variants with Parkinson's disease - a multicenter study. *BMC Med Genet.* 2014 Dec 12; 15:131.
102. Bergström P, von Otter M, Nilsson S, Nilsson AC, Nilsson M, Andersen PM, et al. Association of NFE2L2 and KEAP1 haplotypes with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014 Mar;15(1–2):130–7.
103. Okano Y, Nezu U, Enokida Y, Lee MTM, Kinoshita H, Lezhava A, et al. SNP (-617C>A) in ARE-like loci of the NRF2 gene: a new biomarker for prognosis of lung adenocarcinoma in Japanese non-smoking women. *PLoS One.* 2013;8(9):e73794.
104. Xing C, Sestak AL, Kelly JA, Nguyen KL, Bruner GR, Harley JB, et al. Localization and replication of the systemic lupus erythematosus linkage signal at 4p16: interaction with 2p11, 12q24 and 19q13 in European Americans. *Hum Genet.* 2007 Jan;120(5):623–31.
105. Córdova EJ, Velázquez-Cruz R, Centeno F, Baca V, Orozco L. The NRF2 gene variant, -653G/A, is associated with nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2010 Sep;19(10):1237–42.
106. Yamamoto T, Yoh K, Kobayashi A, Ishii Y, Kure S, Koyama A, et al. Identification of polymorphisms in the promoter region of the human NRF2 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Aug 13;321(1):72–9.

107. Guan CP, Zhou MN, Xu AE, Kang KF, Liu JF, Wei XD, et al. The susceptibility to vitiligo is associated with NF-E2-related factor2 (Nrf2) gene polymorphisms: a study on Chinese Han population. *Exp Dermatol*. 2008 Dec;17(12):1059–62.
108. Gerenova J, Stanilova S. IL-12B and IL-10 gene polymorphisms in the development of Hashimoto's thyroiditis. *Int J Immunogenet*. 2016 Dec 1;43(6):397–403.
109. Jung JH, Song GG, Kim JH, Choi SJ. Association of Interleukin 10 Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease: Meta-Analysis. *Scand J Immunol*. 2016 Nov 1;84(5):272–7.
110. Inoue N, Watanabe M, Wada M, Morita M, Hidaka Y, Iwatani Y. IL-10 -592A/C polymorphism is associated with severity of Hashimoto's disease. *Cytokine*. 2013 Oct;64(1):370–4.
111. Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Fukushima T, Ishii R, et al. Interleukin-10 gene promoter region polymorphisms in patients with type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences; 2003. p. 344–7.
112. Çil E, Kumral A, Kanmaz-Özer M, Vural P, Doğru-Abbasoğlu S, Altuntaş Y, et al. Interleukin-10-1082 gene polymorphism is associated with papillary thyroid cancer. *Mol Biol Rep*. 2014;41(5):3091–7.
113. Datta A, Tuz Zahora F, Abdul Aziz M, Sarowar Uddin M, Ferdous M, Shalahuddin Millat M, et al. Association study of IL10 gene polymorphisms (rs1800872 and rs1800896) with cervical cancer in the Bangladeshi women. *Int Immunopharmacol*. 2020 Dec;89(Pt B):107091.
114. Wang K, Jiao Z, Chen H, Liu X, Lu J, Liu X, et al. The association between rs1800872 polymorphism in interleukin-10 and risk of cervical cancer: A meta-analysis. *Medicine*. 2021 Jan 22;100(3): e23892.
115. Moghimi M, Ahrar H, Karimi-Zarchi M, Aghili K, Salari M, Zare-Shehneh M, et al. Association of IL-10 rs1800871 and rs1800872 polymorphisms with breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis. Vol. 19, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention; 2018. p. 3353–9.
116. Li L, Xiong W, Li D, Cao J. Association of Interleukin-10 Polymorphism (rs1800896, rs1800871, and rs1800872) With Breast Cancer Risk: An Updated Meta-Analysis Based on Different Ethnic Groups. *Front Genet*. 2022 Feb 4;13.
117. Palivonaite M, Gedvilaite G, Glebauskiene B, Kriauciuniene L, Rovite V, Liutkeviciene R. IL-10 Gene Rs1800871, Rs1800872, and Rs1800896 Polymorphisms and IL-10 Serum Levels Association with Pituitary Adenoma. *Biomedicines*. 2022 Aug 8;10(8).
118. Shu Y, Chen Y, Luo H, Li H, Tang J, Liang Y, et al. The Roles of IL-10 Gene Polymorphisms in Diabetes Mellitus and Their Associated Complications: A Meta-Analysis. *Horm Metab Res*. 2018 Nov;50(11):811–5.
119. Chikoti S, Najiya U, Sumanlatha G, Jahan P. Cytokine gene variants of TNF- α and IL-10 in the propensity of type 2 diabetes in south Indian population. *J Diabetes Complications*. 2022 Oct;36(10):108304.
120. Pereira APL, Trugilo KP, Okuyama NCM, Sena MM, Couto-Filho JD, Watanabe MAE, et al. IL-10 c.-592C>A (rs1800872) polymorphism is associated with cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020 Aug;146(8):1971–8.

121. Masilionyte U, Gedvilaite G, Kaikaryte K, Vilkeviciute A, Kriauciuniene L, Glebauskiene B, et al. IL-10 Gene Polymorphisms and IL-10 Serum Levels in Patients with Multiple Sclerosis in Lithuania. *Brain Sci.* 2022 jun 18;12(6).
122. López MS, Tiscornia MM, Dicarlos MB, Zapata PD. IL-10 gene promoter region polymorphisms and their association with celiac disease. *Revista española de enfermedades digestivas.* 2020 Dec;112(12):915–20.
123. Su Y, Zhao H. Predisposition of Inflammatory Bowel Disease Is Influenced by IL-8, IL-10, and IL-18 Polymorphisms: A Meta-Analysis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2020;181(10):799–806.
124. Mohammadi S, Saghaeian Jazi M, Zare Ebrahimabad M, Eghbalpour F, Abdolahi N, Tabarraei A, et al. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms (rs1800896, rs1800871 and rs1800872) and haplotypes are associated with the activity of systemic lupus erythematosus and IL10 levels in an Iranian population. *Int J Immunogenet.* 2019 Feb;46(1):20–30.
125. Ge L, Huang Y, Zhang H, Liu R, Xu N. Association between polymorphisms of interleukin 10 with inflammatory biomarkers in East Chinese Han patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2015 May;82(3):182–6.
126. Zou L, Wang L, Gong X, Zhao H, Jiang A, Zheng S. The association between three promoter polymorphisms of IL-10 and inflammatory bowel diseases (IBD): a meta-analysis. *Autoimmunity.* 2014 Feb;47(1):27–39.
127. Vila L, Lucas A, Donnay S, de la Vieja A, Wengrovicz S, Santiago P, et al. Iodine nutrition status in Spain Needs for the future. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2020 Jan 1;67(1):61–9.
128. Vila L, Lucas A, Donnay S, de la Vieja A, Wengrovicz S, Santiago P, et al. Iodine nutrition status in Spain Needs for the future. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2020 Jan;67(1):61–9.
129. González L, DFD castro F. El bocio endémico en la provincia de Salamanca: I. Distribución geográfica y grado de incidencia. *RevClinEsp.* 1975; 136:227–33.
130. Dayan CM, Daniels GH. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med.* 1996 Jul 11;335(2):99–107.