



Universitat Autònoma de Barcelona

FACULTAT DE CIÈNCIES  
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I MICROBIOLOGIA

FACTORES GENÉTICOS DE  
SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES Y  
RIESGO GENÉTICO DEL TRATAMIENTO CON  $^{131}\text{I}$

TESIS DOCTORAL  
Aida Baida Gil  
2006

# FACTORES GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES Y RIESGO GENÉTICO DEL TRATAMIENTO CON <sup>131</sup>I

Memoria presentada por Aida Baida Gil  
para optar al grado de Doctora en Genética  
por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès),  
Julio 2006

Aida Baida Gil

Vº Bº  
Los directores de la tesis

**Dr. Ricard Marcos Dauder**

**Dra. Antonia Velázquez Henar**

A mi familia

Cuando partas hacia Itaca  
pide que tu camino sea largo  
y rico en aventuras y conocimiento.

A Lestrigones, Cíclopes  
y furioso Poseidón no temas,  
en tu camino no los encontrarás  
mientras en alto mantengas tu pensamiento,  
mientras una extraña sensación  
invada tu espíritu y tu cuerpo.

A Lestrigones, Cíclopes  
y fiero Poseidón no encontrarás  
si no los llevas en tu alma,  
si no es tu alma que ante ti los pone.

Pide que tu camino sea largo.  
Que muchas mañanas de verano  
haya en tu ruta  
cuando con placer, con alegría  
arribes a puertos nunca vistos.  
Detente en los mercados fenicios  
para comprar finos objetos:  
madreperla y coral, ámbar y ébano,  
sensuales perfumes -tantos como puedas-  
y visita numerosas ciudades egipcias  
para aprender de sus sabios.  
Lleva a Itaca siempre en tu pensamiento,  
llegar a ella es tu destino.  
No apresures el viaje,  
mejor que dure muchos años  
y viejo seas cuando a ella llegues,  
rico con lo que has ganado en el camino  
sin esperar que Itaca te recompense.

A Itaca debes el maravilloso viaje.  
Sin ella no habrías emprendido el camino  
y ahora nada tiene para ofrecerte.  
Si pobre la encuentras, Itaca no te engañó.  
Hoy que eres sabio, y en experiencias rico,  
comprendes qué significan las Itacas.

K. KAVAFIS

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer la colaboración de todas las personas que con su interés y, sobre todo, con su sangre han hecho posible este trabajo. En especial a todos los niños que esperaron, más o menos atemorizados, el pinchazo. También agradezco la ayuda del personal sanitario del hospital Vall d'Hebron y muy especialmente la de Pere que, además, hizo más llevaderas las múltiples idas y venidas.

GRACIAS a todos los que de una forma u otra habéis hecho que mi estancia fuera más amena, divertida e irrepetible (a pesar de mis continuas quejas lo he tenido en cuenta), muy especialmente a los «moleculares» en peligro de extinción. A los que me han ayudado cuando lo he necesitado, tanto profesional como personalmente, entre los que se incluyen Antonia y Ricard o Ricard y Antonia, el resto de profesores y compañeros del grupo de mutagénesis y mis amigos y familia.

A los que, como yo, piensan que ir de beca en beca y de país en país no es malvivir, y que tener éxito no consiste en conseguir un trabajo fijo y un piso; a esos pocos entre los que me incluyo, les dedico estas frases:

«Ah, pero el hombre debe ir más allá de lo que está a su alcance, si no, ¿para qué está el cielo?» Robert Browning

«Sólo existe una clase de éxito: lograr vivir a tu manera» Christopher Morley

Recuerdo que, al poco de llegar, un amigo me dijo: «No te preocupes, cuando lleves aquí un año, o menos, ya no echarás de menos Salamanca, ni a tu familia y amigos». Se equivocó. Ahora, seis años después, sigo echando de menos Salamanca, a mi familia y a mis amigos; pero el círculo se amplía y, de aquí en adelante, echaré de menos 2 ciudades, 2 familias y más amigos.

Este trabajo se ha llevado a cabo con la aportación de una beca predoctoral de la Universitat Autònoma de Barcelona (2001-2004).

# ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	i
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. El origen del cáncer</b> .....	1
1.1 Base genético-ambiental del cáncer .....	2
1.2 Factores de susceptibilidad al cáncer.....	7
1.2.1 Factores de susceptibilidad ambientales.....	8
1.2.2 Factores de susceptibilidad genéticos y epigenéticos.....	9
1.3 Detección e identificación de los factores genéticos de susceptibilidad al cáncer .....	12
<b>2. Funcionamiento del tiroides y patologías</b> .....	15
2.1 Base genética del cáncer de tiroides.....	20
2.1.1 Factores de susceptibilidad al cáncer de tiroides .....	25
<b>3. Diagnóstico y tratamiento del cáncer de tiroides</b> .....	29
3.1 La radiación ionizante en el tratamiento del cáncer de tiroides. Uso del $^{131}\text{I}$ .....	33
3.2 Características y metabolismo del $^{131}\text{I}$ .....	35
3.3 Mecanismo de acción del $^{131}\text{I}$ .....	37
3.4 Efectos secundarios del tratamiento con $^{131}\text{I}$ .....	37
3.4.1 Efecto genotóxico del $^{131}\text{I}$ .....	39
<b>4. Efectos biológicos de la radiación ionizante</b> .....	41
4.1 Tipos de exposición .....	44
4.2 Unidades de actividad y dosimetría .....	45
4.3 Efectos genotóxicos de la radiación ionizante .....	47
4.3.1 Efectos directos de la radiación ionizante .....	49
4.3.2 Efectos indirectos de la radiación ionizante.....	50
4.3.2.1 Inestabilidad genómica y efecto <i>bystander</i> ....	51
4.3.2.2 Inestabilidad transgeneracional .....	55

<b>5. Detección de los efectos de la radiación ionizante</b> .....	57
5.1 El ensayo de micronúcleos.....	59
5.2 El ensayo del cometa o electroforesis de células individuales en geles de agarosa (SCGE) .....	61
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	67
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	71
<b>1. Población analizada y extracción de DNA</b> .....	71
<b>2. Análisis de los microsatélites THRA1 y BAT-40</b> .....	73
<b>3. Análisis de polimorfismos de la región 1p12-13</b> .....	76
<b>4. Establecimiento de líneas celulares linfoblastoides</b> .....	79
<b>5. Ensayo de micronúcleos</b> .....	81
<b>6. Ensayo del cometa</b> .....	81
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	87
<b>1. Susceptibilidad genética al cáncer de tiroides</b> .....	87
1.1 Análisis del microsatélite THRA1 .....	87
1.2 Análisis del microsatélite BAT-40 .....	90
1.3 Análisis de polimorfismos de la región 1p12-13 .....	94
1.3.1 Efecto modulador de factores genético-ambientales...103	
1.3.2 Interacción entre los polimorfismos de la región 1p12-13 .....	108
<b>2. Análisis de la inestabilidad genómica inducida por el <sup>131</sup>I         en individuos expuestos y en sus familias</b> .....	110
2.1 Ensayo de micronúcleos.....	110
2.2 Ensayo del cometa .....	112

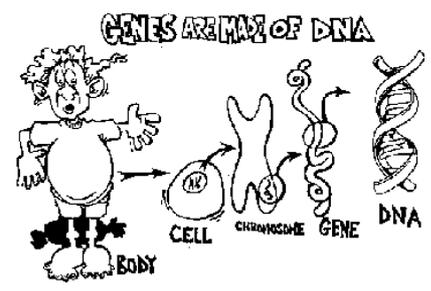
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	119
<b>1. Susceptibilidad genética al cáncer de tiroides</b> .....	119
1.1 Susceptibilidad al cáncer de tiroides y el receptor $\alpha 1$ de la hormona tiroidea .....	119
1.2 Susceptibilidad al cáncer de tiroides y la región 1p12-13.....	121
1.2.1 Análisis del microsatélite BAT-40.....	122
1.2.2 Análisis de SNPs en la región 1p12-13 .....	124
1.2.2.1 Efecto modulador de factores genético- ambientales .....	128
<b>2. Efecto a largo plazo del <math>^{131}\text{I}</math></b> .....	130
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	139
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	143
<b>Anexo 1:</b> Encuesta .....	I
<b>Anexo 2:</b> Baida A., Farrington S.M., Galofré P., Marcos R. y Velázquez A. (2005) Thyroid cancer susceptibility and THRA1 and BAT-40 repeats polymorphisms. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 14: 638-642.	
<b>Anexo 3:</b> Tablas de resultados de la interacción entre los SNPs de la región 1p12-13 .....	XVII

## ABREVIATURAS

<b>Bq</b>	Becquerel
<b>C</b>	Culombio
<b>CBMN</b>	Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis
<b>cGy</b>	Centigray
<b>Ci</b>	Curio
<b>D</b>	Dosis absorbida
<b>DB</b>	Daño basal
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DL</b>	Desequilibrio de ligamiento
<b>DO</b>	Daño oxidativo
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>DSB</b>	Rotura de doble cadena
<b>DT</b>	Daño total
<b>E</b>	Dosis efectiva
<b>EBV</b>	Virus de Epstein-Barr
<b>EndoIII</b>	Endonucleasa III
<b>FAP</b>	Poliposis adenomatosa familiar
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FISH</b>	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
<b>Fpg</b>	Formamidopirimidina DNA glicosilasa
<b>GBq</b>	Gigabecquerel
<b>GDNF</b>	Factores neurotróficos derivados de células gliales
<b>GLM</b>	Modelo lineal general
<b>Gy</b>	Gray
<b>H</b>	Dosis equivalente
<b>HNPCC</b>	Cáncer de colon hereditario no polipósico
<b>HPV</b>	Virus del papiloma humano
<b>HSD3<math>\beta</math>1</b>	3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1
<b>HUMN</b>	<i>Human Micronucleus Project</i>
<b>IC</b>	Intervalo de confianza

<b>IR</b>	Infrarrojos
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>KeV</b>	Kiloelectrón voltio
<b>LBCL</b>	Línea celular linfoblastoide
<b>LET</b>	Transferencia lineal de energía
<b>LMA</b>	Agarosa de bajo punto de fusión
<b>LOH</b>	Pérdida de heterocigosidad
<b>Mb</b>	Megabase
<b>mCi</b>	Milicurio
<b>MEN</b>	Neoplasia múltiple endocrina
<b>MeV</b>	Megaelectrón voltio
<b>mm</b>	Milímetros
<b>MN</b>	Micronúcleos
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento neuronal
<b>NMA</b>	Agarosa de punto de fusión normal
<b>OR</b>	Odds ratio
<b>OTM</b>	<i>Olive Tail Moment</i>
<b>PAAF</b>	Punción-aspiración con aguja fina
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PBI</b>	Proteína transportadora de compuestos yodados
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>PTC</b>	Carcinoma papilar
<b>R</b>	Roentgen
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SCE</b>	Intercambio entre cromátidas hermanas
<b>SCGE</b>	Electroforesis de células individuales en geles de agarosa
<b>SI</b>	Sistema internacional
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un único nucleótido
<b>STR</b>	Repeticiones cortas en tándem

<b>Sv</b>	Sievert
<b>T<sub>1/2</sub></b>	Periodo de semidesintegración
<b>T3</b>	Triyodotirosina
<b>T4</b>	Tetrayodotirosina o tiroxina
<b>TBG</b>	Globulina fijadora de tiroxina
<b>TG</b>	Tiroglobulina
<b>TPO</b>	Tiroperoxidasa
<b>TR</b>	Receptor de la hormona tiroidea
<b>TRH</b>	Hormona liberadora de tirotropina
<b>TSH</b>	Hormona estimulante del tiroides o tirotropina
<b>TSHR</b>	Receptor de la tirotropina
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana
<b>VNTR</b>	Repetición en tándem de número variable
<b>W<sub>R</sub></b>	Factor de ponderación de la radiación
<b>W<sub>T</sub></b>	Factor de ponderación del tejido



# I. INTRODUCCIÓN

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. El origen del cáncer

El cáncer es uno de los problemas médicos más importantes del último siglo. Es una patología que se desarrolla lentamente, con un intervalo de unos 20 años desde la exposición a un compuesto carcinógeno hasta la detección del tumor, intervalo durante el cual la célula adquiere las capacidades de división, invasión y metástasis (Loeb, 2003). Existen numerosos datos que indican que las células tumorales, invariablemente, presentan diversas alteraciones en el DNA (revisado por Hanahan y Weinberg, 2000). La gran mayoría de las mutaciones que provocan cáncer no son heredadas, sino que surgen espontáneamente como consecuencia del daño químico al DNA, lo que conduce a la alteración de la función de genes importantes. Las células cancerosas presentan dos tipos básicos de mutaciones: mutaciones que incrementan la actividad de ciertas proteínas codificadas por algunos genes, que es el caso de los **oncogenes**; y mutaciones que inactivan a los **genes supresores de tumores** (Bertram, 2001). Ambos tipos de genes se han identificado en células cancerosas animales, humanas y en modelos experimentales (revisado por Hanahan y Weinberg, 2000). En conjunto, los datos existentes sobre los genes humanos implicados en los procesos cancerígenos sugieren que el desarrollo tumoral es análogo a la evolución darwiniana, de forma que una sucesión de cambios genéticos, que confieren algún tipo de ventaja selectiva respecto al crecimiento, desencadena la transformación progresiva de células normales en cancerosas (Nowell, 1976). La progresión del cáncer se debe a la acumulación de alteraciones genéticas y cambios en el patrón de expresión de distintos genes. La identificación de estos genes y de las rutas implicadas será de gran utilidad no sólo para conocer la biología de la carcinogénesis, sino para mejorar el diagnóstico y facilitar el tratamiento. Los estudios genéticos han demostrado ser muy efectivos para la detección de las alteraciones cromosómicas que tienen lugar en las células tumorales. De hecho, los perfiles de expresión de distintos oncogenes y genes supresores de tumores han permitido estudiar el papel de

estos genes en la progresión tumoral, así como establecer modelos de progresión para numerosos tipos de tumor, entre ellos: pulmón, mama, cabeza y cuello y próstata (Garnis *et al.*, 2004).

Se conocen más de 100 tipos diferentes de cáncer, con más de 1000 variedades histopatológicas, siendo la característica común a todas ellas un proliferación celular anormal y descontrolada (revisado por Creus, 2002).

### 1.1. BASE GENÉTICO-AMBIENTAL DEL CÁNCER

El cáncer es un proceso modulado por factores genéticos y ambientales que implica numerosos pasos (Fearon y Vogelstein, 1990) y conlleva la transformación progresiva de una célula normal en una célula tumoral, inmortal e invasiva. Aunque puede aparecer a cualquier edad, en la mayoría de los casos la incidencia aumenta drásticamente con el paso del tiempo. Los factores determinantes de este proceso son numerosos y variados, incluyendo la predisposición genética, la influencia ambiental, agentes infecciosos, factores nutricionales, hormonales, reproductivos, etc. A pesar de que no se conocen por completo todos los pasos y mecanismos que conducen al desarrollo de cáncer, el análisis de las etapas más tardías del desarrollo tumoral ha demostrado la presencia de una serie de alteraciones genéticas que engloban la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumores y la expresión alterada de otros genes asociados al cáncer (revisado por Bergers *et al.*, 1998). Sin embargo, las etapas más tempranas del proceso cancerígeno todavía no están bien establecidas. En 1971, Knudson propuso la teoría «*two-hit*», que postula que los individuos con predisposición al cáncer heredan un alelo mutado en algún gen específico de susceptibilidad o bien adquieren una mutación *de novo* en células somáticas, y sería necesaria una segunda mutación somática en el otro alelo para iniciar la neoplasia (Knudson, 1971). Sin embargo, la probabilidad de que esto suceda depende de la penetrancia de los genes implicados.

Un tumor completamente desarrollado es muy heterogéneo, con la presencia de distintos tipos de subclones celulares y distintos patrones de expresión, lo que sucede incluso entre tumores del mismo tipo, por lo que se pueden considerar específicos de cada paciente. Sin embargo, la mayor parte de los tumores comparte una serie de características que son fundamentales para su desarrollo y que tienen que adquirir de manera selectiva durante la progresión tumoral (Compagni y Christophori, 2000). Estos rasgos o características adquiridas fueron definidos por Hanahan y Weinberg en el 2000 y son los siguientes:

- ✓ **síntesis de sus propios factores de crecimiento**, siendo su proliferación independiente de factores exógenos.
- ✓ **insensibilidad a factores inhibidores de crecimiento**, que son los encargados de bloquear la proliferación celular.
- ✓ **resistencia a la apoptosis**
- ✓ **inmortalización**, las células tumorales tienen un potencial replicativo ilimitado y una gran mayoría de tumores son capaces de regular la expresión de la enzima telomerasa, que mantiene estables los telómeros, implicados en la senescencia celular. La inmortalización es uno de los factores imprescindibles en la transformación maligna de una célula, sin embargo, parece ser un paso tardío en la progresión tumoral.
- ✓ **angiogénesis continua**, los tumores son capaces de estimular la vascularización, proceso que normalmente está estrictamente regulado y es transitorio.
- ✓ **invasión de tejidos y metástasis**, se refiere a la capacidad de las células tumorales de extenderse y establecer nuevas colonias tanto en tejidos cercanos como lejanos (metástasis, que es la causa del 90% de las muertes por cáncer).

Todas estas características pueden aparecer en distintos momentos y en distinto orden en función del tipo de tumor (Hanahan y Weinberg, 2000).

Como se ha indicado anteriormente, dentro de los factores genéticos implicados en el desarrollo del cáncer, existen dos tipos de genes: los oncogenes y los genes supresores de tumores, cuya activación o inactivación está directamente relacionada con la transformación celular. La gran mayoría de estos genes forma parte de rutas de señalización encargadas de controlar el ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación celular, la integridad del genoma y reacciones morfogénicas (Kopnin, 2000).

Los oncogenes se activan por mutación y suelen sobreexpresarse en las células tumorales. Una de las causas de dicha sobreexpresión es la presencia de mutaciones en regiones reguladoras o en genes codificantes de factores en *trans* que regulan la expresión oncogénica. Sin embargo, la principal alteración genética responsable de la sobreexpresión de un oncogen es la amplificación génica (revisado por Kovvali *et al.*, 2003). Hasta la fecha se conocen unos cien oncogenes, como por ejemplo: *RAS*, *RET* y *C-MYC*.

Por otro lado, los genes supresores de tumores, de los que actualmente se conocen unos veinte (ej. *p53*, *RB*, *BRCA1*), se inactivan en las células tumorales debido a la mutación de ambos alelos, lo que provoca una disminución de su expresión, dando lugar a un producto inactivo. La probabilidad de que los dos alelos del gen muten es baja. Sin embargo, desde el descubrimiento de los genes supresores de tumores en 1970 (Knudson, 1971), numerosos estudios han demostrado el papel fundamental que juega la pérdida de heterocigosidad (LOH) en la inactivación de estos genes, de tal forma que el alelo mutado se hereda y el otro se pierde, por delección, a lo largo del proceso tumoral. De hecho, la LOH es frecuente en los tumores y se produce en numerosas regiones cromosómicas, lo que sugiere que el número de genes implicados en el desarrollo tumoral podría ser muy elevado (revisado por Kovvali *et al.*, 2003).

