

Originals

INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE (iNOS) EXPRESSION IN AUTOIMMUNE THYROID DISORDERS (AITD)

Introduction: Nitric oxide is synthesized by different cell types through the action of the enzyme nitric oxide synthase (NOS). There are four isoforms of this enzyme: the neuronal, the endothelial, the mitochondrial, and the inducible (iNOS) forms. Although NO production may play an important role in the pathogenesis of inflammation and tissue damage, its possible role in autoimmune thyroiditis has not been adequately explored.

Objective: To study protein and mRNA expression of iNOS in human autoimmune thyroid disorders (AITD).

Patients and method: We evaluated the expression of iNOS in thyroid gland specimens from 10 patients with Graves' disease (GD), from five patients with Hashimoto's thyroiditis (HT) and from 10 controls by immunohistochemical and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: Both immunohistochemistry and PCR techniques showed up-regulated expression of iNOS in the thyroid glands of patients with GD and HT. iNOS expression was higher in GD than in HT. In contrast, no iNOS expression was detected in normal thyroid tissue. In both GD and HT, iNOS was detected in thyrocytes, mainly in those localized in areas close to the inflammatory cell infiltrate. In addition, up-regulated expression of iNOS was observed in endothelial cells and thyroid-infiltrating mononuclear cells in both GD and HT.

Conclusions: The enhanced expression of iNOS in autoimmune thyroiditis suggests that NO synthesis may play an important role in the inflammatory phenomena and tissue damage observed in this disease.

Key words: Nitric oxide. Nitric oxide synthase. Autoimmune thyroid disorders. Thyroid follicular cells.

Expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible en las enfermedades tiroideas autoinmunitarias

NICTÉ FIGUEROA-VEGA^{a,b}, PEDRO MAJANO^c, EDUARDO LARRAÑAGA^d, JOSÉ MIGUEL BRAVO^d, ROSARIO RODRÍGUEZ-RAMOS^c, ROBERTO GONZÁLEZ-AMARO^b Y MÓNICA MARAZUELA^e

^aServicio de Endocrinología. Hospital Universitario de La Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.

^bDepartamento de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí. México.

^cUnidad de Investigación. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid. España.

^dServicio de Cirugía General. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid. España

^eDepartamento de Fisiología y Morfología. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad San Pablo CEU. Madrid. España.

Introducción: Diferentes tipos de células producen óxido nítrico mediante la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Existen cuatro isoformas de la enzima NOS, la neuronal, la endotelial, la mitocondrial y la inducible (iNOS). La producción de NO puede tener un papel importante en la patogenia de la inflamación y el daño de tejidos que no ha sido explorado adecuadamente en la enfermedad tiroidea autoinmunitaria.

Objetivo: Estudiar la expresión de iNOS, tanto en proteína como en el ARNm, en las enfermedades tiroideas autoinmunitarias.

Pacientes y método: Se evaluó la expresión de iNOS en los tiroides de 10 pacientes con enfermedad de Graves (EG), 5 con tiroiditis de Hashimoto (TH) y 10 controles sanos, mediante inmunohistoquímica y transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Resultados: Se encontró un incremento en la expresión de iNOS en la glándula tiroideas de pacientes con EG y con TH tanto por PCR como mediante inmunohistoquímica. Esta expresión fue mayor en pacientes con EG. Por el contrario, en la glándula tiroideas de sujetos sanos no se observó expresión de iNOS. La expresión de iNOS, tanto en EG como en TH, se detectó en células foliculares tiroideas, principalmente en las próximas al infiltrado inflamatorio. Asimismo, se observó expresión de iNOS en células endoteliales y células mononucleares del infiltrado inflamatorio en EG y TH.

Conclusiones: La expresión prominente de iNOS en la enfermedad tiroidea autoinmunitaria indica que el NO puede tener un papel importante en la patogenia del fenómeno inflamatorio y el daño del tejido que ocurre en esta afección.

Palabras clave: Óxido nítrico. Óxido nítrico sintetasa. Enfermedades tiroideas autoinmunitarias. Células foliculares tiroideas.

Becas del Fondo de Investigación Sanitaria (04/2257, 07/1119) y de la Fundación de la Mutua Madrileña.