Las mutaciones en estos genes pueden ser esporádicas o hereditarias. En general, las mutaciones en oncogenes son dominantes y tienen lugar en las células somáticas, mientras que las mutaciones en los genes supresores de

tumores se observan en la línea germinal y son recesivas. Excepcionalmente, se han encontrado mutaciones germinales en los oncogenes dominantes *RET*, *MET* y *CDK4*, implicados respectivamente en la neoplasia múltiple endocrina II (MEN II), el cáncer renal papilar y el melanoma (Bignon, 2004).

A pesar de las mutaciones en los genes que controlan el ciclo celular observadas en las células tumorales, estas células presentan también otras muchas alteraciones genéticas que sólo podrían explicarse por la adquisición de una **inestabilidad genómica**, que da lugar a un incremento de la tasa de mutación (Loeb, 1991). En un primer momento, esta inestabilidad se relacionó con mutaciones en genes responsables de la reparación y la fidelidad de la replicación del DNA pero, actualmente, se sabe que hay más genes implicados, en concreto, todos aquellos que mantienen la estabilidad del genoma (ej. genes implicados en la segregación cromosómica, apoptosis, etc). Por tanto, la alteración de los genes responsables de la estabilidad genómica causaría, a su vez, mutaciones en los genes responsables del control del ciclo celular, así como otras mutaciones que podrían conferir una ventaja selectiva a ciertas células, permitiendo su expansión. Así, las células que presentan inestabilidad genómica manifiestan un **fenotipo mutador**, descrito por primera vez por Loeb en 1991, que da lugar a distintos tipos de alteraciones como mutaciones puntuales, inestabilidad de microsatélites o pérdida de heterocigosidad (revisado por Loeb *et al.*, 2003).

Como mencionamos anteriormente, además de los factores genéticos, los factores ambientales también tienen un papel importante en la carcinogénesis. Aunque en la mayoría de los casos es difícil establecer una relación directa entre los factores ambientales y el cáncer, actualmente, no existe ninguna duda del efecto cancerígeno de muchos compuestos químicos, factores físicos y agentes biológicos (Tomatis *et al.*, 1989). Así, se considera que los agentes químicos (compuestos de arsénico, benceno y nitrosaminas, entre otros) son responsables de un 80%-90% de los casos de cáncer. Uno de los primeros ejemplos de carcinogénesis ambiental fue descrito en 1775, cuando se observó la inducción de tumores en trabajadores expuestos al

hollín, poniendo de manifiesto el papel de este agente como carcinógeno. Del mismo modo, se observó una elevada incidencia de cáncer de vejiga en trabajadores de industrias químicas y de caucho. De este modo, evidencias adicionales de este tipo permitieron establecer el origen ambiental del cáncer que, en muchos casos, está ligado a la exposición a agentes químicos (revisado por Bertram, 2001).

En cuanto a los agentes físicos, tanto la radiación ionizante como la ultravioleta son cancerígenas y se consideran responsables de un 5% de los casos de cáncer. Esto es debido a su capacidad mutagénica, ya que alteran el DNA tanto de manera directa (provocando roturas de cadena sencilla y de doble cadena y enlaces cruzados) como indirecta (mediante la liberación de radicales libres y otros mecanismos como la inestabilidad genómica) (Hall y Angele, 1999). El papel de la radiación ionizante lo estudiaremos con detenimiento más adelante (ver apartado 4).

Ciertos agentes biológicos también tienen un efecto en el desarrollo del cáncer. Por un lado, se considera que los virus son responsables de un 5%-10% de los casos de cáncer, lo que es debido a la presencia de proto-oncogenes en su genoma, que se expresan en la célula huésped provocando el desarrollo tumoral. Algunos de los virus directamente relacionados con ciertos tipos de cáncer son los papilomas (HPV-16 y 18), causantes del carcinoma de cuello de útero y que actúan inactivando las proteínas codificadas por los genes *p53* y *RB* (revisado en Nair y Pillai, 2005). Existen también otros casos, como el virus de Epstein-Barr, el de la hepatitis B y algunos retrovirus (ej. VIH), que se han relacionado, respectivamente, con linfoma de Burkitt y carcinomas nasofaríngeos (Epstein *et al.*, 1964; revisado por Young y Rickinson, 2004), carcinoma hepatocelular (Szmuness, 1978; revisado por Bonilla-Guerrero y Roberts, 2005) y sarcoma de Kaposi (Chang *et al.*, 1994). En estos casos se cree que el mecanismo de acción es epigenético o mediante la alteración del sistema inmunológico. Por otro lado, recientemente se ha propuesto que la bacteria *Helicobacter pylori*, causante de la úlcera de

estómago, podría provocar ciertos tipos de cáncer de estómago (Nomura *et al.*, 1991; revisado por Matysiak-Budnik y Mégraud, 2006).

Por último, hay que tener en cuenta que numerosos casos de cáncer ocurren en individuos que no han estado expuestos a carcinógenos y en los que no se han llegado a identificar las causas genéticas. Estos datos sugieren la producción de daño en el DNA de manera esporádica y con consecuencias potencialmente carcinogénicas (Bertram, 2001).

## 1.2 FACTORES DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER

En el apartado anterior se ha puesto de manifiesto que el cáncer tiene su origen tanto en causas genéticas como ambientales. Adicionalmente, cada vez va adquiriendo más importancia el posible papel de los denominados factores de susceptibilidad al cáncer. Estos factores tendrían un efecto sutil en el proceso de la carcinogénesis, pero la combinación del pequeño efecto de varios de estos factores podría ser relevante para el desarrollo tumoral (Pharoah *et al.*, 2004).

En este apartado comentaremos el papel de los factores ambientales y genéticos en la susceptibilidad o riesgo al cáncer. No hay que olvidar que el principal factor de riesgo es la edad (salvo en algunas excepciones, como el cáncer testicular), que actúa de forma exponencial. Así, se ha estimado que un individuo de 70 años tiene mil veces más probabilidades de tener cáncer de colon que un niño de diez años (revisado por Creus, 2002). Por otro lado, los distintos factores de susceptibilidad pueden ser aditivos o sinérgicos. Recientemente se han postulado cuatro modelos básicos para definir la interacción entre factores genéticos y ambientales (revisado por Giarelli y Jacobs, 2005):

- ✓ **Modelo 1:** ninguno de los factores por separado aumenta el riesgo, es necesaria la combinación de ambos.

- ✓ **Modelo 2:** el genotipo incrementa el efecto de un factor de riesgo ya presente.
- ✓ **Modelo 3:** un factor ambiental incrementa el efecto de un factor genético.
- ✓ **Modelo 4:** ambos factores influyen en el riesgo por separado, pero la influencia es mayor si se combinan.

Por tanto, la combinación de los distintos factores de riesgo, ambientales y genéticos, junto con la edad, contribuyen al factor de riesgo individual.

### 1.2.1 Factores de susceptibilidad ambientales

En las poblaciones occidentales, aproximadamente el 70% de los casos de cáncer son debidos a la dieta y al estilo de vida, y es el tabaco el que contribuye en mayor medida, representando un 30% del total (Doll y Peto, 1981). En concreto, el tabaco está asociado al 90% de los casos de cáncer de pulmón y también aumenta en gran medida el riesgo de desarrollar cáncer de laringe, faringe, cavidad oral, esófago, páncreas, riñón y vejiga. Incluso se ha asociado con cáncer de estómago, de cuello uterino y leucemia (Wogan *et al.*, 2004). Este riesgo aumenta si al consumo de tabaco se añade el del alcohol, que por sí solo está asociado con el cáncer de boca, laringe, faringe, esófago e hígado (Boffetta y Hashibe, 2006).

Gran parte de la predisposición al cáncer parece estar asociada con la nutrición. En 1937, Frederic L. Hoffman observó que una ingesta excesiva era un factor etiológico del cáncer, al igual que los alimentos muy grasos y azucarados, el pan blanco y la carne. Más adelante, en 1975, Armstrong y Doll llevaron a cabo un estudio a nivel mundial sobre la incidencia de cáncer y la tasa de mortalidad en función de la dieta, sugiriendo la influencia del consumo de grasa, carne y proteínas animales en la incidencia y mortalidad de algunos tipos de cáncer (revisado por Kovvali *et al.*, 2003). Actualmente, se sabe que el consumo de carne y grasas es, efectivamente, un factor de riesgo. Por el

contrario, el consumo de fibra, frutas y verduras es un factor de protección. Se especula también sobre el posible efecto cancerígeno de sustancias aditivas, edulcorantes y conservantes, aunque no existen datos concluyentes (revisado por Creus, 2002).

Según un estudio realizado en la Universidad de Harvard en 1996, el 50% de los casos de cáncer se podría evitar (revisado por Giarelli y Jacobs, 2005), lo que sin duda se lograría con un estilo de vida saludable y evitando la exposición a ciertos compuestos químicos genotóxicos y a radiaciones ionizantes y ultravioleta.

### *1.2.2 Factores de susceptibilidad genéticos y epigenéticos*

En la práctica totalidad de los distintos tipos de cáncer se ha observado una predisposición genética. De hecho, hay una serie de indicios que muestran la importancia de los factores genéticos en la predisposición al cáncer. En primer lugar, se observó que en algunas enfermedades genéticas raras los portadores de la/s mutación/es presentaban un espectacular aumento de la predisposición al cáncer, en concreto, a tipos de cáncer no muy frecuentes en la población general. Un ejemplo lo constituyen los individuos que padecen ataxia telangiectasia, que presentan un 60% de probabilidad de desarrollar un linfoma y un 27% de desarrollar leucemia. Por otro lado, existen familias en las que el número de casos de cáncer es superior a lo esperado en una población normal, incluso la aparición del tumor suele ser a edades más tempranas que las observadas en la población general. Por último, se ha observado también que los parientes de personas con cáncer presentan un mayor riesgo a padecer el mismo tipo de cáncer o incluso otros tipos. Todos estos datos, por tanto, confirman la existencia de una predisposición genética al cáncer. Sin embargo, es muy difícil definir la contribución exacta de la susceptibilidad genética en el desarrollo tumoral. Las estimaciones actuales se basan en el papel que juegan los relativamente escasos **genes de alta penetrancia**, e indican que la relación directa de estos genes con la carcinogénesis se encuentra solamente en un 5%-10% de los casos de cáncer

(Houlston y Peto, 2004). En un principio, los genes de alta penetrancia se identificaron en enfermedades autosómicas dominantes, mediante análisis de ligamiento y clonación posicional en familias (revisado por Suh y Vijg, 2005). Estos genes presentaban mutaciones alélicas que, al ser heredadas, aumentaban de manera drástica la susceptibilidad al cáncer, y su hallazgo ha sido fundamental para establecer numerosos aspectos de la biología del cáncer (Balmain *et al.*, 2003). Como ejemplos tenemos los genes *BRCA1* y *BRCA2* (cáncer de mama y ovario), *p53* (síndrome de Li-Fraumeni), *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2* (cáncer de colon hereditario no polipósico o HNPCC), etc.

Como mencionamos antes, los genes de alta penetrancia son escasos entre los individuos que padecen cáncer. Por tanto, en los últimos años se está poniendo gran énfasis en la identificación de **genes de baja penetrancia** implicados en la carcinogénesis. En concreto, distintos polimorfismos o variantes de estos genes modificarían, de manera individual o en combinaciones específicas (haplotipos), la susceptibilidad al cáncer, afectando a su severidad y a la respuesta al tratamiento (Suh y Cantor, 2005). De hecho, se considera que para el desarrollo tumoral sería necesario un elevado número de genes o variantes de baja penetrancia, quizá cientos o miles de ellos (Pharoah *et al.*, 2004), cada uno con un pequeño efecto. Hasta la fecha, solamente se han identificado algunos de estos polimorfismos de baja penetrancia, especialmente en genes de reparación y metabolismo (ver tabla 1).

<b>Locus</b>	<b>Cáncer</b>	<b>Mecanismo</b>
<b>Polimorfismos metabólicos</b>		
<i>CYP1A1</i>	Pulmón, mama, útero, colorrectal	Alteración del metabolismo
<i>CYP1A2</i>	Vejiga, colorrectal	Alteración del metabolismo
<i>CYP1D6</i>	Pulmón, hígado	Alteración del metabolismo
<i>GSTM1</i>	Pulmón, vejiga, mama, útero, colon, gástrico, cabeza y cuello	Alteración del metabolismo
<i>GSTT1</i>	Colorrectal, laringe, cerebral	Alteración del metabolismo
<i>NAT2</i>	Vejiga, colon, hígado	Alteración del metabolismo
<b>Genes supresores de tumores</b>		
<i>APC-I1307K</i>	Colorectal	Hipermutabilidad
<b>Genes de reparación</b>		
<i>ATM</i>	Mama	Inestabilidad genómica
<b>Polimorfismos de oncogenes</b>		
<i>H-RAS-VNTR</i>	Colorrectal, mama, pulmón, vejiga, leucemia	Alteración de la transcripción

**Tabla 1.** Genes y polimorfismos de susceptibilidad con baja penetrancia identificados en determinados tipos de cáncer, así como sus supuestos mecanismos de acción. (Adaptación de Houlston y Tomlinson, 2000).

Otros factores implicados en la susceptibilidad al cáncer son los cambios epigenéticos: metilación, modificación de histonas, impronta genética (*imprinting*), etc. De hecho, los cambios en el patrón de metilación pueden ser tan importantes como las mutaciones génicas o el cambio del número de copias de un gen (Jones y Baylyn, 2002; Balmain *et al.*, 2003). Los patrones de metilación varían en respuesta a cambios en la dieta, a polimorfismos genéticos y a exposición a agentes químicos y, junto con la modificación de histonas, pueden tener consecuencias severas en la salud, como defectos congénitos, enfermedades infantiles y neurodegenerativas, aterosclerosis y cáncer (revisado por Rodenhiser y Mann, 2006). En concreto, los cambios en el patrón de metilación alteran la expresión de genes asociados al cáncer (ver tabla 2).

Alteración epigenética	Efecto
Hipermetilación del DNA	Condensación de la cromatina, silenciamiento de genes supresores de tumores y otros genes.
Hipometilación del DNA	Activación de oncogenes, inestabilidad cromosómica y activación de transposones.
Mutación de citosinas metiladas	Alteración en la expresión génica

**Tabla 2.** Alteraciones genéticas provocadas por cambios epigenéticos (adaptada de Rodenhiser y Mann, 2006).

La hipometilación del DNA provoca la activación de oncogenes e inicia un proceso de inestabilidad genómica, mientras que la hipermetilación inicia el silenciamiento de genes supresores de tumores [ej: la hipermetilación de *BRCA1* está asociada con el 10%-20% de los casos de cáncer de mama esporádicos y de cáncer de ovario (Baylin y Herman, 2000; Esteller *et al.*, 2001; Douglas *et al.*, 2004)]. Algunas asociaciones demostradas entre alteraciones epigenéticas y cáncer son (revisado por Rodenhiser y Mann, 2006):

- ✓ Hipermetilación: cáncer de vejiga, mama, colon, próstata, etc.
- ✓ Hipometilación: cáncer de estómago, colorrectal, páncreas, etc.

### 1.3 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER

En contraposición a los estudios de ligamiento en familias para la detección de genes de alta penetrancia, en el caso de genes de baja penetrancia se realizan estudios de asociación, que comparan las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos entre pacientes con cáncer y personas sanas. El objetivo de estos estudios es detectar polimorfismos que puedan estar asociados a la susceptibilidad a padecer algún tipo de cáncer o que estén en desequilibrio de ligamiento con otras variantes o genes causantes de la enfermedad (Dunning *et al.*, 1999; Houlston y Tomlinson, 2000). Los estudios

de asociación tienen más potencia para detectar efectos pequeños que los de ligamiento, pero se requiere un número mayor de marcadores y de muestras (Cordell y Clayton, 2005). La mayoría de los estudios se basa en el análisis de genes candidatos, que codifican proteínas implicadas en la carcinogénesis. Hasta hace relativamente poco, el análisis de polimorfismos se centraba en los genes implicados en el metabolismo, como los genes codificantes de enzimas de fase 1 y 2, genes del metabolismo de esteroides y genes de reparación (revisado por Loktionov, 2004). Sin embargo, cada vez existen más datos que indican la importancia de los polimorfismos en todo tipo de genes (Imyanitov *et al.*, 2004).

Los polimorfismos más sencillos y frecuentes son los de un sólo nucleótido (SNP), con dos variantes alélicas, que se encuentran repartidos a lo largo del genoma en gran densidad, aproximadamente cada 200-300 pares de bases (pb) (Lee *et al.*, 2005). También se pueden encontrar polimorfismos multialélicos como los micro- y minisatélites (STR y VNTR, respectivamente), secuencias cortas y repetitivas muy variables que son más complejas, ya que dan lugar a un mayor número de genotipos (Dunning *et al.*, 1999). Todos estos polimorfismos se encuentran en regiones tanto codificantes como no codificantes y pueden tener un efecto perjudicial, inocuo o latente. Como son muy fáciles de analizar y se transmiten de generación en generación, son muy útiles como marcadores genéticos. Así, si un polimorfismo se encuentra en desequilibrio de ligamiento con un gen, se transmitirá junto a él, de forma que una de las variantes del polimorfismo irá siempre asociada con uno de los alelos del gen y, si detectamos dicha variante en un individuo, podemos asumir que también se encontrará el correspondiente alelo del gen.

A la hora de seleccionar polimorfismos, en general, se sugiere emplear aquellos cuya frecuencia alélica supere el 1% (aunque también se ha sugerido el 5%) y que se encuentren en zonas codificantes conservadas, en concreto, en exones. Actualmente existen bases de datos de SNPs públicas, donde están descritos más de 9 millones de SNPs, de los cuales aproximadamente 200.000 están en zonas codificantes y tienen una frecuencia alélica superior a un 1%.

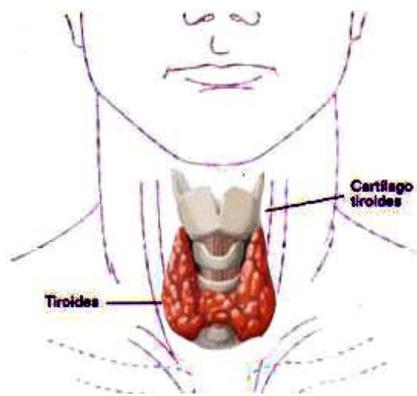
De los SNPs en regiones codificantes, un 40% provoca un cambio de aminoácido (revisado por Suh y Vijg, 2005). Uno de los inconvenientes de seleccionar sólo polimorfismos codificantes es que se pueden pasar por alto marcadores en regiones reguladoras que afecten a la expresión génica y al procesamiento del RNA y que podrían tener un papel importante en la carcinogénesis. Por ejemplo, se ha identificado un polimorfismo en el segundo intrón del gen *L-MYC*, que parece influir en el pronóstico de cáncer esporádico (revisado por Spinola *et al.*, 2004). Aún así, todavía no se puede valorar si los polimorfismos en zonas no codificantes podrían tener alguna importancia en la susceptibilidad al cáncer (revisado por Pharoah *et al.*, 2004).