Correspondencia: Dra. M. Marazuela Azpiroz.
Servicio de Endocrinología. Hospital Universitario de La Princesa. UAM.
Diego de León, 62. 28006 Madrid. España.
Correo electrónico: mmarazuela.hlpr@madrid.salud.org

Manuscrito recibido el 14-3-2008 y aceptado para su publicación el 20-6-2008.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades tiroideas autoinmunitarias (ETAI) son un grupo de entidades nosológicas que incluyen, principalmente, la tiroiditis de Hashimoto (TH) y la enfermedad de Graves (EG). Mientras que la TH se caracteriza por un infiltrado inflamatorio constituido principalmente por células mononucleares y destrucción de los folículos tiroideos¹, la EG está mediada principalmente por autoanticuerpos dirigidos contra el receptor de la tirotropina (TSH) y se acompaña de hipertrofia de las células tiroideas, con un infiltrado inflamatorio variable². Aunque la fisiopatología de las ETAI no se ha definido aún por completo, hay múltiples evidencias de que diferentes subpoblaciones de linfocitos y macrófagos tienen un papel clave en ella debido a la síntesis de citocinas³⁻⁵. Asimismo, parece que las células foliculares tiroideas (CFT) también tienen un papel activo en estas enfermedades actuando no sólo como células presentadoras de antígeno, sino también como fuente de sustancias proinflamatorias que pueden ser importantes para la progresión del daño en la glándula tiroidea⁶.

El óxido nítrico se sintetiza a partir de la L-arginina por la enzima NO sintetasa (NOS)⁷. La isoforma inducible de esta enzima (iNOS, también denominada NOS2) no requiere Ca²⁺ para su función y se expresa en diversos tipos celulares, principalmente macrófagos y células endoteliales (CE). Por otra parte, las tres isoformas constitutivas son dependientes del Ca²⁺ y corresponden a la neuronal (nNOS o NOS1), la endotelial (eNOS o NOS3) y la mitocondrial (mtNOS o NOS4)⁸. Las isoformas constitutivas eNOS y nNOS producen pequeñas cantidades de NO, importante durante la homeostasis como agente neurotransmisor y como regulador de la vasodilatación y la permeabilidad vascular⁹. En contraste, iNOS permite que las células liberen grandes cantidades de NO en respuesta a citocinas como el interferón (IFN) gamma, el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y la interleucina (IL) 1¹⁰. Este NO es capaz de mediar algunos de los efectos citotóxicos y citostáticos del sistema inmunitario. Aunque se ha descrito que la actividad citotóxica del NO por sí misma es débil, esta molécula es capaz de reaccionar con aniones superóxido producidos por macrófagos activados, lo cual genera peróxidos de nitratos, que a su vez causan daño al tejido¹¹.

Varios estudios han demostrado la sobreexpresión de iNOS en enfermedades inflamatorias crónicas (p. ej., esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, cirrosis primaria biliar, hepatitis autoinmunitaria)¹²⁻¹⁴, así como en diversos tumores (cáncer de ovario, mama, estómago y tiroides), en los que participa en procesos clave como la angiogénesis y la apoptosis¹⁵⁻¹⁷.

El presente trabajo tuvo el propósito de estudiar la expresión y la distribución tisular *in situ* de la enzima iNOS en muestras de tiroides de pacientes con TH y EG.

MATERIAL Y MÉTODO

Muestras

Se obtuvieron muestras de glándula tiroidea de 10 pacientes con TH y 5 con EG que fueron sometidos a tiroidectomía unilateral o total por razones médicas en el Hospital Universitario de La Princesa (Madrid, España). Como control se utilizó tejido tiroideo no afectado de glándulas con adenoma único tiroideo. La porción del tejido extraído por cirugía se recogió en solución salina y se congeló inmediatamente en medio OCT (Ames Co., Miles Laboratories, Elkhart, Indiana, Estados Unidos) enfriado por nitrógeno líquido, y se almacenó a -80 °C. El diagnóstico de la enfermedad fue establecido mediante examen histopatológico y criterios clínicos. En todos los casos se obtuvo un consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Universitario de La Princesa.

Se determinaron por métodos sistemáticos las concentraciones séricas de TSH y tiroxina no unida a proteína (T4L); además, se midieron los títulos de los autoanticuerpos anti-tirotoglobulínicos, antiperoxidasa y antíreceptor de la TSH mediante la técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA) y radioinmunoanálisis (RIA).

Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron anti-iNOS (IgG2a; Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, Estados Unidos), que no es reactivo contra eNOS y nNOS, así como anticuerpos anti-factor VIII (Dako Cytomation, Dinamarca) y anti-tirotoglobulínicos (Dako Cytomation, Dinamarca). Como control negativo se utilizó el sobrenadante de mieloma murino P3X63.

Inmunohistoquímica

Se obtuvieron cortes congelados de las glándulas tiroideas de 4 µm de grosor en un criostato, que se fijaron en acetona y se tiñeron mediante el método de inmunoperoxidasa indirecta. Previamente, se bloquearon los receptores Fc con un suero anti-Fc humano producido en cabra y diluido 1/50 en tampón TBS durante 10 min. Después, los cortes fueron incubados durante 1 h con el anticuerpo monoclonal correspondiente a una concentración de 1 µg/ml. Al cabo de este tiempo, se realizaron tres lavados con TBS y se incubaron con un anticuerpo antiinmunoglobulina de ratón marcado con biotina, seguido de estreptavidina-peroxidasa (Envision Dako Cytomation, Dinamarca), durante 30 min, se lavaron las muestras con TBS y se expusieron a una solución de 3,3-diamino benzidina hasta aparición de color. Finalmente, las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina y montadas por métodos sistemáticos.

El grado de expresión del antígeno estudiado se estimó mediante el método semicuantitativo descrito por Sinicrope et al¹⁸, basado en el porcentaje de células positivas para el marcador determinado. Los grados de expresión fueron los siguientes: 0, todas las células negativas; 1, menos del 25% de células positivas; 2, 25-50% de células positivas; 3, 51-75% de células positivas; 4, más del 75% de células positivas. La intensidad de expresión fue clasificada en cuatro categorías: 0, negativo; 1, débil; 2, moderado; 3, fuerte.

RT-PCR

El ARN total de las glándulas tiroideas de pacientes con EG y HT se aisló mediante el empleo del reactivo Ultra-

pec, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bioteck Laboratories Inc., Houston, Texas, Estados Unidos). Posteriormente, 2 µg de ARN fueron sometidos a retrotranscripción con el empleo de la transcriptasa inversa del virus Moloney de leucemia murina M-MLV (Promega), en las siguientes condiciones: 70 °C 5 min; 4 °C 5 min; 25 °C 10 min; 37 °C 90 min y 94 °C 5 min. El ADNc producto de la reacción fue amplificado por PCR con el empleo de oligonucleótidos específicos para iNOS: 5'-TGCCA-GATGGCAGCATCAGA-3' (*forward*) y 5'-ACTTCCTC-CAGGATGTTGTA-3' (*reverse*) (Perkin-Elmer Corp.), obteniendo un producto de 370 bp. Como control interno se utilizaron oligonucleótidos específicos para el gen de *HPRT-3*: 5'-AAAGCCGCTCGCAAGAGTGC-3' (*forward*) y 5'-ACTTGCCTCCTGCAAAGCAC-3' (*reverse*) (Roche Applied Science). La amplificación para iNOS se realizó en las siguientes condiciones: 40 ciclos de PCR, con desnaturación a 95 °C 30 s; alineamiento a 60 °C 30 s y extensión a 72 °C 45 s. Las reacciones de amplificación para *HPRT-3* fueron: 30 ciclos de 95 °C 30 s; alineamiento a 60 °C 30 s, y extensión a 72 °C 42 s. Finalmente, los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio. La semicuantificación fue realizada mediante densitometría con el empleo de un sistema de fotodocumentación (Kodak).

Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media aritmética ± desviación estándar. La comparación estadística entre grupos fue realizada mediante las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis con la corrección de Duna, empleando el programa SPSS versión 16.0. Se consideró significación si $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

RT-PCR

Se encontraron concentraciones de ARNm de iNOS significativamente más altos en las muestras de tiroides procedentes de pacientes con ETAI. La expresión en muestras de pacientes con EG fue mayor que en las de TH (fig. 1A). Al analizar de forma individual la expresión del ARNm de iNOS y las características histopatológicas, se encontró una correlación significativa entre los primeros y se correlacionó tanto con el grado de hiperplasia de las CFT como con el grado de inflamación ($p < 0,05$ en ambos casos). En la figura 1B se muestra la expresión del ARNm de iNOS en las muestras estudiadas.