La mayoría de las técnicas utilizadas para el análisis de polimorfismos son variaciones de metodologías estándar basadas en técnicas de hibridación y en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Hasta la fecha, las técnicas mejor establecidas y más empleadas para el análisis de polimorfismos son las que utilizan geles de electroforesis para la detección, que permiten detectar tanto polimorfismos multialélicos (micro- y minisatélites) como polimorfismos reconocidos por enzimas de restricción, comúnmente denominados **polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción** (RFLPs) (revisado por Pharoah *et al.*, 2004). Este tipo de análisis se basa en el reconocimiento de los distintos patrones de bandas de electroforesis, que varían en función del genotipo del individuo. En el caso de los minisatélites, que pueden llegar a tener un tamaño muy grande, para detectar los fragmentos de interés se utiliza la hibridación del DNA genómico con sondas marcadas (*Southern blot*). Los microsatélites, de menor tamaño, se analizan habitualmente mediante una PCR en la que los cebadores están marcados con radiactividad o con fluorescencia, y a la que sigue la visualización en geles de poliacrilamida o en secuenciadores automáticos. Por otro lado, la técnica más empleada para el análisis de SNPs se denomina PCR-RFLP y consiste en la realización de una PCR, la posterior digestión del producto con enzimas de restricción específicas y la visualización mediante geles de agarosa. Aunque estas técnicas son muy utilizadas, existe una gran demanda de técnicas más rápidas y eficientes que permitan el análisis de cientos o incluso miles de

muestras en un solo día. Algunas de estas técnicas más novedosas son la PCR a tiempo real, la PCR alelo-específica, la espectrometría de masas y los *microarrays* (revisado por Imyanitov *et al.*, 2004).

## 2. Funcionamiento del tiroides y patologías

El tiroides es una glándula endocrina bilobulada situada en la parte anterior del cuello (figura 1). Es una de las mayores glándulas endocrinas, con un peso de 15 a 20 gramos en individuos normales y con una gran capacidad de crecimiento.



**Figura 1.** Ubicación anatómica de la glándula tiroides. Adaptado de [www.endocrino-diabetes.com.ar/tiroides.htm](http://www.endocrino-diabetes.com.ar/tiroides.htm)

El tejido tiroideo normal está constituido por las **células foliculares o tirocitos**, encargadas de captar yodo de la circulación sanguínea para sintetizar las hormonas tiroideas T3 y T4. Estas células representan dos terceras partes del tejido tiroideo. Intercaladas entre ellas se encuentran las **células parafoliculares** (también conocidas como células claras o células C), que secretan la hormona calcitonina, encargada de controlar el nivel de calcio en sangre.

La síntesis de las hormonas tiroideas, tetrayodotironina o tiroxina (T4) y triyodotironina (T3), requiere la captación de yodo y su posterior unión al aminoácido tirosina, proporcionado por la proteína tiroglobulina (TG). La mayor parte (99%) de las hormonas tiroideas circulan en sangre en estado inactivo unidas a proteínas transportadoras (PBI, albúmina y TBG). Sólo una pequeña proporción se encuentra en forma libre activa. Además, la cantidad de T3 secretada, que es la hormona realmente activa, es muy baja en relación con la de T4. Del total de hormona T3 circulante, solamente un 20% se

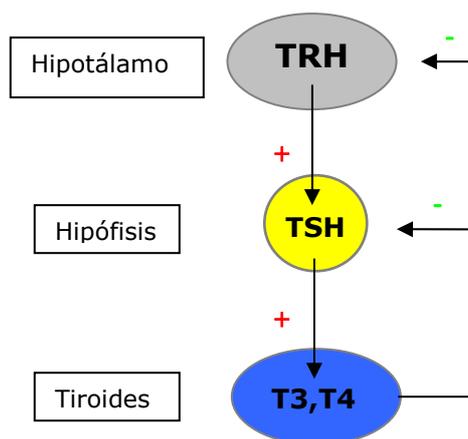
## Introducción

---

secreta en el tiroides, el 80% restante proviene de la liberación de un átomo de yodo de la molécula de T4.

Las hormonas tiroideas actúan mediante su unión a un receptor nuclear, el receptor de la hormona tiroidea (TR). El TR es un factor de transcripción cuya actividad depende de su unión al ligando (hormona tiroidea), y muestra mayor afinidad por T3 que por T4, de ahí que se considere a la hormona T3 la realmente activa. De este modo, las hormonas tiroideas estimulan procesos vitales en todo el organismo, interviniendo en la maduración y desarrollo de los tejidos, en la producción de energía y calor, en el metabolismo de nutrientes y en las funciones mentales, cardíacas, respiratorias, sexuales y reproductoras.

A su vez, la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas está controlada por la hormona estimulante del tiroides o tirotropina (TSH), que se sintetiza en la hipófisis. El control consiste en un mecanismo de retroalimentación negativa (figura 2), que se lleva a cabo a partir del hipotálamo, mediante la hormona liberadora de tirotropina o TRH, que estimula la síntesis y secreción de TSH.



**Figura 2.** Control de la función tiroidea por retroalimentación negativa. Adaptado de <http://arbl.cvmbbs.colostate.edu/>

Existe también un mecanismo intrínseco de regulación de la función tiroidea independiente de la hormona TSH, la **autorregulación tiroidea**. Este mecanismo permite regular la captación de yodo y, por tanto, la cantidad de

hormona tiroidea que se sintetiza. En ausencia de yodo, se secreta preferentemente T3. Además, ante un exceso de yodo, el tiroides reduce el transporte activo de este (efecto Wolff-Chaikoff), disminuyendo así la concentración intratiroidea por debajo de niveles inhibitorios, lo que permite mantener el equilibrio (Eng *et al.*, 1999).

Las principales patologías asociadas al tiroides son: hipotiroidismo, hipertiroidismo y cáncer de tiroides.

El **hipotiroidismo** se debe a la subproducción de hormonas tiroideas. Es la enfermedad endocrina congénita más común y afecta a uno de cada 1200 recién nacidos (Moreno *et al.*, 2003). Asimismo, también afecta a un 2% de las mujeres y al 0,1-0,2% de los hombres. Se puede presentar a cualquier edad, pero es más frecuente en mujeres mayores de 40 años. En el 95 % de los casos se debe a una lesión de la glándula (hipotiroidismo primario). Otra de las causas principales es la tiroiditis crónica autoinmune o **enfermedad de Hashimoto**, en la que el sistema inmunológico desarrolla anticuerpos contra la glándula, lo que altera su estructura y función. El hipotiroidismo también puede ser un efecto secundario de la extirpación quirúrgica del tiroides, del tratamiento con  $^{131}\text{I}$ , de la irradiación del cuello y de la deficiencia de yodo en la dieta, causante del aumento de tamaño del tiroides o bocio. Las manifestaciones son variables en función de la edad de aparición, la duración y la severidad. Los síntomas más frecuentes son: cansancio, intolerancia al frío, debilidad, pérdida de cabello, aumento de peso y problemas de fertilidad. La forma más severa del hipotiroidismo es el cretinismo, una deficiencia congénita de la glándula tiroides que conlleva la carencia de hormonas tiroideas y, si no es detectada y tratada a tiempo, provoca de manera irreversible retraso mental, falta de crecimiento y sordera. Para el tratamiento del hipotiroidismo se administra oralmente hormona tiroidea sintética.

El **hipertiroidismo** o **tirotoxicosis** es el resultado de una hipersecreción de hormonas tiroideas. Afecta, aproximadamente, al 2% de las mujeres y al 0,2% de los hombres (Gittoes y Franklyn, 1998). La causa más

frecuente es la **enfermedad de Graves**, un desorden autoinmune que se caracteriza por la formación de anticuerpos que se unen y activan al receptor de la TSH, provocando una estimulación continua de la síntesis de hormonas tiroideas. En algunos casos, el hipertiroidismo es producido por uno o varios nódulos autónomos (enfermedad de Plummer), es decir, no regulados por la hormona TSH, y con hiperfuncionamiento (Gittoes y Franklyn, 1998). Las manifestaciones clínicas del hipertiroidismo se traducen en una aceleración del metabolismo con síntomas como: exceso de calor, sudoración, taquicardia, nerviosismo, temblor, pérdida de peso, cansancio, etc. Una vez diagnosticado, existen diversos tratamientos disponibles, entre ellos: fármacos antitiroideos, cirugía y terapia con  $^{131}\text{I}$ .

El **cáncer de tiroides** es el carcinoma endocrino más común (98%), aunque sólo representa un 1% del total de tipos de cáncer. Su incidencia parece aumentar un 4% cada año y, en la actualidad, es el octavo cáncer más frecuente en mujeres (Nix *et al.*, 2005). De hecho, es tres veces más frecuente en mujeres que en hombres (Grebe y Hay, 1995), y se da especialmente en edades comprendidas entre los 35 y los 50 años. Se puede originar a partir de las células foliculares o de las células parafoliculares, en función de lo cual se definen los siguientes tipos:

- Con origen en el epitelio folicular: cáncer **papilar**, **folicular** y **anaplásico**.
- Con origen en las células parafoliculares: cáncer **medular**.

Aproximadamente el 90% de los carcinomas de tiroides son de tipo papilar y folicular, también llamados carcinomas diferenciados (Nix *et al.*, 2005), y son los que tienen mejor pronóstico (Mazzaferri y Massoll, 2002). Los carcinomas poco diferenciados o indiferenciados (ej. anaplásico) pueden originarse *de novo*, aunque también pueden provenir de la dediferenciación de otros tumores como el papilar, folicular, los adenomas foliculares o incluso el bocio (Almudévar *et al.*, 2000). Hay que destacar que existe una variación geográfica en cuanto a la proporción relativa de carcinomas papilar y folicular,

probablemente debida al contenido de yodo en la dieta, ya que las zonas con deficiencia de yodo presentan un aumento en la frecuencia de carcinomas foliculares (Roque *et al.*, 1998).

El **cáncer papilar** es el carcinoma de tiroides más frecuente (70-90%), siendo la edad media de aparición de 45 años (McConahey *et al.*, 1986; Mazzaferri y Kloos, 2001). Su pronóstico es bueno, con un índice de supervivencia del 95%. Suele presentar un crecimiento lento y puede extenderse fuera del tiroides, afectando especialmente a los ganglios linfáticos. Existen variedades bien diferenciadas y poco diferenciadas, siendo estas últimas más agresivas (Volante *et al.*, 2004).

El **cáncer folicular** es el segundo carcinoma de tiroides más frecuente (10-15%) (Grebe y Hay, 1995). La edad media de aparición es de 55 años y es más agresivo en individuos mayores. También se dan casos en individuos jóvenes, en los que se comporta como un carcinoma papilar bien diferenciado. Son tumores encapsulados con una gran tendencia a extenderse por medio del torrente sanguíneo y a formar metástasis, con frecuencia en pulmones y huesos (Parthasarathy y Crawford, 2002). En general, se considera que el carcinoma folicular tiene peor pronóstico que el papilar (Hundahl *et al.*, 1998; Lundgren *et al.*, 2006), aunque existen estudios que no han podido demostrar tal diferencia (Tubiana *et al.*, 1985; Lerch *et al.*, 1997; Steinmüller *et al.*, 2000).

El **cáncer anaplásico** es poco frecuente y suele aparecer entre los 50-70 años de edad. Es un carcinoma indiferenciado muy agresivo (Negri *et al.*, 1999a), que se extiende con mucha rapidez invadiendo estructuras cercanas como tráquea, laringe, esófago, músculos, etc. La esperanza de vida tras su diagnóstico es de seis meses (Nix *et al.*, 2006).

El **cáncer medular** se origina a partir de las células parafoliculares o células C y su principal característica es la secreción de calcitonina, que se utiliza como marcador tumoral. Se trata de un cáncer poco frecuente (5-10%),

con manifestación tanto esporádica como familiar. Aproximadamente el 25% de los casos son familiares, con herencia autosómica dominante. También puede formar parte de otro desorden hereditario, la neoplasia múltiple endocrina (MEN) de tipo IIA o IIB (revisado por Nix *et al.*, 2006). La edad media de aparición es de 50 años (Negri *et al.*, 2002), el pronóstico es peor que el de los carcinomas diferenciados y la probabilidad de recuperación de un 40-50%.

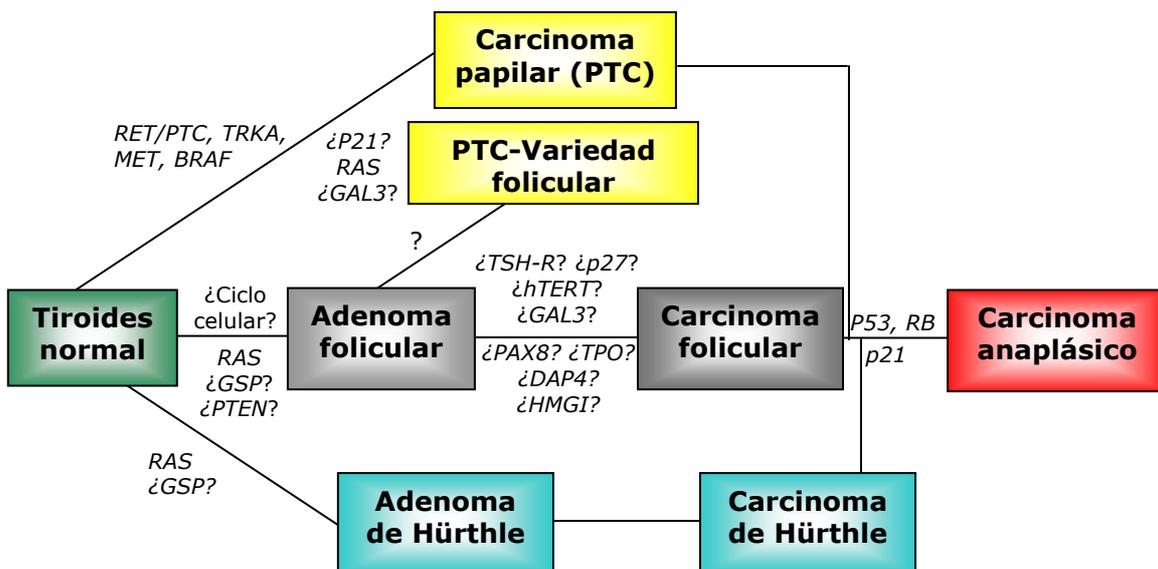
### 2.1 BASE GENÉTICA DEL CÁNCER DE TIROIDES

Se conocen diversos factores implicados en el desarrollo del cáncer de tiroides, como hormonas, proteínas y otras alteraciones genéticas. Las etapas más tempranas del desarrollo de un tumor tiroideo parecen ser debidas a la activación de proto-oncogenes o de receptores de factores de crecimiento, como *RAS*, *RET*, *NTRK*, *MET*, *GSP* y el receptor de la TSH (TSHR) (Moretti *et al.*, 2000). De este modo, la expresión alterada de estos factores se asocia con el desarrollo de distintas neoplasias, desde adenomas (*GSP* y receptor de la TSH) a carcinomas diferenciados tanto papilar (*MET*, *NTRK*, *RET*) como folicular (*RAS*) (Segev *et al.*, 2003). Por otro lado, los carcinomas indiferenciados presentan mutaciones en genes supresores de tumores como el gen *p53*, lo que sugiere la implicación de estos genes en etapas más tardías (Fagin *et al.*, 1993). Hay que señalar también que, en principio, los genes que codifican proteínas tiroideas pueden estar relacionados con las distintas patologías del tiroides, incluyendo la carcinogénesis. En concreto, la tiroglobulina (TG), la tiroperoxidasa (TPO), el receptor de TSH o la proteína GS juegan un importante papel en la funcionalidad del tiroides, y su alteración puede provocar dishormonogénesis y carcinogénesis (Moreno, 2001).

Los carcinomas de tiroides se caracterizan por la presencia de un elevado porcentaje de translocaciones y otras reordenaciones cromosómicas, lo que no suele suceder en otros tumores epiteliales (Santoro *et al.*, 1992; Moretti *et al.*, 2000). Al igual que en otros tipos de cáncer, los factores implicados en el cáncer de tiroides se clasifican en:

1. factores promotores de la proliferación tumoral, como oncogenes y hormonas. Ej.: TSH, RAS, BRAF, RET, c-MYC, etc.
2. factores supresores de la proliferación tumoral, genes reguladores de la diferenciación y del ciclo celular. Ej.: p21, p53, PAX8/TTF-1, etc.
3. factores que influyen en la inmortalización y muerte celular, como las telomerasas y los genes reguladores de la apoptosis. Ej.: PTEN, MDM2, etc.

En la figura 3 se representa la posible implicación de los factores mencionados en el desarrollo de los distintos tipos de neoplasias, así como su papel en las distintas transiciones entre carcinomas diferenciados e indiferenciados (Segev *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Esquema del modelo de desarrollo tumoral del tiroides donde se indican los genes involucrados en cada transformación. (Adaptado de Segev *et al.*, 2003).

El papel de estos factores en la formación de tumores depende del tipo de carcinoma al que nos refiramos, por lo que en los siguientes puntos

explicaremos con detalle la base molecular de las cuatro variedades más frecuentes de cáncer de tiroides: papilar, folicular, anaplásico y medular.

En el **cáncer papilar** se han descrito cuatro tipos principales de alteraciones genéticas: reordenaciones de los genes *RET* y *TRKA* y mutaciones puntuales de los genes *BRAF* y *RAS* (Melillo *et al.*, 2005; Adeniran *et al.*, 2006). En concreto, las alteraciones en los oncogenes *BRAF*, *RET* y *RAS* aparecen en el 70% de los casos, y raramente aparecen a la vez en el mismo tumor (revisado por Fagin, 2006).

El gen *RET* codifica un receptor tirosinquinasa de factores de crecimiento pertenecientes a la familia GDNF (*glial derived neurotrophic factors*). En el cáncer papilar, la activación de este gen se lleva a cabo mediante distintas reordenaciones que implican la recombinación del dominio quinasa con otros genes, generando una familia de oncogenes quiméricos denominados *RET/PTC* (Santoro *et al.*, 2004a). Estos oncogenes actuarían en las fases tempranas del desarrollo tumoral. Se han identificado hasta diez tipos de reordenaciones distintos (revisado por Santoro *et al.*, 2004b) y los más frecuentes son: **RET/PTC1** (inversión paracéntrica del cromosoma 10 que implica la fusión de *RET* con el gen *H4/D10S170*) y **RET/PTC3** (inversión del cromosoma 10 que provoca la fusión de *RET* con el gen *RFG*), que constituyen un 90% del total (Nikiforov, 2002). Estos dos tipos de reordenaciones son comunes en pacientes jóvenes o con historial de irradiación (Santoro *et al.*, 1995; Bounacer *et al.*, 1997; Rabes *et al.*, 2000; Maciel *et al.*, 2005).