Inmunohistoquímica

La tabla 1 muestra la relación entre el grado de inflamación del tiroides y la expresión de iNOS en pacientes con TH y EG.

Se detectó la expresión de iNOS en CFT tanto en EG como en TH (fig. 2A y B). La expresión fue más intensa en las CFT hiperplásicas en glándulas de pacientes con EG (fig. 2B). Además, la expresión de iNOS fue más prominente en las CFT que se encontraban en la proximidad del infiltrado inflamatorio

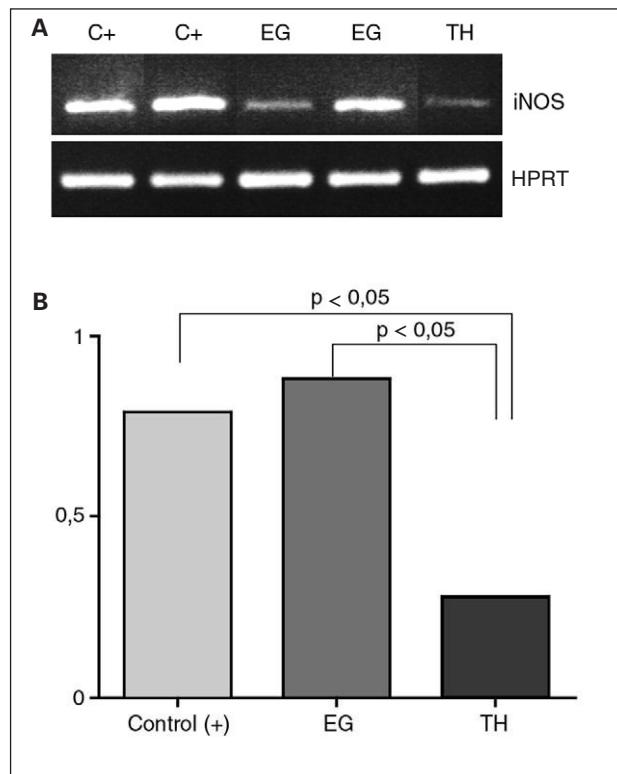


Fig. 1. Expresión de iNOS en tejido tiroideo de muestras del tiroides de pacientes con tiroiditis de Hashimoto (TH) y enfermedad de Graves (EG) y controles positivos de hepatitis que expresan iNOS (C) mediante RT-PCR. Datos representativos de los tres grupos de tejido tiroideo. A: se observa máxima expresión de iNOS en el tiroides de pacientes con EG. B: densitometría del producto de la PCR de todas las muestras estudiadas, definida como densidad óptica referida al control interno (HPRT).

TABLA 1. Grado de expresión de la NO sintetasa inducible (iNOS) por inmunohistoquímica en las muestras de tiroides de pacientes con enfermedad tiroidea autoinmunitaria (ETAI)

	Infiltrado	iNOS epitelio	iNOS endotelio
TH	Abundante	+++	++
	Escaso	+	+
EG	Abundante	+++	+++
	Escaso	++	++
Controles	Ausente	-	-

EG: enfermedad de Graves; TH: tiroiditis de Hashimoto.

-: sin expresión de iNOS; +: débil expresión de iNOS; ++: moderada expresión de iNOS; +++: intensa expresión de iNOS.

(fig. 2D, flecha). Por el contrario, no se encontró inmunotinción para iNOS en las glándulas normales (fig. 2C).

Asimismo, se detectó un aumento en la expresión de iNOS en las células endoteliales de tiroides de pacientes con ETAI, fundamentalmente de aquellos con EG (fig. 3A), en contraste con el escaso número de vasos con tinción positiva para iNOS en tiroides normal (datos no mostrados). Esta inmunotinción positiva fue más prominente en los vasos de mediano calibre y en