Otro oncogen involucrado en el cáncer papilar es el gen *TRKA* (*tropomyosin rearranged kinase A*). Este gen codifica un receptor del factor de crecimiento neuronal (NGF), y se activa por reordenación en el 10% de los carcinomas papilares (Bounacer *et al.*, 1997; Pierotti, 2001; Santoro *et al.*, 2004b). También se han encontrado mutaciones puntuales de *RAS* en un 10% de los casos, especialmente en la variedad folicular (Zhu *et al.*, 2003), y una sobreexpresión de la ciclina D1 (Khoo *et al.*, 2002; Sporny *et al.*, 2005;

Varkondi *et al.*, 2005). Sin embargo, las alteraciones genéticas más comunes en el carcinoma papilar son las mutaciones puntuales del oncogén *BRAF*, que se encuentran hasta en un 50% de los casos (Kimura *et al.*, 2003), especialmente en los pacientes de mayor edad (revisado por Maciel *et al.*, 2005). No se conoce el papel de este gen, pero existe la hipótesis de que los genes *RET*, *BRAF* y *RAS* actuarían conjuntamente en la transformación de las células tiroideas (Ciampi *et al.*, 2005; Melillo *et al.*, 2005), por medio de la cascada de señalización RAS-RAF-MEK-ERK, que regula la proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Xu *et al.*, 2003).

Por otro lado, se han encontrado aberraciones cromosómicas en los cromosomas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19 y 20; siendo más frecuentes en las regiones 1p11-13, 1p32-36, 3p25-26, 7q34-36 y 10q11.2 (Zitzelsberger *et al.*, 1999; Roque *et al.*, 2001; Rodrigues-Serpa *et al.*, 2003; Foukakkis *et al.*, 2005).

En cuanto al **cáncer folicular**, todavía no está bien establecida la base molecular, se piensa que los carcinomas foliculares vienen precedidos por adenomas foliculares, al contrario que los carcinomas papilares que surgirían de *novo* (Rodrigues-Serpa *et al.*, 2003). En un 18%-52% de los casos se han encontrado mutaciones puntuales de *RAS*, normalmente en los codones 12, 13 y 61 de cualquiera de los tres genes: *N-*, *H-* o *K-RAS* (revisado por Nikiforova *et al.*, 2003 y Lacroix *et al.*, 2005). Por otro lado, un 26%-63% de los carcinomas foliculares presentan una translocación que da lugar a la fusión entre el factor *PAX8* (*Paired box gene 8*) y el receptor *PPAR $\gamma$*  (*peroxisome proliferator-activated receptor*), cuyo papel se desconoce (Kroll *et al.*, 2000; Nikiforova *et al.*, 2002). Además, se ha encontrado que las mutaciones en *RAS* y el reordenamiento *PAX8-PPAR $\gamma$*  son excluyentes (Maciel *et al.*, 2005).

Recientemente, se han encontrado otros genes implicados en la patogénesis del cáncer folicular, como *TR $\gamma$* , *PTEN*, *PKAR1A*, *DDIT3*, *ARG2*, *ITM1* y *C1ORF24* (revisado por Maciel *et al.*, 2005). Además, las aberraciones cromosómicas y pérdidas de heterocigosidad son más frecuentes en los

carcinomas foliculares que en los papilares. Concretamente, son frecuentes las aberraciones del cromosoma 3, especialmente en el brazo p (revisado por Rodrigues-Serpa *et al.*, 2003). También se han descrito pérdidas de heterocigosidad en otros muchos cromosomas (2, 3, 4p, 7q, 8, 9, 11p, 15q, 17p y 22q) (Ward *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 2001).

Se considera que el **carcinoma anaplásico** proviene de la desdiferenciación de carcinomas diferenciados (Kitamura *et al.*, 2000). La base molecular de este tipo de cáncer no está del todo establecida, aunque se han encontrado mutaciones en el gen supresor de tumores *p53* (Ito *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1992) y en el oncogen  *$\beta$ -catenina* (García-Rostán *et al.*, 1999). Estas alteraciones no se encuentran en los carcinomas diferenciados y, por tanto, podrían ser las responsables del proceso de desdiferenciación. Recientemente, se han detectado mutaciones en el gen *PIK3CA* (fosfatidilinositol 3'-quinasa). Este gen es activado con frecuencia en los carcinomas de tiroides, bien por medio de una molécula estimulante (ej. RAS) o por la ausencia del inhibidor PTEN lo que, a su vez, provoca la activación de Akt. Estos dos últimos procesos están implicados en la progresión tumoral (García-Rostán *et al.*, 2005).

El **cáncer medular** puede ser tanto esporádico como familiar (~25%). En este último caso se puede transmitir de forma aislada como cáncer medular familiar, o formando parte de los síndromes MEN IIA o IIB. En una gran mayoría de los pacientes de cáncer familiar y del síndrome MEN IIA se han encontrado mutaciones germinales del oncogén *RET* (Marsh y Zori, 2002), que afectan, en un 95% de los casos, a los codones 609, 611, 618, 620 y 634, y provocan la sustitución del aminoácido correspondiente por cisteína, que es la que activa al gen. En los pacientes con el síndrome MEN IIB, la mayor parte de las mutaciones implican una sustitución de treonina por metionina en el codón 918 (revisado por Nix *et al.*, 2006).

En pacientes con cáncer medular esporádico se han detectado mutaciones somáticas de *RET*, normalmente en el codón 918. Estas

mutaciones están relacionadas con un mal pronóstico (Marsh *et al.*, 1997; Frisk *et al.*, 2001). También se han encontrado deleciones en las regiones cromosómicas 1p, 3q, 4, 9q, 13q y 12q, y amplificaciones del cromosoma 19 (Marsh *et al.*, 2003).

### 2.1.1 Factores de susceptibilidad al cáncer de tiroides

Se conocen varios factores de susceptibilidad al cáncer de tiroides, entre los cuales se incluyen la radiación ionizante, factores nutricionales y la predisposición genética. La radiación ionizante es el factor de riesgo más estudiado y mejor establecido. Así, se ha observado un aumento en la incidencia de cáncer de tiroides en personas expuestas a radiación debido tanto a desastres ambientales como el de Chernobyl o la bomba atómica, como a la exposición terapéutica (Rabes *et al.*, 2000; Preston-Martin *et al.*, 2003). El riesgo depende de la dosis recibida y está relacionado con la edad, de forma que las personas irradiadas durante la infancia o adolescencia presentan una mayor incidencia de cáncer (Segev *et al.*, 2003). Una de las causas del mayor riesgo asociado a la radiación en niños podría ser que la actividad proliferativa de las células del tiroides disminuye con la edad, aunque probablemente haya también otros factores relacionados (Saad *et al.*, 2006). Además, la radiación está relacionada con un incremento en el cáncer de tiroides papilar, caracterizado por reordenaciones del oncogen *RET*, aunque se estima que sólo el 10% de los casos de cáncer papilar son debidos a la radiación ionizante (Segev *et al.*, 2003).

Aparte de la radiación ionizante, el hecho de haber padecido otra enfermedad del tiroides, en concreto bocio, nódulos benignos (adenomas) e hipertiroidismo, también se ha asociado con un incremento del riesgo de cáncer de tiroides (revisado por Belfiore *et al.*, 2001). Sin embargo, no se ha observado que el hipotiroidismo sea un factor de riesgo.

Otro factor de riesgo asociado con esta neoplasia es la dieta, en concreto el consumo de yodo. La deficiencia de yodo es la principal causa del

bocio endémico en zonas como los Alpes, los Andes y el Himalaya, donde además se ha observado un incremento en la incidencia de cáncer de tiroides folicular y anaplásico (revisado por Bosetti *et al.*, 2002). Por otro lado, el exceso de yodo se ha relacionado con un aumento en la incidencia de cáncer papilar (revisado por Segev *et al.*, 2003).

En cuanto a otros factores, se ha observado que los fumadores presentan una disminución del 40% del riesgo a padecer cáncer de tiroides, independientemente del sexo, la edad y la zona geográfica (Negri *et al.*, 2002). Existen distintas explicaciones a esta asociación. En primer lugar, un aumento de los niveles de la hormona TSH podría incrementar el riesgo a padecer cáncer de tiroides, sin embargo, los individuos fumadores presentan menores niveles de TSH que los exfumadores y no fumadores. En contraposición, el tabaco se relaciona con un mayor riesgo de bocio que, a su vez, es un factor de riesgo del cáncer de tiroides. Según estos datos, aunque el tabaco provoca un aumento de tamaño del tiroides, la disminución del riesgo de cáncer no estaría asociada con alteraciones del tamaño de la glándula. Otra explicación plausible radica en el potencial efecto anti-estrogénico del tabaco, lo que justificaría también la disminución del riesgo a padecer cáncer de endometrio en las mujeres fumadoras (revisado por Mack *et al.*, 2003). De hecho, el papel de los estrógenos en la etiología del cáncer de tiroides se está estudiando con interés, ya que la incidencia de esta neoplasia es de dos a tres veces mayor en mujeres y aumenta durante la edad reproductiva (La Vecchia *et al.*, 1999). Así, se han observado receptores de estrógenos en tumores diferenciados de tiroides y se sabe que los estrógenos pueden inducir tumores en modelos animales (revisado por Negri *et al.*, 1999b).

De igual modo, también se ha observado una asociación inversa entre el consumo de alcohol y la susceptibilidad al cáncer de tiroides, aunque existen estudios que no han podido detectar tal asociación (revisado por Mack *et al.*, 2003 y Navarro *et al.*, 2005).

Existen algunas indicaciones de que otros factores hormonales también podrían incrementar la susceptibilidad al cáncer de tiroides, como el uso de anticonceptivos, la pubertad y el embarazo, relacionados con un aumento de los niveles de TSH y de las hormonas tiroideas. Se ha detectado un riesgo moderado en las mujeres que toman anticonceptivos orales, que disminuye de inmediato en cuanto dejan de tomarlos (La Vecchia *et al.*, 1999). En cuanto al embarazo, los datos son contradictorios (Negri *et al.*, 1999b; Navarro *et al.*, 2005), y tampoco se aprecia asociación con los abortos ni con la infertilidad. Sin embargo, sí hay un incremento del riesgo cuando el primer embarazo termina en aborto (revisado por Preston-Martin *et al.*, 2003).

Con respecto a los factores genéticos de susceptibilidad al cáncer de tiroides, aunque en la actualidad se está estudiando con detenimiento el papel de los polimorfismos en genes de baja penetrancia, la información es muy escasa. La mayor parte de los estudios se refieren al papel de polimorfismos en el oncogen *RET* y los resultados son variables, algunos estudios encuentran una asociación entre distintos haplotipos de este gen y susceptibilidad al cáncer de tiroides medular y, en algunos casos, papilar (Lesueur *et al.*, 2002; Cebrián *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2005); pero otros no (Wiench *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2005; Wohllk *et al.*, 2005).

Por otro lado, existen otros estudios que han encontrado una asociación entre la susceptibilidad al cáncer de tiroides y polimorfismos en los genes de reparación *XRCC1* y *XRCC3* (Zhu *et al.*, 2004; Sturgis *et al.*, 2005); así como polimorfismos en los genes del metabolismo *GSTM1* y *GSTT1* (Morari *et al.*, 2002) y en los genes *ERCC2* (helicasa ATP-dependiente) y *PTPRJ* (tirosín-fosfatasa) (Iuliano *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005).

En este trabajo, nos propusimos determinar la posible asociación entre la susceptibilidad al cáncer de tiroides y dos regiones genómicas diferentes: (1) el gen codificante del receptor  $\alpha 1$  de la hormona tiroidea (*NR1A1a*, también conocido como *c-erbA*, 17q11.2) y (2) la región p12-13 del cromosoma 1.

El gen *NR1A1a* está situado en el cromosoma 17 (17q11.2) y codifica el receptor  $\alpha 1$  de la hormona tiroidea. Este gen tiene distintas variantes e isoformas truncadas y su expresión se ha relacionado con varios tipos de cáncer (González-Sancho *et al.*, 2003). Además, se ha sugerido una relación entre la pérdida de expresión de este gen, observada en los carcinomas anaplásicos, y la dediferenciación celular (Wallin *et al.*, 1992; Onda *et al.*, 2002). Asimismo, se ha observado una correlación entre la expresión de este gen y la agresividad de los carcinomas de tiroides, de forma que el aumento de la expresión del receptor se relaciona con carcinomas menos agresivos (Onda *et al.*, 2002). Puesto que el nivel de expresión del gen *NR1A1a* y, por tanto, la agresividad de los carcinomas de tiroides, se han relacionado también con la longitud del microsatélite THRA1 (CA)<sub>n</sub> (Onda *et al.*, 2002), ubicado en una región no codificante del exón 9 de dicho gen (Laudet *et al.*, 1991), nuestro estudio se ha basado en el análisis de este marcador.

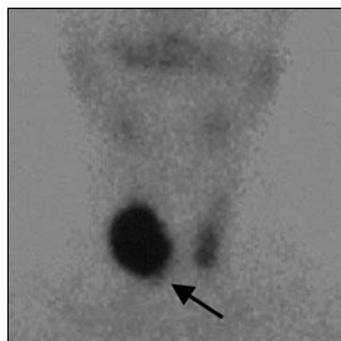
Por otro lado, entre las numerosas regiones cromosómicas relacionadas con el cáncer de tiroides, se incluyen los dos brazos del cromosoma 1 (Tung *et al.*, 1997; Kitamura *et al.*, 2000; Kleer *et al.*, 2000; Kjellman *et al.*, 2001; Roque *et al.*, 2001; Stoler *et al.*, 2002; Wreesmann *et al.*, 2002). Este cromosoma está implicado en varios tipos de cáncer (Zhang *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2000) y, en concreto, la región 1p12-13 suele presentar distintos tipos de aberraciones cromosómicas (Rudolph *et al.*, 1988; Vernole *et al.*, 1989; Bieche *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta estos datos, decidimos estudiar la implicación de esta región en la susceptibilidad al cáncer de tiroides, analizando una serie de polimorfismos de la región 1p12-13. En primer lugar, analizamos el microsatélite BAT-40 (A)<sub>n</sub>, situado en el segundo intrón del gen 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (*HSD3 $\beta$ 1*, 1p13.1) (Lachance *et al.*, 1990; McBride *et al.*, 1999), que se ha relacionado con el cáncer de próstata (Chang *et al.*, 2002). El microsatélite BAT-40 es un marcador muy polimórfico, ampliamente utilizado en estudios poblacionales (Zhou *et al.*, 1997; Samowitz *et al.*, 1999; Yokozaki, 2000; Bacon *et al.*, 2001; Mukherjee *et al.*, 2002), por lo tanto, en este estudio nos sirve,

además, como posible marcador de otros factores genéticos de riesgo implicados en el cáncer de tiroides.

Por último, no hay que olvidar que ninguno de los factores de susceptibilidad debe considerarse por separado, ya que en la mayoría de los casos existe una interacción entre los factores de susceptibilidad ambientales y los genéticos (Stankov *et al.*, 2006).

### **3. Diagnóstico y tratamiento del cáncer de tiroides**

En los últimos 40 años las técnicas de diagnóstico de las alteraciones tiroideas han mejorado de forma extraordinaria, tanto en sensibilidad como en especificidad. El primer síntoma de cáncer de tiroides es la aparición de un nódulo palpable, que se presenta con más frecuencia en mujeres y personas mayores. En la mayoría de los casos los nódulos son benignos, con una incidencia de malignidad del 3,4%-29% (Walsh *et al.*, 1999). El riesgo de malignidad aumenta si el individuo ha sido irradiado en la zona cabeza-cuello durante la infancia (lo que supone un riesgo de malignidad del 35%-40%), o tiene una historia familiar de cáncer medular, enfermedad de Cowden o síndrome de Gardner (Nix *et al.*, 2005). Mediante una ecografía tiroidea o ultrasonidos, se determina si el nódulo es único (por lo general benigno) o múltiple (bocio multinodular). Seguidamente, se analiza la actividad funcional del nódulo mediante una gammagrafía (figura 4). Mediante esta técnica se administra un trazador cuya captación depende de la actividad del nódulo.



**Figura 4.** Gammagrafía de tiroides. La flecha señala un nódulo «caliente» o funcional (Nix *et al.*, 2005)

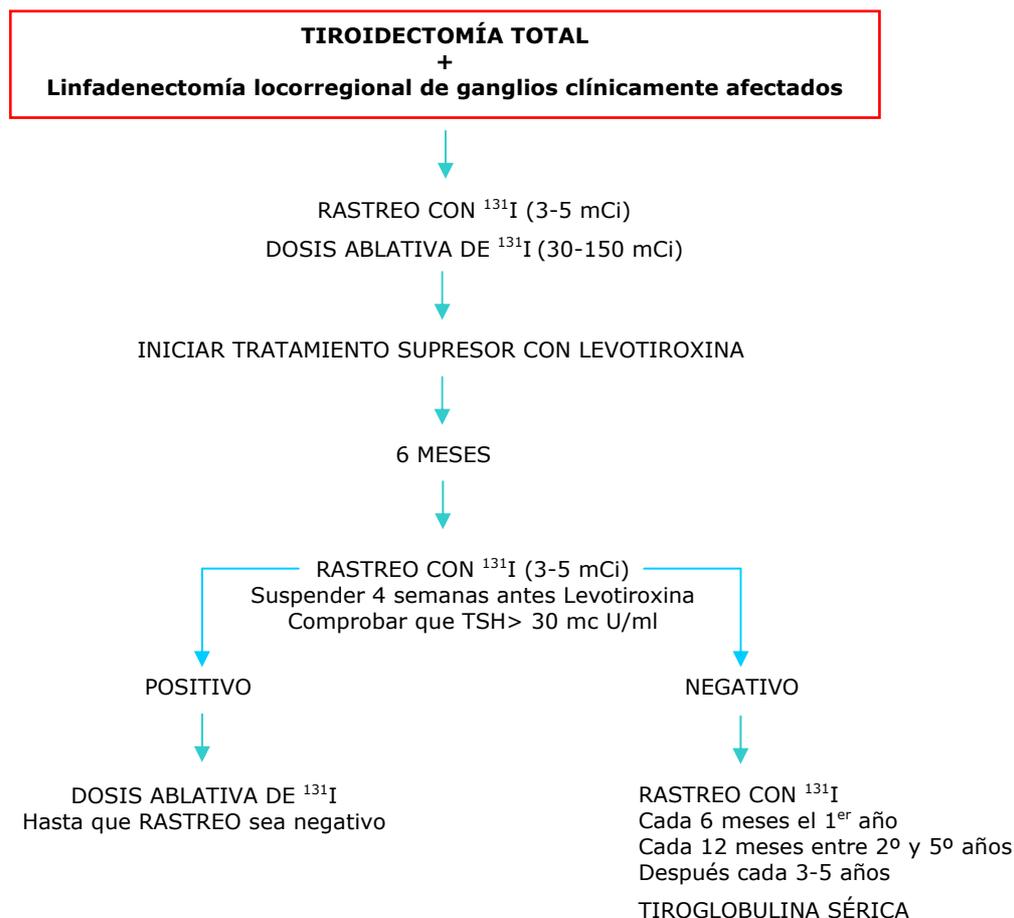
Durante muchos años se empleó como trazador  $^{131}\text{I}$  que, actualmente, se está sustituyendo por  $^{123}\text{I}$  (período de semidesintegración menor) o por  $^{99}\text{Tc}$  (período de semidesintegración de sólo 6 horas). El  $^{99}\text{Tc}$  permite administrar dosis mas altas que el  $^{131}\text{I}$  y, además, como no emite radiación  $\beta$ , no supone ningún riesgo de irradiación para el paciente. Sin embargo, aunque el tecnecio es atrapado por el tiroides de forma similar al yodo, no es organificado, lo que puede producir algunas discrepancias en los resultados gammagráficos. En función de la captación del trazador, los nódulos se clasifican en:

- ✓ **Funcionantes, captantes o «calientes»:** captan yodo, sintetizan hormonas y son autónomos, no regulados por la hipófisis (en estos casos se observa una disminución de los niveles de TSH en sangre). Suelen ser benignos.
- ✓ **No funcionantes, hipocaptantes o «fríos»:** no captan yodo ni sintetizan hormonas tiroideas, como es el caso del cáncer medular, el anaplásico y el de célula de Hürthle.