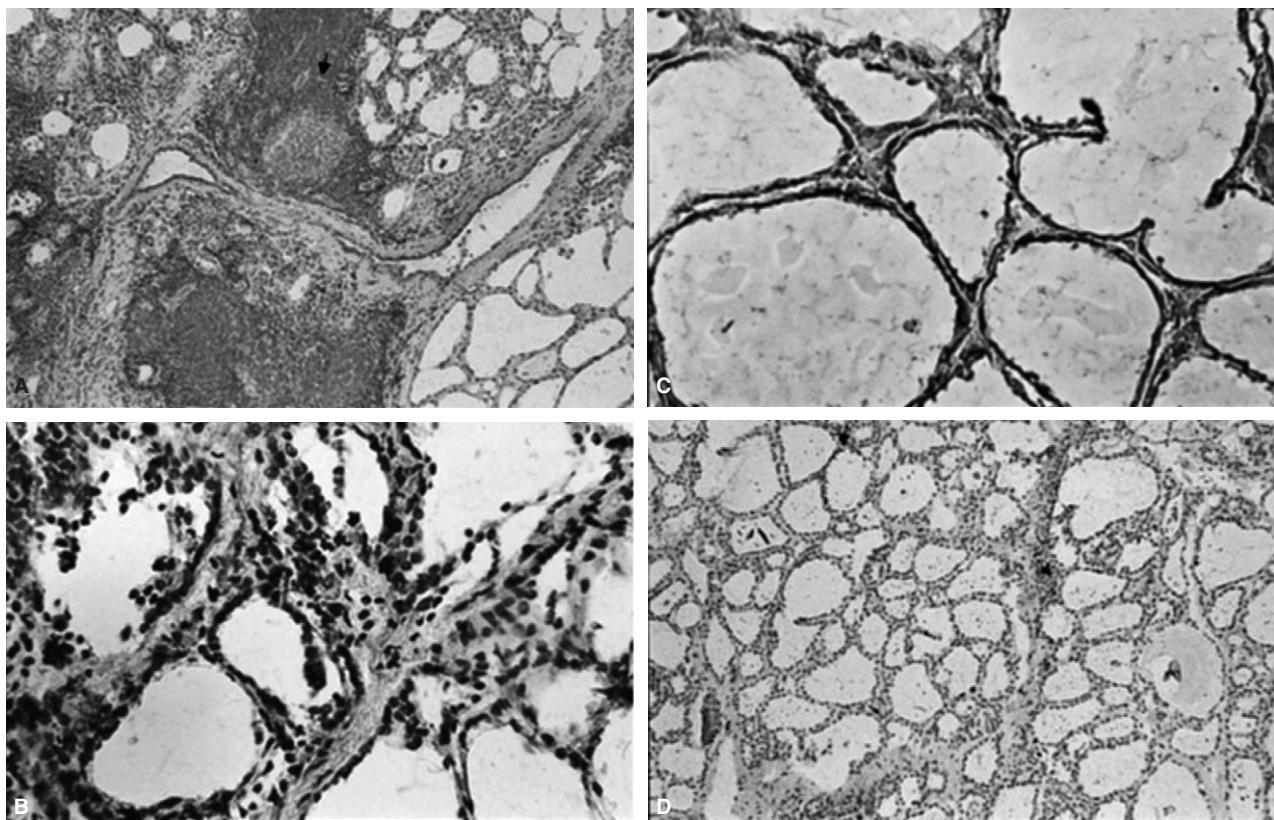


Fig. 2. Expresión de la iNOS en cortes de tiroides teñidos con inmunoperoxidasa en pacientes con tiroiditis de Hashimoto (TH), enfermedad de Graves (EG) y controles. A: marcada expresión de iNOS de novo en tirocitos de zonas adyacentes al infiltrado inflamatorio en un paciente con TH (flecha) ($\times 250$). B: expresión de iNOS en tirocitos en un caso de EG (flecha) ($\times 500$). C: en tejido tiroideo normal, no se observa inmunotinción para iNOS ($\times 500$). D: la doble marcación para iNOS y tiroglobulina demuestra la expresión de iNOS en tirocitos (flecha) en un paciente con EG ($\times 500$).

menor proporción en las CE de las vérulas poscapilares. La expresión de iNOS por las CE se confirmó mediante tinción simultánea para el factor VIII, que es un conocido marcador de endotelio (fig. 3B). Otro hallazgo interesante fue la prominente expresión de iNOS en las células del infiltrado inflamatorio que se encontraban en la vecindad de los vasos sanguíneos que también mostraron una tinción positiva para esta enzima (fig. 3C y D).

DISCUSIÓN

En este trabajo exploramos la expresión de la enzima iNOS en tiroides procedentes de pacientes con ETAI, y observamos una expresión de esta enzima en CFT de pacientes con TH y EG. Asimismo, se detectó iNOS tanto en el infiltrado inflamatorio como en el endotelio, y esta expresión fue también más evidente en glándulas de pacientes con ETAI que en tiroides normal. Es de interés mencionar que este aumento en la expresión de iNOS, más evidente en EG, se correlacionó tanto con el grado de inflamación como con el grado de hiperplasia de las CFT. Aunque se ha estu-

dido ya la expresión de iNOS en varias enfermedades tumorales benignas y malignas tiroideas, sólo un trabajo ha analizado la expresión de esta enzima en biopsias de pacientes con ETAI¹⁹. En ese trabajo se utilizaron exclusivamente técnicas inmunohistoquímicas y no se encontraron diferencias claras entre las diversas enfermedades estudiadas.

El aumento de expresión de iNOS, más marcado en EG, podría estar relacionado con la hiperplasia/hipertrofia de la glándula característico de esta enfermedad. Ello podría estar mediado por el fenómeno de angiogénesis, ya que se ha descrito que el NO induce vasodilatación, incremento en la permeabilidad vascular, proliferación de CE y su migración. Además, también se ha informado de que el NO tiene un papel crítico en la movilización de células progenitoras endoteliales de la médula ósea, todo lo cual está relacionado con la neoformación de vasos sanguíneos, fenómeno necesario para la hiperplasia glandular. A lo anterior contribuirían tanto la iNOS sintetizada por las CFT como la expresada por el infiltrado inflamatorio, en los casos en que éste es prominente. A este respecto, se ha descrito que las CFT son efectivamente capaces de producir NO²⁰. Por otra parte, en el caso de la