Los nódulos no funcionantes (90% de los casos) se analizan mediante una ecografía para determinar el estado de encapsulación y vascularización. Así, un nódulo encapsulado y con vascularización externa es, muy probablemente, benigno. En la actualidad, la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) es el criterio que se acepta universalmente para decidir una intervención, y debe hacerse siempre excepto en los nódulos de tamaño inferior a 1 cm. Si la punción citológica evidencia células malignas, el nódulo se considera un carcinoma y se adopta la postura terapéutica indicada según el tipo de tumor de que se trate. La punción-aspiración con aguja fina (PAAF) fue utilizada por primera vez por Martin y Ellis en 1930, la sensibilidad de esta técnica es prácticamente del 100% en los carcinomas papilar, medular, anaplásico, de célula de Hürthle, y también en los casos de linfomas y cuando hay metástasis. Sin embargo, no es posible diferenciar el adenoma folicular del carcinoma folicular, ya que son necesarios criterios histológicos de invasión capsular y vascular. Actualmente se están desarrollando nuevas técnicas de

diagnóstico basadas en el patrón de expresión de determinados genes (ej. *L-GALS3*, la fusión *PAX8-PPARG*, *C1orf24*,...) y en marcadores tumorales como las proteínas TPO, TP53, telomerasa, etc.; aunque todavía no hay resultados concluyentes (Almudévar *et al.*, 2000; Bojunga y Zeuzem, 2004; Cerutti *et al.*, 2004).

El tratamiento del cáncer de tiroides depende del tipo y tamaño del tumor, de la edad del paciente y de si el tumor se ha extendido o no. Hay diferentes opciones como la cirugía, yodo radioactivo, tratamiento hormonal, radioterapia, quimioterapia o una combinación de ellas. El tratamiento más frecuente es la extirpación del tiroides, normalmente total (tiroidectomía), a veces parcial (hemitiroidectomía, istmectomía etc.) y, en ocasiones, deben extirparse también los ganglios linfáticos. Los pacientes a los que se les extirpa toda la glándula tiroidea deben recibir tratamiento sustitutivo con hormona tiroidea (levotiroxina), que inhibe la secreción de TSH y, por tanto, la proliferación de las células tiroideas. En la mayoría de los tumores bien diferenciados se utiliza, además, el tratamiento con  $^{131}\text{I}$ , que consiste en un rastreo inicial con pequeñas dosis (3-5 mCi) tras la tiroidectomía para comprobar que no queden restos y, en caso afirmativo, una dosis ablativa de entre 30-150 mCi que destruye sólo las células tiroideas, ya sean benignas o cancerosas. En los casos en los que ni la cirugía ni el tratamiento con  $^{131}\text{I}$  son efectivos, así como cuando hay metástasis pulmonares u óseas, se emplea como tratamiento adyuvante la radioterapia. Por otro lado, en los pacientes con carcinomas diferenciados, la determinación de los niveles de tiroglobulina sérica es un método sensible para detectar las recurrencias o metástasis, aunque no existe acuerdo sobre los niveles de corte que se deben considerar. En la figura 5 se muestra el esquema típico de tratamiento de los carcinomas diferenciados.



**Figura 5.** Esquema terapéutico de los carcinomas diferenciados de tiroides. ([www.seep.es](http://www.seep.es))

En los casos de carcinoma medular también está indicada la tiroidectomía total, junto con la disección ganglionar del compartimento central del cuello. En estos casos, no es útil el tratamiento con <sup>131</sup>I, ya que las células C no captan yodo. En el caso de metástasis, o si la extirpación total no es posible, se emplea también quimioterapia o radioterapia externa. Como complemento del diagnóstico de cáncer medular también es muy útil determinar la presencia de mutaciones en el gen *RET* en toda la familia, lo que permite realizar la tiroidectomía total a una edad temprana de manera profiláctica, incluso en presencia de respuestas normales de calcitonina. Tras la tiroidectomía total, la persistencia de niveles elevados de calcitonina hace posible la detección de enfermedad persistente o recurrente.

El carcinoma anaplásico es el más agresivo y, en la mayoría de los casos, las lesiones pueden estar tan extendidas en el momento del diagnóstico que sólo es posible un tratamiento quirúrgico paliativo. En estos casos pueden utilizarse la quimioterapia y la radioterapia externa. No es útil el  $^{131}\text{I}$  ya que no hay captación del isótopo.

En general, la mayoría de los tumores tiroideos tienen muy buen pronóstico, con un porcentaje de recurrencia, normalmente durante el primer año, del 10-15% (Falvo *et al.*, 2004). Cerca del 95% de los pacientes con cáncer de tiroides sobreviven al menos 10 años, y el pronóstico es más favorable para los hombres menores de 40 años y las mujeres menores de 50, con tumores de menor tamaño. La edad de aparición, la presencia de metástasis distantes, el tamaño del tumor y la invasión extratiroidea son factores de pronóstico establecidos de los carcinomas diferenciados. En función de estos factores de pronóstico se han establecido una serie de clasificaciones para tratar de predecir la tasa de mortalidad de los distintos tipos de carcinomas. Las más empleadas son: AMES, AGES, MACIS, EORTC y UICC-TNM (Jukkola *et al.*, 2004).

### 3.1 LA RADIACIÓN IONIZANTE EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE TIROIDES. USO DEL $^{131}\text{I}$

El  $^{131}\text{I}$  es un compuesto que desde 1945 se utiliza en el tratamiento del cáncer de tiroides y del hipertirodismo en forma de yoduro de sodio, con administración oral. El primer estudio sobre el empleo de  $^{131}\text{I}$  en el tratamiento del cáncer de tiroides fue realizado por Seidlin, Marinelli y Oshry en 1946. Los objetivos fundamentales de la terapia con  $^{131}\text{I}$  son los siguientes:

- Ablación de restos de tejido tiroideo tras la cirugía.
- Tratamiento en casos de recurrencia, metástasis y microcarcinomas ocultos.
- Seguimiento posterior a la ablación mediante rastreos corporales con el isótopo y monitorización con tiroglobulina.

El tratamiento con  $^{131}\text{I}$  es muy efectivo, ya que este compuesto libera altas dosis de radiación al tiroides afectando poco a otras partes de cuerpo. La eficacia del tratamiento está directamente relacionada con la capacidad de captación y retención de yodo del tumor, por lo que sólo es útil en los carcinomas diferenciados y no en los carcinomas medular y anaplásico, que no captan yodo. Además, aproximadamente dos tercios de las metástasis son capaces de retener yodo, en el resto, el empleo del  $^{131}\text{I}$  no supone ningún beneficio, especialmente en pacientes mayores de 40 años con tumores avanzados o con carcinoma de célula de Hürthle (revisado por Mazzaferri y Massoll, 2002). Se considera que la captación es efectiva si se detecta una concentración del 0,5% de la dosis por gramo de tejido tumoral y con una vida media de 4 días (Parthasarathy y Crawford, 2002). Por otro lado, el empleo de esta terapia debe ser selectivo, así, no se recomienda en los pacientes con tumores de bajo riesgo ya que el pronóstico después de la cirugía es ya muy favorable. Sin embargo, en pacientes con alto riesgo de recurrencia el tratamiento con  $^{131}\text{I}$  disminuye tanto la recurrencia como la tasa de mortalidad (Larsen *et al.*, 2003). También hay autores que consideran que este tratamiento confiere un mejor pronóstico a pacientes con tumores de riesgo bajo que el uso único de la levotiroxina y que, si el tumor es de riesgo elevado, la ventaja es mínima (revisado por Mazzaferri y Massoll, 2002). En el 80% de los pacientes con una tiroidectomía casi total, la ablación total se consigue con dosis de 30-100 mCi (1100-3700 MBq). Sin embargo, cuando la extirpación es menor, la ablación se consigue con 30 mCi en sólo dos tercios de los pacientes. Por tanto, se considera que a los pacientes que vayan a ser tratados con  $^{131}\text{I}$  se les debería realizar una tiroidectomía total o casi total (Larsen *et al.*, 2003).

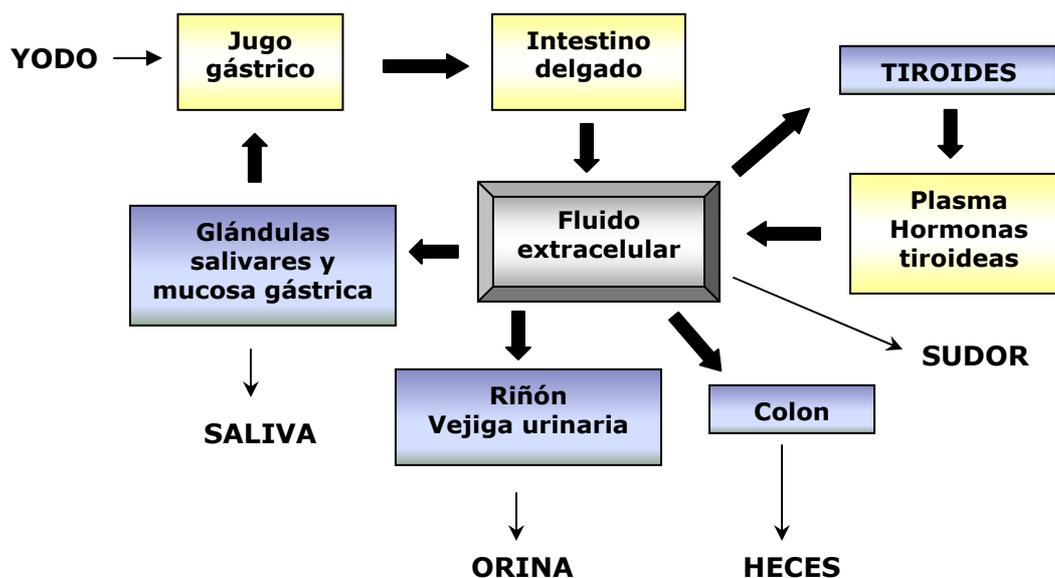
Previamente al tratamiento con  $^{131}\text{I}$  se realiza un rastreo para valorar la persistencia de restos tiroideos o de otras metástasis y determinar la dosis ablativa adecuada para cada paciente. Las dosis utilizadas en este prueba son bajas (2-3 mCi), para no inhibir la capacidad de captación del tejido. Posteriormente, se utilizan dosis ablativas de 30-150 mCi (Parthasarathy y Crawford, 2002) y, tras el tratamiento, se hacen seguimientos periódicos para

detectar posibles recurrencias y, si es necesario, se vuelve a repetir la dosis ablativa.

### 3.2 CARACTERÍSTICAS Y METABOLISMO DEL $^{131}\text{I}$

El isótopo radiactivo  $^{131}\text{I}$  es uno de los compuestos liberados en las pruebas y accidentes nucleares y causante de un incremento de la incidencia de cáncer de tiroides y, posiblemente, de aquellas enfermedades del tiroides causadas por deficiencias hormonales tiroideas. Es un isótopo con un periodo de semidesintegración de 8,04 días, que emite radiación de tipo  $\beta$ , de baja penetrancia, elevada LET (transferencia lineal de energía) y una energía máxima de 0,61 MeV; y radiación de tipo  $\gamma$ , de elevada penetrancia, baja LET y con energía máxima de 637 keV. La persistencia del  $^{131}\text{I}$  en el organismo depende tanto de su periodo de desintegración como de la pérdida por excreción. En las primeras 24 horas se excreta un 30-75% de la dosis administrada por vía urinaria, salivar, secreción gástrica y, en menor medida, por el sudor (Parthasarathy y Crawford, 2002).

El yodo natural se encuentra de forma inorgánica en el aire, el agua y el suelo y es un precursor de la síntesis de hormonas tiroideas. Puesto que es imprescindible para dicha síntesis, el tiroides incorpora tanto el yodo inorgánico como cualquiera de sus isótopos radiactivos, incluyendo el  $^{131}\text{I}$ . La captación de yodo también se observa, en menor cantidad, en otros tejidos como: glándulas salivares, estómago, glándulas mamarias, plexo coroideo y placenta; aunque sólo en el tiroides el proceso está regulado por la TSH (Cavalieri, 1997). Como se muestra en la figura 6, tras su administración, el  $^{131}\text{I}$  (o el inorgánico) es rápidamente absorbido por el tracto gastrointestinal, liberado en el torrente circulatorio y distribuido en el fluido extracelular, hasta que es captado por el tiroides u otros tejidos, o excretado.



**Figura 6.** Esquema de la distribución y excreción del yodo en humanos. (Adaptado de Cavalieri, 1997).

En el tratamiento con  $^{131}\text{I}$  el órgano más irradiado es el tiroides y la dosis absorbida depende de la capacidad de captación del yodo, la vida media efectiva y la masa del tejido. Así, en los tumores tiroideos, la captación de yodo es menor del 2% y la vida biológica efectiva del yodo es corta ( $\sim 1$  día), por lo que, a pesar de las altas dosis recibidas, los niveles de radiación disminuyen considerablemente en las primeras 24 horas o antes. Como contrapartida, en los pacientes con hipertiroidismo, cuyo tratamiento se basa en dosis mucho menores ( $\sim 10$  mCi), la captación del yodo es mayor ( $> 20\%$ ) y la vida efectiva es de aproximadamente 8 días, por lo que la radiación, aunque menor, persiste más tiempo.

Después del tiroides, los órganos que reciben las dosis más altas son los que concentran yodo (glándulas salivares, estómago,...) y los que se encargan de su excreción (vejiga urinaria). La dosis que reciben el estómago y las glándulas salivares es constante, y la de la vejiga disminuye a medida que aumenta la captación en el tiroides. El resto de tejidos (mama, cerebro, gónadas, riñones, hígado, bazo, pulmones y médula) son irradiados en parte por el yodo incorporado en el tiroides y, mayoritariamente, por el yodo unido a los complejos que forman las hormonas tiroideas con proteínas

transportadoras de vida media larga. Así, la dosis recibida aumenta cuanto mayor sea la cantidad de yodo que incorpore el tiroides (Zanzonico, 1997). Por tanto, aunque la mayor parte del yodo es captado por el tiroides, el yodo que se acumula en otros tejidos y el que forma parte de complejos proteicos puede provocar la exposición del resto de los tejidos a la radiación y a sus efectos perjudiciales.

### 3.3 MECANISMO DE ACCIÓN DEL $^{131}\text{I}$

El efecto terapéutico del  $^{131}\text{I}$  es debido a la emisión de radiación ionizante  $\beta$  y  $\gamma$ . El 90% de los efectos son debidos a la radiación  $\beta$ , de escasa penetración ( $\sim 36$  mm en tejido blando), por lo que la exposición fuera del tiroides es mínima. El restante 10% se corresponde con radiación  $\gamma$ , con una gran capacidad de penetración, que contribuye a la muerte celular y provoca la irradiación del resto del cuerpo.

La radiación puede actuar de forma directa o indirecta, provocando la ionización de moléculas imprescindibles para la célula. Aunque la mayoría de las alteraciones de las estructuras y funciones celulares pueden ser rápidamente reparadas, las alteraciones inducidas por la radiación pueden provocar severas consecuencias para la célula, provocando la apoptosis celular durante las semanas y meses siguientes a la irradiación.

### 3.4 EFECTOS SECUNDARIOS DEL TRATAMIENTO CON $^{131}\text{I}$

Durante los últimos 50 años, el tratamiento con  $^{131}\text{I}$  se ha considerado válido y efectivo para distintas enfermedades tiroideas como el hipertiroidismo y los carcinomas diferenciados. Sin embargo, este tratamiento también puede producir efectos secundarios indeseables debido a la exposición de otros tejidos normales y sanos a la radiación ionizante (Navarro *et al.*, 2003).

## Introducción

---

Los efectos secundarios del tratamiento del cáncer de tiroides con  $^{131}\text{I}$  a corto plazo son normalmente temporales y no muy graves. Son frecuentes síntomas gastrointestinales como náuseas y vómitos, gastritis, cistitis y pérdida del gusto. La acumulación de  $^{131}\text{I}$  en las glándulas salivares puede provocar sialoadenitis, con dolor y agrandamiento de las glándulas. También puede darse parotiditis y, cuando hay restos abundantes de tejido tiroideo posquirúrgico, tiroiditis. A las seis semanas del tratamiento puede manifestarse una pancitopenia transitoria, que se recupera espontáneamente, y también neumonitis por radiación y fibrosis pulmonar (Larsen *et al.*, 2003).

Los efectos secundarios a largo plazo suelen ser más graves, especialmente tras la administración de dosis elevadas de  $^{131}\text{I}$ . Se han dado casos de supresión de la médula ósea (dosis  $>500$  mCi), leucemia mielomonocítica aguda en pacientes tratados con dosis mayores de 1000 mCi o que han recibido también radioterapia externa; carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y de vejiga, y fibrosis pulmonar en pacientes con metástasis pulmonares (Larsen *et al.*, 2003). Sin embargo, las complicaciones que más preocupación generan son las relativas a la posible exposición gonadal y, por tanto, a los efectos en la descendencia. Estos efectos dependen de la dosis total acumulada en las gónadas, así como del sexo y edad del paciente, proximidad del tumor a las gónadas o hipotiroidismo (Mazzaferri, 2002). La administración de 1mCi de  $^{131}\text{I}$  expone a ovarios y testículos a una dosis de 1,4 mGy (0,038 mGy/MBq) y 0,85 mGy (0,023 mGy/MBq), respectivamente (Klain *et al.*, 2002). Tras el tratamiento se produce un fallo gonadal (insuficiencia ovárica y oligospermia) temporal y normalmente reversible (Larsen *et al.*, 2003). A pesar de este efecto, distintos estudios muestran que la exposición a  $^{131}\text{I}$  no incrementa el riesgo de nacimientos prematuros, bajo peso al nacer, malformaciones congénitas, muerte durante el primer año de vida, ni de enfermedades del tiroides en la descendencia (Klain *et al.*, 2002; Bal *et al.*, 2005). En las mujeres, las únicas alteraciones descritas son un aumento de la frecuencia de abortos en las que fueron tratadas el año anterior a la concepción, por lo que se recomienda posponer la concepción hasta al menos un año después del tratamiento; y la aparición temprana de la

menopausia (Dottorini *et al.*, 1995; Schlumberger y De Vathaire, 1996; Mazzaferri, 2002; Vini *et al.*, 2002). En cuanto a los hombres, debido a la elevada sensibilidad de las espermatogonias a la radiación, los efectos podrían ser más serios. Las principales fuentes de irradiación de los testículos son la vejiga, el intestino y las metástasis pélvicas. Se ha observado la supresión temporal de la espermatogénesis tras dosis de sólo 50 cGy, y azoospermia durante tres años tras la administración de dosis de 2 Gy (revisado por Hyer *et al.*, 2002). Cuando sólo se administra una dosis ablativa, la función testicular se recobra en unos meses y el riesgo de infertilidad es mínimo. Sin embargo, si se administran varias dosis, el daño gonadal se acumula, siendo especialmente peligrosas las dosis superiores a 14 GBq (Krassas y Pontikides, 2005). Todos estos estudios muestran que es poco probable la inducción de problemas de fertilidad tras una sola dosis ablativa de  $^{131}\text{I}$ , aunque el daño podría ser acumulativo tras la aplicación de varias dosis.

#### 3.4.1 Efecto genotóxico del $^{131}\text{I}$

Numerosos estudios citogenéticos realizados en pacientes tratados con  $^{131}\text{I}$  han descrito aumentos significativos de aberraciones cromosómicas y de micronúcleos tras el tratamiento (Livingston *et al.*, 1993; Catena *et al.*, 1994; Wuttke *et al.*, 1996; Gutiérrez *et al.*, 1999; Ballardín *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2004; Popova *et al.*, 2005). Así, se ha descrito que el número de micronúcleos observado en linfocitos de sangre periférica de pacientes tratados con  $^{131}\text{I}$  es mayor en la primera semana de la administración del mismo, y que este incremento declina tras unos meses. Otros estudios señalan la persistencia del daño durante aproximadamente el primer año, perdurando incluso hasta 3 años (Livingston *et al.*, 1993; Gutiérrez *et al.*, 1999; Monteiro-Gil *et al.*, 2000; Ballardín *et al.*, 2002). Sin embargo, no se ha logrado establecer la cinética del proceso, que se ha intentado explicar mediante diversos mecanismos como la muerte celular de los linfocitos lesionados, la rápida sustitución por linfocitos no lesionados y mediante mecanismos de reparación celular del daño inducido. Incluso, recientemente, se ha intentado poner de manifiesto una respuesta

adaptativa del organismo frente a la inducción de micronúcleos con radiaciones ionizantes (revisado por Navarro *et al.*, 2003).

Actualmente, se cree que un incremento en la frecuencia de alteraciones cromosómicas puede indicar un incremento del riesgo de padecer cáncer (Hagmar *et al.*, 1994; Hagmar *et al.*, 2004). Por lo que algunos autores resaltan que estos estudios citogenéticos deberían ser cuidadosamente considerados en la evaluación de un posible daño genético tras la terapia con  $^{131}\text{I}$ . Sin embargo, otros estudios indican que estas alteraciones cromosómicas no tienen necesariamente que ir asociadas con un incremento del riesgo de cáncer. Por ello, aun cuando se detecte un incremento de la frecuencia de MN o aberraciones cromosómicas, no están claras las consecuencias biológicas reales en cuanto al riesgo de padecer una lesión tardía (revisado por Navarro *et al.*, 2003).

Por otro lado, se cree que la terapia con  $^{131}\text{I}$  puede inducir la aparición de segundos tumores (revisado por Ballardin *et al.*, 2002). En concreto, diferentes estudios epidemiológicos ponen de manifiesto la relación entre el tratamiento con  $^{131}\text{I}$  que reciben individuos con cáncer de tiroides e hipertiroidismo y distintos tipos de tumores sólidos. Se ha descrito un aumento del riesgo a padecer leucemia, cáncer de vejiga y cáncer de colon. En contraposición, otros dos estudios no muestran ningún incremento significativo en la incidencia de leucemia en los pacientes tratados, ni tampoco un aumento de la frecuencia de aparición de un segundo tumor (revisado por Navarro *et al.*, 2003).

En nuestro estudio, el principal objetivo fue el análisis a largo plazo de la inestabilidad genómica inducida por la radiación en humanos. Para ello, se analizó el daño genético en líneas celulares linfoblastoides establecidas a partir de linfocitos de sangre periférica de individuos pertenecientes a dos familias, en las que uno de los progenitores, paciente con cáncer de tiroides, había sido tratado con  $^{131}\text{I}$ , 17 y 7 años antes del estudio, respectivamente. El diseño de este estudio nos permitió estudiar el daño genético en células en cultivo tras el

tratamiento *in vivo*, así como el posible daño transmitido a la descendencia de los individuos tratados.

#### **4. Efectos biológicos de la radiación ionizante**

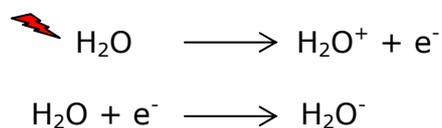
En 1895, el físico Roentgen, experimentando con rayos catódicos, descubrió la primera forma de radiación artificial, los rayos X. Posteriormente, en 1896, Henri Becquerel descubrió accidentalmente la radiactividad natural, que fue estudiada en profundidad por Pierre y Marie Curie, a quienes se debe el nombre. Una vez que empezaron a conocerse las propiedades de la radiación se fueron desarrollando sus aplicaciones, así como las técnicas para obtener materiales radiactivos artificiales. En poco tiempo se puso de manifiesto su potencial carcinogénico: la radiación es capaz de inducir cáncer en la mayor parte de los tejidos y especies y a cualquier edad. Concretamente, en 1911 se describieron los primeros casos de leucemia inducida por radiación (revisado por Little, 2000). Actualmente, la radiación se emplea en medicina (diagnóstico y tratamiento), industria, agroalimentación, investigación, etc.

Se denomina radiación a la energía que se propaga en forma de onda a través del espacio o de la materia. Toma forma de partículas ( $\alpha$ ,  $\beta$ , neutrones y otras) o de ondas electromagnéticas (rayos  $\gamma$ , X, UV, radiación visible, IR, microondas, radiofrecuencia) y puede clasificarse en **ionizante** (rayos X, energía fotónica) y **no ionizante** (luz visible, ondas de radio y televisión). La característica más relevante de la radiación ionizante es su capacidad para excitar e ionizar los átomos de la materia que atraviesa. Esta ionización no sólo se produce al atravesar la materia, sino que los electrones arrancados, a su vez, producen nuevas ionizaciones (revisado por Creus, 2002). La acción de la radiación ionizante puede ser directa e indirecta. La acción directa ocurre cuando la energía se deposita en una molécula causando su ionización, lo que altera la función celular y da lugar a la formación de un radical orgánico. Por el contrario, la acción indirecta de la radiación ionizante tiene lugar cuando los

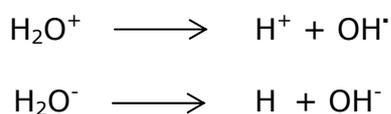
## Introducción

---

radicales libres formados por la ionización de las moléculas reaccionan con otras moléculas, entre ellas el DNA. A causa del elevado contenido en agua de la célula, entre el 70% y el 80%, la mayor parte de estas interacciones se produce con la molécula de agua, del siguiente modo:



El resultado son las moléculas inestables  $\text{H}_2\text{O}^+$  y  $\text{H}_2\text{O}^-$ , que pueden disociarse dando lugar a radicales libres muy reactivos:



Estos radicales ( $\text{H}^+$  y  $\text{OH}^\bullet$ ) contienen electrones no apareados, lo que les hace muy reactivos y pueden oxidar o reducir moléculas orgánicas como el DNA, proteínas o lípidos. Compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico, los carotenos y tocoferoles reducen el daño celular producido por la radiación ionizante y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  tanto *in vivo* como *in vitro* (Tominaga *et al.*, 2004).

El nivel de toxicidad y penetración de las distintas radiaciones es diferente en función de su masa y energía y, a medida que se pierde energía, disminuye la capacidad de penetración. La LET, que representa la cantidad de energía disipada por unidad lineal de trayectoria, es un parámetro de referencia. En concreto, numerosos estudios han demostrado que las radiaciones de alta LET, aunque tienen menor penetración, son más efectivas que las de baja LET para alterar distintos procesos como la muerte celular y apoptosis, e inducir mutaciones, reordenaciones cromosómicas y transformación celular (revisado por Kawata *et al.*, 2004). El daño biológico está relacionado con la densidad de ionización que produce la radiación en el tejido; de esta forma, una dosis física de partículas  $\alpha$  o de neutrones no

provoca el mismo efecto que la misma dosis de radiación  $\beta$ ,  $\gamma$  o de rayos X. Las radiaciones ionizantes más utilizadas son las siguientes:

- ✓ **Radiación  $\alpha$ :** son partículas integradas por dos protones y dos neutrones y emitidas durante la desintegración de átomos de elementos pesados (uranio, radón, plutonio...). Son poco penetrantes (se detienen con una hoja de papel) y se desvían en presencia de campos magnéticos y eléctricos intensos. Si se introduce en el cuerpo una sustancia emisora de radiación  $\alpha$ , ésta libera toda su energía hacia las células circundantes.
  
- ✓ **Radiación  $\beta$ :** está compuesta por partículas de masa similar a la de los electrones, lo que le confiere un mayor poder de penetración, aunque son suficientes algunos metros de aire, unos centímetros de agua o una lámina de aluminio para detenerla. No obstante, puede dañar la piel desnuda y si entraran en el cuerpo partículas emisoras de radiación  $\beta$ , irradiarían los tejidos internos.
  
- ✓ **Radiación  $\gamma$ :** es de carácter electromagnético, muy energética y con un poder de penetración considerable. Para detenerla se precisa una pared gruesa de plomo o cemento. Desde el momento en el que la radiación  $\gamma$  entra en una sustancia su intensidad empieza a disminuir debido a que en su trayectoria impacta con distintos átomos. En el caso de los seres vivos, la interacción con las células puede provocar daños en la piel o en los tejidos internos.
  
- ✓ **Radiación X:** es similar a la  $\gamma$ , de carácter electromagnético, pero se produce artificialmente en un tubo de vacío a partir de un material que no tiene radiactividad propia, por lo que su activación y desactivación tiene un control fácil e inmediato.

### 4.1 TIPOS DE EXPOSICIÓN

Existen dos fuentes principales de exposición a la radiación: **natural** y **artificial**. La radiación natural procede tanto del espacio (radiación cósmica), como de la tierra (radón), así como de isótopos radiactivos de nuestro propio cuerpo. El espacio exterior y el sol son el origen de la radiación cósmica, constituida por partículas con un alto índice energético: 86% protones, 11% partículas  $\alpha$  y 2% electrones (revisado por Thorne, 2003). De esta radiación, sólo llega al suelo una fracción ya que, en su mayor parte, es detenida por la atmósfera. En consecuencia, la latitud es determinante para la dosis recibida, de manera que en la cima de una montaña se recibe mayor radiación cósmica que al nivel del mar. La radiación debida al gas radón procede de la desintegración del metal radio contenido en algunas rocas y también varía dependiendo de la localización. Otras fuentes de radiación son algunos productos que ingerimos a diario, que contienen sustancias radiactivas en cantidades muy pequeñas; y elementos radiactivos presentes en nuestro organismo: polonio y radio en los huesos, carbono y potasio en los músculos, y gases nobles y tritio, también radiactivos, en los pulmones. Este conjunto de radiaciones naturales integra la radiación de fondo. En concreto, la radiación cósmica supondría un 8%, al igual que la interna, y el radón un 53% (revisado por Creus, 2002).

Las fuentes de radiación artificiales contribuyen en menor medida a la dosis efectiva de la población. Entre ellas se incluyen los rayos X, utilizados en medicina para diagnóstico y tratamiento; y otros procedimientos de la medicina nuclear (entre ellos la administración de radionúclidos como el  $^{131}\text{I}$ ). Hay que considerar también las exposiciones laborales y las explosiones y accidentes nucleares. En general, los rayos X representan un 11%, la medicina nuclear un 4%, los productos de consumo un 3% y el resto un 1% (revisado por Creus, 2002).

En la mayoría de los casos, la fuente de exposición más importante es la de origen natural, seguida de la exposición médica como parte de un diagnóstico o tratamiento.

#### 4.2 UNIDADES DE ACTIVIDAD Y DOSIMETRÍA

Para poder medir y comparar la energía absorbida en distintas condiciones de irradiación ha sido necesario definir varios conceptos y sus unidades correspondientes. En primer lugar, la radiación emitida durante la desintegración de un radionúclido se denomina **actividad** y se define como el número de desintegraciones nucleares por unidad de tiempo (Kathren y Petersen, 1989). En el sistema internacional (SI) la unidad de actividad es el **Becquerel** (Bq), que equivale a una desintegración por segundo. En el sistema tradicional la actividad se expresa en **Curios** (Ci), equivalentes a  $3,7 \times 10^{10}$  desintegraciones por segundo. La equivalencia entre estas dos unidades es la siguiente:

$$1\text{Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq}$$

Se denomina **periodo de semidesintegración** ( $T_{1/2}$ ) al tiempo necesario para que la actividad de un radionúclido se reduzca a la mitad. Cada radionúclido tiene un  $T_{1/2}$  específico, más corto cuanto más inestable es el radionúclido. La desaparición de los isótopos administrados a un individuo no sólo depende del periodo de semidesintegración del mismo, sino también de los mecanismos de excreción del organismo, por lo que se denomina **vida media efectiva** o **tiempo efectivo de semidesaparición** al parámetro que cuantifica la reducción de la actividad radiactiva en el cuerpo.

Por otro lado, para medir la **exposición**, es decir, la ionización producida por la radiación, se emplea como unidad el **Roentgen** (R), que se define como la exposición recibida por un kilogramo de aire en condiciones estándar de presión y temperatura si se produce un número de pares de iones equivalente a  $2,58 \times 10^{-4}$  culombios (C). Hay que tener en cuenta que con esta unidad, la cantidad de energía depositada varía en función del material

## Introducción

---

irradiado, por lo que las unidades más utilizadas actualmente para medir la energía de la radiación que afecta al organismo son: dosis absorbida, dosis equivalente y dosis efectiva. La **dosis absorbida** (D) se define como la energía depositada por unidad de masa, independientemente del material. En el SI la unidad es el **Gray** (Gy), y tradicionalmente el **rad**. La dosis depositada en un tejido por 1 Roentgen es de 0,96 rad. Estas medidas se definen como sigue:

$$\begin{aligned}1 \text{ Gy} &= 1 \text{ J/kg} \\1 \text{ rad} &= 0,01 \text{ J/kg} \\1 \text{ rad} &= 0,01 \text{ Gy} = 1 \text{ cGy}\end{aligned}$$

Hay que tener en cuenta que no todos los tipos de radiación son igualmente eficaces, por lo que para considerar estas diferencias se emplea otra medida, la **dosis equivalente** (H), en la que a la dosis absorbida se aplica un factor de ponderación ( $W_R$ ) específico de cada tipo de radiación. Este factor es igual a uno para los rayos X,  $\gamma$  y partículas  $\beta$ . Así, en estos casos, la dosis absorbida es igual a la equivalente. La unidad de dosis equivalente es el **Sievert** (Sv), que se define como:  $1 \text{ Gy} \times W_R$ . La unidad tradicional es el **rem**, que equivale a  $1 \text{ rad} \times W_R$  y a  $0,01 \text{ Sv}$ .

Los efectos de la radiación varían en función del órgano o tejido irradiado, por lo que se ha definido una nueva medida, la **dosis efectiva** (E), que es la suma de la dosis equivalente de cada órgano multiplicada por el factor de peso del tejido ( $W_T$ ). La unidad de esta medida es también el Sievert. En la tabla 3 se resumen las medidas y unidades mencionadas.

MEDIDA	UNIDAD (SI)	UNIDAD TRADICIONAL	CONVERSIÓN
Actividad	Bq	Ci	$1 \text{ Bq} = 2,7 \times 10^{-11} \text{ Ci}$
Exposición	R	R	$1 \text{ R} = 2,6 \times 10^{-3} \text{ C/Kg}$
Dosis absorbida	Gy	rad	$1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$
Dosis equivalente	Sv	rem	$1 \text{ Sv} = 100 \text{ rem}$
Dosis efectiva	Sv	rem	$1 \text{ Sv} = 100 \text{ rem}$

**Tabla 3.** Medidas y unidades empleadas para la cuantificación de la dosis de radiación.

#### 4.3 EFECTOS GENOTÓXICOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE

La radiación ionizante se considera un agente tanto mutagénico como carcinógeno debido a su habilidad para penetrar en las células y tejidos y, de manera directa o indirecta, provocar la ionización y excitación de las moléculas, lo que puede desencadenar cambios irreversibles (revisado por Little, 2006). Las mutaciones inducidas por la radiación son consecuencia de grandes cambios estructurales del DNA como deleciones cromosómicas, reordenaciones y recombinación homóloga, más que de mutaciones puntuales. En concreto, se considera que la lesión más importante del DNA en relación a su efecto citotóxico y mutagénico son las roturas de doble cadena (DSB), ya que conllevan la formación de reordenaciones cromosómicas (Morgan *et al.*, 1998; Honma *et al.*, 2003). Incluso una sola DSB puede desencadenar, en algunos sistemas experimentales, la detención del ciclo celular (revisado por Little, 2006).