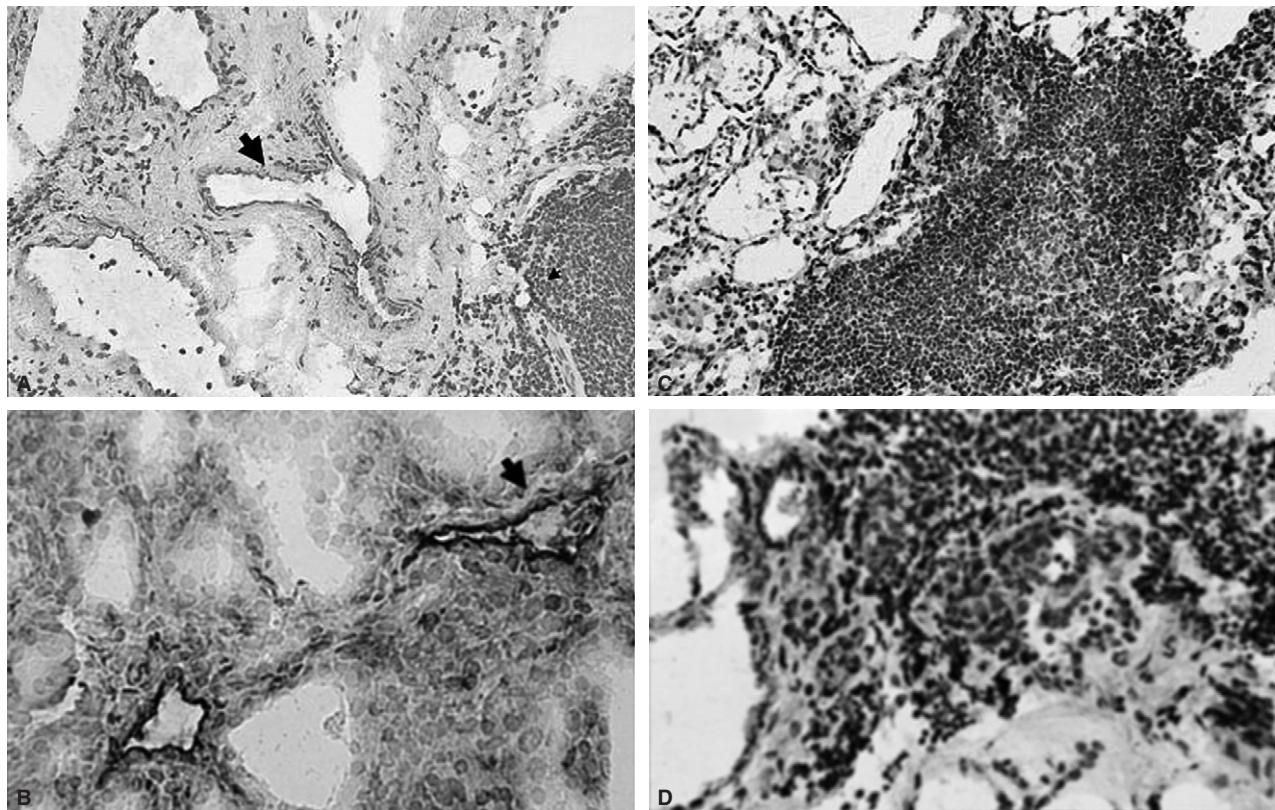


Fig. 3. Patrón de expresión de la iNOS en endotelio y células mononucleares intratiroideas. A: marcada expresión de iNOS en células endoteliales (CE) perifoliculares en un paciente con EG (flecha) ($\times 50$). B: la doble marcación para iNOS y factor VIII demuestra la expresión de iNOS en CE (flecha) ($\times 500$). C: células mononucleares positivas para iNOS en agregados linfoides en proximidad a CE positivas para iNOS en tiroides de pacientes con TH ($\times 50$). D: expresión de iNOS en el infiltrado inflamatorio de pacientes con enfermedad de Graves (EG) ($\times 500$).

TH, la expresión de iNOS y la síntesis de NO podrían estar relacionadas más bien con el fenómeno inflamatorio y las destrucción del tejido glandular. Se ha observado un aumento de la expresión de esta enzima en distintas enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide²¹, la colitis ulcerosa²² o la infección por *Helicobacter pylori*²³. En el caso de las ETAI, la expresión aumentada de iNOS podría ser secundaria a un aumento de las concentraciones de determinados elementos en el microambiente tiroideo²⁴. Así, se sabe que varias citocinas, principalmente IFN γ y TNF α , incrementan la expresión de iNOS y que la producción de estas citocinas proinflamatorias ocurre en la ETAI, principalmente en la TH²⁵. Lo respalda el hallazgo de mayor expresión de iNOS en las zonas próximas al infiltrado inflamatorio, sitio en que se conseguiría la máxima concentración de IFN γ ²⁶. Además, se ha descrito que las CFT son capaces de producir citocinas proinflamatorias y que estas células en cultivo in vitro producen tanto IL-1 como TNF α . Es evidente que esta producción de citocinas por las CFT podría contribuir en forma significativa a la síntesis de iNOS y la perpetuación del fenómeno inflamatorio²⁷.

Es interesante que hayamos encontrado una correla-

ción positiva y significativa entre el aumento en la expresión intratiroidea de iNOS y la gravedad del daño tisular del tiroides, lo que además indica que el NO también podría contribuir a la patogenia de las ETAI, tanto por su efecto en el fenómeno inflamatorio como por la generación de metabolitos tóxicos, como los peroxinitritos²⁸. En estas condiciones, la formación de peroxinitritos representaría el evento final de una interacción entre varios tipos celulares como los macrófagos, que son fuente de citocinas como IL-1 y TNF α , las células T activadas, como fuente de IFN γ , y las CFT y CE, todos ellos contribuyendo a la síntesis de iNOS y la producción de NO. En este sentido, se ha observado en determinados modelos experimentales de otras enfermedades autoinmunitarias con animales que los inhibidores de NOS pueden prevenir la enfermedad, así como conseguir reducción o retraso en su progresión²⁹.