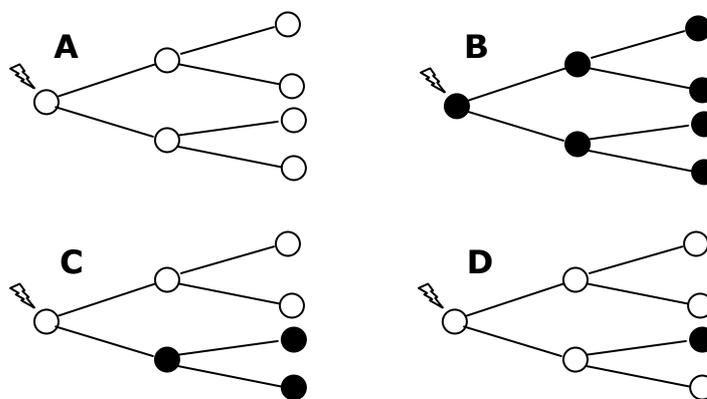
Puesto que la radiación deposita su energía de forma aleatoria se podría suponer que la probabilidad de que se produzca una alteración genética es idéntica en cualquier región del genoma. Sin embargo, se sabe que los genes responden de distinta forma a las mutaciones inducidas por la radiación. Por ejemplo, estudios realizados con ratones en un pequeño número de genes de herencia recesiva demostraron una diferencia de hasta 30 veces en la mutabilidad; e incluso existen genes en los que no se han detectado mutaciones inducidas por la radiación (Sankaranarayanan, 1999). La mayor parte de estas mutaciones son deleciones que pueden afectar a uno o a múltiples genes e incluso a las regiones adyacentes, aunque sólo un pequeño porcentaje será viable y transmisible a la descendencia (Sankaranarayanan y Wassom, 2005). También hay que señalar que la extensión de las deleciones depende de la región en la que se localizan, de tal forma que se podría esperar que en ciertos genes la frecuencia de mutación inducida por la radiación fuera elevada debido a que la zona en la que se ubican es capaz de tolerarlas y seguir manteniendo la viabilidad en heterocigosis (Sankaranarayanan, 1999).

Actualmente existen numerosos datos acerca de las graves consecuencias que tiene la exposición a dosis elevadas de radiación ionizante en el ser humano, desde la muerte celular hasta un incremento de la incidencia de ciertos tipos de cáncer como los de tiroides, mama, pulmón y leucemia. Los efectos de la radiación pueden ser tanto determinísticos (muerte celular y, como consecuencia, daño en los tejidos) como estocásticos (incremento de la susceptibilidad al cáncer y enfermedades hereditarias). En el primer caso, por debajo de una determinada dosis umbral no se producirá ningún efecto, pero cualquier incremento que supere dicho umbral supondrá un aumento de la probabilidad. En cuanto a los efectos estocásticos, la probabilidad aumenta con la dosis absorbida pero no así la severidad, por lo que incluso pequeñas dosis pueden incrementar la susceptibilidad al cáncer y a enfermedades hereditarias (revisado por Creus, 2002).

Por otro lado, los efectos mutagénico y carcinogénico de la radiación dependen de numerosos factores como la dosis y tipo de radiación, el tiempo de exposición, el tejido afectado y su recuperación, la susceptibilidad genética de cada individuo, la edad, etc (Little, 1993). Parece inevitable que dosis elevadas desencadenen un proceso cancerígeno, aunque estas dosis se dan muy escasamente y son debidas, sobre todo, a accidentes nucleares. En el extremo opuesto se encuentran las dosis bajas, que son recibidas de forma habitual por determinados colectivos de personas en forma de tratamiento, pruebas de diagnóstico y mediante la exposición ambiental (Brenner *et al.*, 2003). Sus efectos todavía no están claros, ya que no se han podido establecer los mecanismos ni el umbral de dosis a partir de los cuales se desencadenan. Por otro lado, está claro que para dosis intermedias y altas la relación dosis-respuesta es lineal y que no hay un umbral mínimo, es decir, cualquier dosis produce efectos. Sin embargo, para radiación de baja LET y en bajas dosis, esta hipótesis de respuesta lineal y sin umbral no está establecida (Brooks, 2005). Otro dato interesante es que la frecuencia de cáncer no es más elevada en áreas donde la radiación de fondo es muy superior a la media, y se ha postulado que en algunos individuos o poblaciones podrían darse fenómenos de hormesis o respuesta adaptativa (Feinendegen, 2005).

### 4.3.1 Efectos directos de la radiación ionizante

Durante mucho tiempo se pensó que la importancia biológica de la radiación ionizante radicaba exclusivamente en su acción directa. Esta hipótesis se denominó teoría «diana» y fue descrita por Douglas Lea en 1946. Según esta teoría, solamente las células en las que incide la radiación (de manera directa o indirecta) presentarían lesiones y las transmitirían a sus descendientes (figura 7).



**Figura 7.** Representación de los efectos directos e indirectos de la radiación. Los círculos blancos representan células normales y los negros células mutadas. A representa la población de células no afectada por la radiación, que es la mayoría. B efecto y transmisión de lesiones producidas directamente por la radiación. C y D ejemplos de mutaciones consecuencia de la inestabilidad genómica (Little, 2000).

Numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* demuestran el impacto de la radiación ionizante en términos de inducción de mutaciones en células somáticas directamente expuestas. Tras el efecto de la radiación, los mecanismos de reparación del DNA eliminarán la lesión o la repararán incorrectamente, dando lugar, en este último caso, a mutaciones transmisibles a la descendencia. Los efectos directos de la radiación se consideran inmediatos, clonales y con baja frecuencia, y las principales lesiones producidas son: alteraciones en las bases nucleotídicas, aberraciones

cromosómicas, roturas de simple y doble cadena, entrecruzamientos, muerte celular y transformación maligna (Morgan y Sowa, 2005). Sin embargo, el efecto directo de la radiación no es suficiente para justificar la elevada frecuencia de alteraciones observada en algunos casos. Recientemente, se ha demostrado que la radiación puede inducir lesiones a largo plazo y afectar a moléculas que no han sido directamente irradiadas, lo que se conoce como efectos indirectos de la radiación ionizante que, al contrario que los directos, se caracterizan por su elevada frecuencia, su expresión no clonal y su aparición tardía (Little, 2000).

### 4.3.2 Efectos indirectos de la radiación ionizante

Recientemente se ha demostrado que la tasa de mutación permanece elevada durante varias generaciones celulares en los descendientes de células irradiadas, pudiendo llegar a cuatro años en algunos casos. Esto es una característica propia de la inestabilidad genómica. Además, las células irradiadas pueden también transmitir el daño a células adyacentes no irradiadas, lo que se denomina efecto *bystander*. Todos estos sucesos forman parte de los denominados efectos indirectos de la radiación ionizante (Morgan, 2003b; Barber y Dubrova, 2006; Little, 2006) que comprenden: inestabilidad genómica, efecto *bystander*, muerte celular retrasada, inestabilidad transgeneracional, conversión génica y respuesta adaptativa. Aunque todavía no se conocen los mecanismos que desencadenan esta serie de procesos, se ha propuesto la implicación de algún factor celular secretado por las células irradiadas, capaz de perpetuar la inestabilidad genómica en sus descendientes y de afectar a las células no irradiadas. Este factor tendría que ser soluble y capaz de ser transportado entre las células mediante las uniones *gap*; además, debería tener la capacidad de estimular las citoquinas y radicales libres (Morgan, 2003a).

De todos estos procesos los más estudiados han sido la inestabilidad genómica y transgeneracional y el efecto *bystander*, que se detallan a continuación.

#### 4.3.2.1 Inestabilidad genómica y efecto *bystander*

Como se ha indicado anteriormente, la **inestabilidad genómica** es un proceso que se caracteriza por una tasa elevada de alteraciones genéticas. En el caso de la inestabilidad inducida por la radiación, este proceso se manifiesta en los descendientes de células irradiadas durante numerosas divisiones celulares (revisado por Barber y Dubrova, 2006) y depende de la calidad y dosis de radiación recibida, y de factores genéticos propios del individuo (Watson *et al.*, 1997). Las alteraciones incluyen reordenaciones citogenéticas, mutaciones puntuales, amplificación génica, transformación y muerte celular. Las reordenaciones cromosómicas son una de las características de la inestabilidad genética mejor establecidas. Fueron detectadas por primera vez en 1992 por Kadhim y colaboradores, en ratones irradiados con partículas  $\alpha$  y confirmados, posteriormente, por distintos grupos en células de roedores y células humanas, tras la exposición a radiación de alta y baja LET, así como *in vivo* (revisado por Kadhim *et al.*, 2004).

El mecanismo que produce este tipo de inestabilidad genómica todavía es desconocido. Se postula la implicación de distintos factores: radicales libres, proteínas, mecanismos epigenéticos y alteraciones en genes de reparación. La alteración de genes importantes para la estabilidad genómica puede desencadenar un fenotipo mutador, que contribuye a perpetuar la inestabilidad genómica, pero resulta difícil que justifique su origen (Wright y Coates, 2006). Por otro lado, numerosos grupos han demostrado la implicación de distintas proteínas que participan en procesos de reparación. También parece probable que intervengan mecanismos epigenéticos como cambios en la metilación, acetilación y fosforilación, así como un aumento o disminución del estrés oxidativo. Hay que tener en cuenta que, además, estos cambios epigenéticos se han asociado con cáncer; en concreto, la alteración de los patrones de metilación provoca cambios en el patrón de expresión de algunos genes y también está asociada con fragilidad y descondensación cromosómica. Asimismo, se ha observado que la inestabilidad puede iniciarse tras condiciones de elevado estrés oxidativo. Hay estudios que muestran que

el tratamiento con compuestos que atrapan radicales libres reduce la inestabilidad de células irradiadas (Tominaga *et al.*, 2004), e incluso que el estrés oxidativo resultante de procesos inflamatorios podría ser un mecanismo común para la inestabilidad y el efecto *bystander* (Lorimore *et al.*, 2003). Además, las células con alteraciones en genes de reparación son espontáneamente inestables y presentan un estrés oxidativo elevado, incluso en ausencia de irradiación (revisado por Kadhim *et al.*, 2004).

Como mencionamos con anterioridad, hay una serie de factores que influyen en la inestabilidad genómica inducida por la radiación, en concreto:

- Calidad y dosis de la radiación (Kadhim *et al.*, 1994)
- Predisposición genética (Kadhim *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1997)

Una de las características propias de la inestabilidad genómica inducida por la radiación es la inusual relación dosis-respuesta. Así, a dosis relativamente bajas se produce una saturación y aunque se aumente la dosis no se incrementa el daño. Además, en el caso de la radiación de alta LET, no hay umbral, una sola partícula  $\alpha$  puede generar inestabilidad genómica (Khadim *et al.*, 1994). Por otro lado, en cuanto a los factores genéticos, están implicados todos los procesos que mantienen la integridad y estabilidad celular: mecanismos de reparación y replicación del DNA y genes reguladores del ciclo celular.

El significado biológico de la inestabilidad inducida por la radiación queda reflejado en un incremento del riesgo a padecer cáncer tras la irradiación, así como de la acumulación de alteraciones genéticas que, a su vez, pueden beneficiar la carcinogénesis inducida por la radiación, ya que se considera que la inestabilidad genómica facilita la iniciación y progresión del cáncer *in vivo* (revisado por Barber y Dubrova, 2006). En concreto, se ha observado que muchas de las reordenaciones cromosómicas características de la inestabilidad genómica son similares a las que se han encontrado en

cánceres humanos (Huang *et al.*, 2003). También se ha observado inestabilidad de microsatélites en ciertos tipos de cáncer como el cáncer de colon hereditario no polipósico o HNPCC (Ionov *et al.*, 1993), aunque no se ha podido demostrar en el caso del cáncer de tiroides (Soares *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 2002; Vaish *et al.*, 2003).

Para estudiar la inestabilidad genómica *in vitro*, teniendo en cuenta los distintos tipos de alteraciones observados, se emplean distintas aproximaciones, mayoritariamente citogenéticas, como el análisis de aberraciones cromosómicas, cambios de ploidía, formación de micronúcleos, ensayo del cometa, mutaciones y amplificación génicas, transformación celular, heterogeneidad clonal, muerte celular retrasada e inestabilidad de secuencias repetidas en tándem (García y Mandina, 2005; revisado por Barber y Dubrova, 2006).

Otro de los efectos indirectos de la radiación es el **efecto bystander**, que es el daño producido por la radiación ionizante en células no irradiadas que están en contacto con las irradiadas. Este mecanismo se ha estudiado con detalle en los últimos diez años y se ha observado en distintos tipos celulares, distintas especies de mamíferos e incluso *in vivo* (Kadhim *et al.*, 2004; Little, 2006). El efecto *bystander* provoca una serie de alteraciones que incluyen: estrés oxidativo, intercambio entre cromátidas hermanas, formación de micronúcleos, apoptosis, mutaciones, inestabilidad genómica y transformación celular *in vitro*. Aunque la mayoría de los estudios se ha centrado en los efectos genómicos, también se han descrito otros efectos como un incremento de la proliferación celular y la secreción de factores inhibidores del crecimiento (Wright y Coates, 2006). El efecto *bystander* se caracteriza por ser independiente del tipo de radiación, aunque numerosos estudios indican que, al igual que con la inestabilidad genómica, la radiación de alta LET es más efectiva que la de baja LET y que no hay una relación lineal dosis-respuesta (revisado por Barber y Dubrova, 2006). Además, los efectos se desencadenan con dosis bajas, menores de 5 mGy, y se saturan con dosis mayores (5 Gy). Al igual que la inestabilidad genómica, depende en gran parte de la capacidad de

reparación de la célula y también parece estar involucrada la formación de radicales libres (revisado por Kadhim *et al.*, 2004).

Un dato interesante es que el efecto *bystander* también desencadena una respuesta adaptativa. Las células expuestas a señales *bystander* son más resistentes a una irradiación posterior que las células no expuestas. Esto podría ser debido a la eliminación de subpoblaciones más sensibles a la radiación o a la secreción de proteínas protectoras. Por otro lado, también se considera un efecto protector la pérdida del potencial proliferativo y la muerte celular, que reducirían el riesgo de mutaciones. Por tanto, el efecto *bystander* podría ser beneficioso o perjudicial, y la consecuencia dependerá del tipo de señales producido y de la respuesta a dichas señales, lo que está influenciado por el tipo celular y el genotipo (Wright y Coates, 2006).

Hay dos tipos de estudios que han demostrado el efecto *bystander*. Por un lado, la transferencia de medio de cultivo de células irradiadas a células no irradiadas y, por otro, la respuesta celular a la irradiación con partículas  $\alpha$  cuando la mayor parte de las células no han sido irradiadas. Estos experimentos sugieren que la transmisión de señales de células irradiadas a no irradiadas sigue dos mecanismos (revisado por Kadhim *et al.*, 2004 y Wright y Coates, 2006):

1. comunicación entre células por medio de las uniones *gap*
2. liberación al medio de algún factor soluble.

En ambos casos se ha demostrado la implicación de radicales libres, puesto que los efectos desaparecen en presencia de compuestos que atrapan estos radicales (revisado por Kadhim *et al.*, 2004). También hay que tener en cuenta que hay numerosas similitudes entre los mecanismos responsables del efecto *bystander* y la inestabilidad genómica, al menos en el sistema hematopoyético. De hecho, el efecto *bystander* puede ser causa y consecuencia de la inestabilidad genómica, por lo que no se puede descartar una relación entre ambos procesos (Wright y Coates, 2006). Por tanto, junto

con los efectos directos de la radiación ionizante, los efectos indirectos pueden tener también importantes repercusiones a corto y largo plazo en el resultado final de la exposición.

#### 4.3.2.2 Inestabilidad transgeneracional

El descubrimiento de la inestabilidad genómica inducida por la radiación ha provocado un aumento de interés en los efectos de la exposición a largo plazo, incluyendo la transmisión de estos efectos a la descendencia, por lo que han surgido numerosos estudios encaminados a desentrañar si la inestabilidad genómica inducida por la radiación ionizante podría transmitirse a los descendientes a través de la línea germinal y afectar a su tasa de mutación, lo que se denomina **inestabilidad transgeneracional**.

La primera prueba del efecto transgeneracional de la radiación ionizante fue observada por Luning y colaboradores en 1976, que observaron una elevada tasa de mutaciones letales dominantes en la primera generación de ratones a los que se les había inyectado sales de plutonio. A partir de ahí, numerosos estudios, especialmente con ratones, han verificado que la irradiación parental puede dar lugar a alteraciones en la línea germinal que se transmiten a la descendencia (revisado por Barber y Dubrova, 2006). En poblaciones humanas, el análisis de los efectos de la radiación en la línea germinal es complicado, se puede llevar a cabo mediante el estudio de familias en las que los padres hayan estado expuestos ocupacional, accidentalmente o por tratamiento. En la mayoría de los casos de exposición ocupacional las dosis son demasiado bajas para inducir cambios detectables en la línea germinal y sería necesario un tamaño poblacional muy grande. Por otro lado, los pacientes que reciben radioterapia están expuestos a dosis elevadas, pero hay que tener en cuenta que la radioterapia normalmente se administra con quimioterapia, que también es mutagénica. En estos casos se conoce la dosis recibida, lo que posibilita establecer relaciones dosis-respuesta. Por último, las personas expuestas accidentalmente reciben dosis elevadas, aunque generalmente desconocidas, y son las más utilizadas en este tipo de estudios

(Dubrova, 2003a). En concreto, se han realizado estudios con descendientes de los supervivientes de Hiroshima y Nagasaki, descendientes de trabajadores de la limpieza de la central nuclear de Chernobyl y pacientes con cáncer expuestos a radioterapia, aunque en todos estos casos los resultados han sido negativos, debido quizá al pequeño tamaño de las poblaciones estudiadas (Dubrova, 2003b).

Actualmente, el análisis de la inestabilidad transgeneracional se suele llevar a cabo mediante el análisis de secuencias minisatélite o VNTR. Estas secuencias son repeticiones en tándem de unidades de 10-60 pares de bases cuya inestabilidad está casi completamente restringida a la línea germinal, siendo muy poco frecuente en las células somáticas. Las mutaciones en este tipo de *loci* son debidas a conversiones génicas complejas que se producen durante la recombinación, de tal forma que la tasa de mutación es muy elevada, 0,5%-13% por gameto, lo que hace que estos marcadores sean extremadamente útiles para la monitorización de mutaciones en la línea germinal. De hecho, mediante esta técnica se obtuvieron las primeras evidencias, en ratones, del incremento en la frecuencia de mutación en la línea germinal de machos expuestos, aunque hay que señalar que existen otros estudios con resultados negativos (Dubrova, 2003a). En los estudios con resultados positivos, se ha observado que el aumento de la frecuencia de mutación en minisatélites persiste durante, al menos, dos generaciones tras la irradiación de los machos; y que tanto las espermatidas como las espermatogonias son sensibles a la irradiación (revisado por Niwa, 2003).

El mecanismo responsable de la transmisión transgeneracional de la inestabilidad es desconocido, aunque se sugiere que estaría implicado algún factor transmitido por los machos irradiados a la prole a través del espermatozoide. Actualmente, hay datos que sostienen que el factor o señal que produce la desestabilización en la línea germinal y que causa un elevado número de alteraciones en la descendencia puede ser transmitido tanto por machos irradiados como por hembras no expuestas. Asimismo, la inestabilidad generada es similar en toda la descendencia, lo que indica que sigue un patrón

de herencia no mendeliano, y se postula que el factor responsable podría ser epigenético. Se piensa también que, al igual que en los casos anteriores, los radicales libres podrían tener un papel importante en este fenómeno, ya que son los responsables de gran parte de las lesiones del DNA de origen endógeno (roturas de simple y doble cadena, modificaciones de nucleótidos); asimismo, también se cree que la replicación es fundamental en este proceso (revisado por Barber y Dubrova, 2006).