En resumen, nuestros datos sobre la prominente expresión de iNOS en ETAI indican que el NO podría contribuir a la hiperplasia de la glándula en la EG y al fenómeno inflamatorio y la destrucción del tejido en la TH. Estos hallazgos son importantes para comprender más adecuadamente la patogenia de la ETAI y pueden tener implicaciones terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Weetman AP. Autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity*. 2004;37:337-40.
2. Stassi G, De Maria R. Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:195-204.
3. Phenekos C, Vryonidou A, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Goula M, Papamichail M. Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2). *Neuroimmunomodulation*. 2004;11:209-13.
4. Ajjan RA, Weetman AP. Cytokines in thyroid autoimmunity. *Autoimmunity*. 2003;36:351-9.
5. Marazuela M, García-López MA, Figueroa-Vega N, De la Fuente H, Alvarado-Sánchez B, Monsiváis-Urenda A, et al. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3639-46.
6. Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Feldmann M. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet*. 1983;2:1115-9.
7. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev*. 1998;17:7-23.
8. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994;78:915-8.
9. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43:109-42.
10. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 1994;269:13725-8.
11. Dijkstra G, Moshage H, Van Dullemen HM, De Jager-Krikken A, Tiebosch AT, Kleibeuker JH, et al. Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *J Pathol*. 1998;186: 416-21.
12. Bagasra O, Michaels FH, Zheng YM, Bobroski LE, Spitsin SV, Fu ZF, et al. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:12041-5.
13. Roberts PJ, Riley GP, Morgan K, Miller R, Hunter JO, Middleton SJ, et al. The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon. *J Clin Pathol*. 2001;54:293-7.
14. Sanz-Cameno P, Medina J, Garcia-Buey L, Garcia-Sánchez A, Borque, MJ, Martin-Vilchez S, et al. Enhanced intrahepatic inducible nitric oxide synthase expression and nitrotyrosine accumulation in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 2002;37:723-9.
15. Klimp AH, Hollema H, Kempinga C, Van der Zee AG, De Vries EG, Daemen T, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. *Cancer Res*. 2001;61:7305-9.
16. Li LG, Xu LM. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in gastric adenocarcinomas and their correlation with a poor survival. *World J Gastroenterol*. 2005;11:2539-44.
17. Kitano H, Kitanishi T, Nakanishi Y, Suzuki M, Takeuchi E, Yazawa Y, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human thyroid papillary carcinomas. *Thyroid*. 1999;9: 113-7.
18. Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B, et al. Bcl-2 and p53 oncogene expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*. 1995;55:237-41.
19. Kayser L, Francis D, and Broholm H. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthase in neoplastic and autoimmune thyroid disorders. *Apmis*. 2000;108:785-91.
20. Rasmussen AK, Kayser L, Feldt-Rasmussen U, Bendzen K, et al. Influence of tumour necrosis factor-alpha, tumour necrosis factor-beta and interferon-gamma, separately and added together with interleukin-1 beta, on the function of cultured human thyroid cells. *J Endocrinol*. 1994;143:359-65.
21. Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett*. 1994; 350:9-12.
22. Kimura H, Hokari R, Miura S, Shigematsu T, Hirokawa M, Akiba Y, et al. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut*. 1998;42:180-7.
23. Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, Realpe JL, Zhang XJ, Ruiz B, et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res*. 1996;56:3238-43.
24. Kitasato A, Tajima Y, Kuroki T, Tsutsumi R, Adachi T, Mishima T, et al. Inflammatory cytokines promote inducible nitric oxide synthase-mediated DNA damage in hamster gallbladder epithelial cells. *World J Gastroenterol*. 2007;13:6379-84.
25. Margolick JB, Weetman AP, Burman KD. Immunohistochemical analysis of intrathyroidal lymphocytes in Graves' disease: evidence of activated T cells and production of interferon-gamma. *Clin Immunol Immunopathol*. 1988;47:208-18.
26. Garcia-Lopez MA, Sancho D, Sanchez-Madrid F, Marazuela M. Thyrocytes from autoimmune thyroid disorders produce the chemokines IP-10 and Mig and attract CXCR3+ lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:5008-16.
27. Kasai K, Hattori Y, Nakanishi N, Manaka K, Banba N, Motohashi S, et al. Regulation of inducible nitric oxide production by cytokines in human thyrocytes in culture. *Endocrinology*. 1995;136:4261-70.
28. Willenborg DO, Staykova MA, Cowden WB. Our shifting understanding of the role of nitric oxide in autoimmune encephalomyelitis: a review. *J Neuroimmunol*. 1999;100:21-35.
29. Hooper DC, Bagasra O, Marini JC, Zborek A, Ohnishi ST, Kean R, et al. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:2528-33.