Uno de los temas más controvertidos es si la inestabilidad transgeneracional contribuye de alguna manera a incrementar el riesgo de cáncer, lo que podría explicar el aumento de casos de leucemia en los niños residentes en las cercanías de la central nuclear de Sellafield (Reino Unido), y el incremento de tumores observado en ratones expuestos a distintos carcinógenos (revisado por Barber y Dubrova, 2006). En resumen, hasta la fecha se ha observado inestabilidad transgeneracional tanto *in vitro* como *in vivo* en distintos modelos, pero no se puede asegurar que también ocurra en los seres humanos, aunque es un riesgo que no habría que obviar.

## **5. Detección de los efectos de la radiación ionizante**

En la actualidad, uno de los objetivos de la radiobiología es el desarrollo y aplicación de ensayos que sean capaces de determinar las lesiones ocasionadas por la utilización de la radiación ionizante en las diversas actividades humanas. Junto con el perfeccionamiento de técnicas dosimétricas físicas en exposiciones ocupacionales, se han desarrollado también diversos métodos biológicos para la evaluación individual de las dosis de radiación absorbidas. Estos indicadores o dosímetros biológicos se basan en los distintos tipos de alteraciones inducidas por la radiación (Navarro *et al.*, 2003).

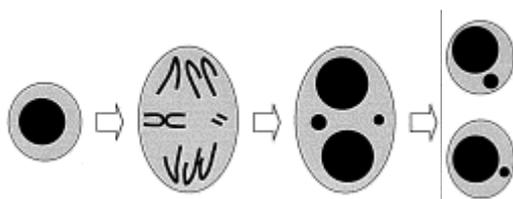
En general, los métodos más utilizados para detectar los efectos de la radiación ionizante y biomonitorizar poblaciones expuestas son los ensayos citogenéticos, incluyendo el análisis de aberraciones cromosómicas, FISH, el

intercambio entre cromátidas hermanas (SCE), el **ensayo de micronúcleos** (MN), y el **ensayo del cometa**. Hasta la fecha, el método más aceptado era el ensayo de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica. Sin embargo, este tipo de ensayo tiene una serie de limitaciones en cuanto a la evaluación de dosis en exposiciones crónicas debido a la vida corta de los linfocitos. Además, para este ensayo se requiere un número elevado de metafases, así como personal experimentado en su lectura, lo que justificó la búsqueda de métodos alternativos más rápidos, baratos y sensibles y con una resolución similar. En 1964, Fliedner y colaboradores describieron la primera inducción de micronúcleos tras una exposición a neutrones y rayos  $\gamma$ . Desde entonces, distintos autores han descrito la aparición de MN en diferentes situaciones normales y patológicas y se considera al ensayo de micronúcleos un indicador biológico en casos de exposiciones a radiaciones ionizantes, útil en los casos de exposición corporal parcial o total, sobreexposición accidental, e incluso en exposiciones de diagnóstico médico (revisado por Navarro *et al.*, 2003; Maluf, 2004).

Por otro lado, las alteraciones genéticas inducidas por la radiación ionizante más comunes son las roturas de bases y el daño oxidativo (Li *et al.*, 2001). Este tipo de daño puede ser detectado por el ensayo del cometa, que es capaz de detectar hasta un 95% del daño inducido por la radiación (Banath *et al.*, 1999). La sensibilidad de este ensayo para detectar el efecto de bajas dosis de radiación se ha demostrado *in vitro*, siendo la dosis mínima detectable de 5 cGy (revisado por Plappert *et al.*, 1997; García y Mandina, 2005). Además, se ha sugerido que es la técnica más apropiada en los casos de exposición crónica (García y Mandina, 2005). La mayor parte del daño inducido por la radiación y detectado por este ensayo es reparado en sólo dos horas (Singh *et al.*, 1990). Sin embargo, hay estudios que han detectado daño 10 años después de la exposición, tanto mediante el ensayo del cometa como analizando aberraciones cromosómicas, lo que sugiere la presencia de algún factor clastogénico que perpetúa el daño (Frenzilli *et al.*, 2001) y la utilidad del ensayo del cometa para detectar el daño inducido por estrés oxidativo en el DNA.

## 5.1 EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

El ensayo de micronúcleos es uno de los análisis citogenéticos más empleados en la biomonitorización de poblaciones expuestas a compuestos genotóxicos debido a su sencillez, fiabilidad, rapidez y sensibilidad. Los MN son fragmentos acéntricos de cromosomas o cromosomas completos incapaces de unirse al huso mitótico durante la división celular y que, por tanto, no se incorporan al núcleo celular (figura 8). Estos fragmentos se rodean de membrana celular y se visualizan en el citoplasma como núcleos de pequeño



**Figura 8.** Esquema de la formación de micronúcleos por la pérdida de un cromosoma completo o de un fragmento. (Adaptado de Fenech, 2000).

tamaño cercanos al núcleo principal. Por tanto, mediante este ensayo se puede detectar el efecto de los agentes genotóxicos que producen aneuploidía y clastogénesis. Como los MN se forman durante la división celular, para llevar a cabo este análisis es imprescindible que las células se dividan, para ello, o bien se parte de

líneas celulares o bien se analizan exclusivamente células binucleadas, lo que se consigue tras la inhibición de la citocinesis con citocalasina B (Fenech, 2000).

En 1976, Countryman y Heddle propusieron por primera vez el uso de este ensayo para detectar daño cromosómico en cultivos de linfocitos humanos. Más tarde, en 1985, el ensayo fue modificado y mejorado por Fenech y Morley, que desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN). Con esta nueva modificación, mediante la utilización de citocalasina B, que impide la citocinesis celular, consiguieron diferenciar las células divididas una sola vez (binucleadas) de las no divididas (mononucleadas), así como de las que se han dividido más de una vez (tri- o tetranucleadas). En 1999, el ensayo fue validado a nivel mundial gracias a un proyecto internacional (HUMN, <http://ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/>) dirigido por Michael Fenech y Stefano Bonassi. La finalidad de este proyecto era recopilar

## Introducción

---

las frecuencias basales de MN en humanos obtenidas en distintos laboratorios y poblaciones, identificar los agentes capaces de influir en dicha frecuencia basal, y comparar las distintas técnicas utilizadas para establecer un protocolo estándar. De tal forma que, en la actualidad, se han establecido una serie de criterios estándar para la selección de las células binucleadas y de los micronúcleos, y poder así comparar los resultados obtenidos en distintos laboratorios. Resumimos algunos de los criterios en la tabla 4 (revisado por Zalacaín *et al.*, 2005).

<b>Criterios para células binucleadas</b>	<b>Criterios para micronúcleos</b>
El citoplasma debe distinguirse con claridad	Diámetro entre 1/3 y 1/6 del diámetro del núcleo principal
Membranas citoplasmática y nuclear intactas	No refractarios
Núcleos con el mismo grado de condensación de la cromatina	Intensidad de tinción similar a los núcleos principales o superior
Igual tamaño, forma (ovalada) y tinción	Forma similar a los núcleos principales
Pueden tocarse pero no solaparse	No conectados con ninguno de los núcleos principales
Pueden estar unidos por puentes nucleoplasmáticos	Pueden tocar los núcleos de la célula pero no solaparse con ellos
Ningún núcleo debe encontrarse en apoptosis	

**Tabla 4.** Criterios de selección de células binucleadas y micronúcleos en cultivos humanos definidos por el HUMN (Zalacaín *et al.*, 2005).

En individuos sanos, la frecuencia basal de micronúcleos depende de distintos factores endógenos y ambientales como la edad, el sexo y el estilo de vida (Ballardin *et al.*, 2002). El efecto de la edad ha sido ampliamente estudiado, relacionándose mayor edad con mayor frecuencia de MN. Por otro lado, las mujeres presentan una frecuencia basal superior a la de los hombres, y dicha frecuencia se incrementa cuando se superan los 35 años de edad (Maluf, 2004; revisado por Zalacaín *et al.*).

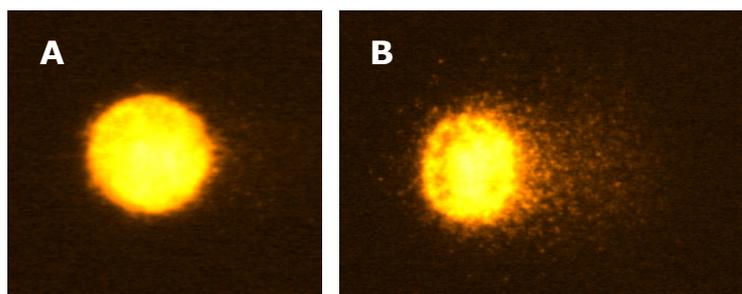
## 5.2 EL ENSAYO DEL COMETA O ELECTROFORESIS DE CÉLULAS INDIVIDUALES EN GELES DE AGAROSA (SCGE)

En los últimos años el ensayo del cometa ha demostrado ser una técnica muy útil para la biomonitorización de poblaciones humanas (Lee *et al.*, 2004), y se ha empleado para analizar poblaciones expuestas crónicamente a dosis bajas de radiación, individuos expuestos a radón y niños residentes en áreas afectadas por el accidente de Chernobyl (García y Mandina, 2005). Comparado con otras técnicas citogenéticas que requieren células en proliferación, normalmente linfocitos, el ensayo del cometa tiene una serie de ventajas demostradas (Tice *et al.*, 2000):

- ✓ Rapidez, sencillez y bajo coste.
- ✓ Requiere un número pequeño de células y concentraciones relativamente bajas del compuesto que se analiza.
- ✓ Puede realizarse con células en proliferación o en reposo, de distintos tejidos; en concreto, aquellos que están en contacto directo con mutágenos (ej. células de las mucosas oral y nasal).
- ✓ Sensibilidad, detección de daño a muy bajo nivel.
- ✓ Flexibilidad, el ensayo puede ser modificado para detectar distintos tipos de daño.

El ensayo se basa en la aplicación de la electroforesis para la visualización, en células individuales, de roturas de DNA (Fairbairn *et al.*, 1995). Las células con daño en el DNA presentan una apariencia similar a la de un cometa, con una cabeza muy brillante (núcleo celular) y una cola (fragmentos de DNA) cuya longitud e intensidad varían en función del daño. Por el contrario, las células sin daño se observan como núcleos intactos, cabezas sin cola (figura 9).

La primera versión de este ensayo fue desarrollada en 1978 por Rydberg y Johansson y modificada por Östling y Johansson en 1984 para aumentar la sensibilidad. En 1988, Singh y colaboradores desarrollaron una



**Figura 9.** imágenes del ensayo del cometa. A-célula sin daño. B-célula dañada con apariencia de cometa.

versión alcalina capaz de detectar un espectro de lesiones más amplio que la versión neutra anterior (revisado por Tice *et al.*, 2000). En concreto, el ensayo del cometa a pH neutro permite la visualización

de roturas de DNA de doble cadena, y a pH alcalino, de roturas de simple y doble cadena y sitios álcali-lábiles (Maluf, 2004). De hecho, en general se recomienda la versión alcalina del ensayo porque detecta más alteraciones y es más sensible (Singh *et al.*, 1988). Esta versión, utilizada en nuestro estudio, consta de varios pasos:

1. incorporación de las células a un gel de agarosa y gelificación en un portaobjetos.
2. lisis celular con una solución con detergentes y sales.
3. incubación y electroforesis desnaturalizantes en condiciones alcalinas.
4. neutralización
5. tinción del DNA con una sustancia fluorescente y visualización en un microscopio de fluorescencia.

El mecanismo de formación de la cola del cometa no está del todo claro. Se cree que el DNA está organizado en grandes estructuras superenrolladas que cuando sufren roturas de cadena se relajan, de tal forma que, mediante la electroforesis, se extienden dando lugar a la «cola» del cometa (Maluf, 2004).

Por otro lado, las roturas de DNA de cadena sencilla pueden ser resultado de la acción directa de agentes genotóxicos o bien ser sitiosapurínicos o apirimidínicos, que son alcali-lábiles y se observan como roturas; o incluso ser intermediarios de la reparación celular por escisión de bases o de

nucleótidos. Para detectar el origen específico de estas roturas se varían las condiciones de desnaturalización. Asimismo, para hacer el ensayo más específico y sensible, se introduce un paso más que consiste en la digestión del DNA con enzimas que reconocen bases modificadas y las eliminan, creando roturas. En concreto, la endonucleasa III (EndoIII) reconoce pirimidinas oxidadas y la formamidopirimidina DNA glicosilasa (Fpg) reconoce la 8-oxoguanina, producto mayoritario de la oxidación de purinas, así como otras purinas alteradas (revisado por Collins, 2004). El uso de estas enzimas en el ensayo del cometa nos permite ampliar el espectro de lesiones detectables, incluyendo el daño oxidativo (Albertini *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000).



## II. OBJETIVOS

## **II. OBJETIVOS**

El presente trabajo pretende estudiar la susceptibilidad genética al cáncer de tiroides. Asimismo, también se pretende investigar el posible efecto indirecto, a largo plazo, del tratamiento terapéutico con  $^{131}\text{I}$  en pacientes con cáncer de tiroides y sus descendientes. Para ello nos propusimos los siguientes objetivos:

- Determinar la implicación del receptor  $\alpha 1$  de la hormona tiroidea en la susceptibilidad al cáncer de tiroides, analizando el microsatélite THRA1, ubicado en el gen *NR1A1a*, en una población española formada por pacientes con cáncer de tiroides y por individuos sanos.
- Determinar la posible asociación del gen 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (*HSD3 $\beta$ 1*) con la susceptibilidad al cáncer de tiroides y/o la implicación de la región 1p13, mediante el análisis del microsatélite BAT-40 en una población española formada por pacientes con cáncer de tiroides y por individuos sanos.
- Analizar polimorfismos de la región 1p12-13 con el fin de delimitar e identificar factores genéticos de susceptibilidad al cáncer de tiroides en esta región del cromosoma 1.
- Determinar, mediante los ensayos de micronúcleos y del cometa, el daño genómico en distintas generaciones de líneas celulares linfoblastoides de los miembros de dos familias en las que uno de los padres fue tratado con  $^{131}\text{I}$  y con descendientes concebidos antes y después del tratamiento.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Población analizada y extracción de DNA

Para este trabajo se obtuvieron muestras de sangre de una población española formada por 202 individuos sanos (controles) que participaron de forma voluntaria, y 227 individuos con cáncer de tiroides (pacientes) provenientes del Servicio de Medicina Nuclear del hospital Vall d'Hebron (Barcelona), y no relacionados entre sí. En ambos casos se obtuvo el consentimiento informado de los individuos y, mediante una encuesta, se recogieron los datos necesarios para el estudio (anexo 1). Asimismo, se obtuvo la aprobación de los Comités Éticos correspondientes. Las características de ambos grupos se muestran en la tabla 5

	<b>CONTROLES</b> (n=202)	<b>PACIENTES</b> (n=227)	<b>P</b>
<b>Sexo</b>			
Mujer	117 (57,9%)	167 (73,1%)	0,001
Hombre	85 (42,1%)	60 (26,9%)	
<b>Edad media</b>	41,22±13,20	43,50±14,6	0,28
<b>Tipo de cáncer</b>			
Papilar	—	171 (79,2%)	-
Folicular		39 (18,1%)	
Otros		6 (2,8%)	
ND		11	
<b>Antec. de cáncer</b>			
Sí	116 (58%)	160 (72,1%)	0,003
No	84 (42%)	62 (27,9%)	
ND	2	5	
<b>Alcohol</b>			
Sí	65 (32,2%)	42 (19,4%)	0,003
No	137 (67,8%)	174 (80,6%)	
ND		11	
<b>Tabaco</b>			
Sí	65 (32,5%)	49 (22,7%)	0,03
No	135 (67,5%)	167 (77,3%)	
ND	2	11	
<b>Café</b>			
Sí	155 (77,5%)	153 (70,8%)	0,15
No	45 (22,5%)	63 (29,2%)	
ND	2	11	

**Tabla 5.** Características de la población de controles y pacientes. El valor de p se corresponde con el test  $\chi^2$  excepto para la variable edad, en la que se aplicó el test de Mann-Whitney.

En nuestro estudio, consideramos bebedores a los consumidores de más de 50g de alcohol a la semana. Asimismo, aunque para el consumo de tabaco se clasificó a los individuos en tres categorías (fumadores, no fumadores y exfumadores), para simplificar el análisis agrupamos a los exfumadores en alguno de los otros dos grupos considerando los años que llevaban sin fumar; así, aquellos individuos que llevaban al menos un año sin fumar se consideraron no fumadores. Comparamos la variable edad entre ambas poblaciones mediante una U de Mann Whitney (ya que no sigue una distribución normal, según el test de Kolmogorov-Smirnov) y el resto de variables mediante una  $\chi^2$ . Excepto el consumo de café y la edad ( $p=0,15$  y  $0,28$ , respectivamente), el resto de variables presenta diferencias estadísticamente significativas entre controles y pacientes. En la población de pacientes encontramos un 73,1% de mujeres respecto al 57,9% en controles ( $p=0,001$ ), debido a que el cáncer de tiroides es más frecuente en mujeres que en hombres. En cuanto al consumo de alcohol y de tabaco, las frecuencias son mayores en el grupo de controles ( $p=0,003$  y  $0,03$ , respectivamente). Como es lógico, los pacientes suelen controlar más el consumo de estas sustancias. Asimismo, la frecuencia de antecedentes familiares de cáncer es mayor en el grupo de pacientes ( $p=0,003$ ). Hay que señalar que en todos los polimorfismos analizamos la distribución de genotipos por sexos para comprobar que no había diferencias y, por tanto, que las distintas proporciones entre poblaciones no influirían en los resultados (ver Resultados). Asimismo, los análisis de regresión logística los realizamos ajustando para las variables sexo, edad, alcohol y tabaco y no observamos ninguna variación respecto al análisis básico. Por tanto, consideramos que las diferencias observadas entre controles y pacientes no influyen en nuestros resultados.

El DNA se extrajo a partir de linfocitos de sangre periférica (9 mL de cada individuo) mediante el método de extracción estándar fenol-cloroformo. Posteriormente, se disolvió en 30-100  $\mu$ L de TE (Tris 10mM/EDTA 0,2mM pH 7,5) y se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## 2. Análisis de los microsatélites THRA1 y BAT-40

En este estudio se utilizaron los microsatélites BAT-40 y THRA1 para genotipar parte de la población especificada en el apartado anterior (puesto que era la población de que se disponía en el momento del análisis de cada marcador). En concreto, se analizaron 138 controles y 207 pacientes para BAT-40 y 141 controles y 212 pacientes para THRA1. En la tabla 6 se muestra la proporción de sexos y la edad media de los grupos analizados (el resto de porcentajes son similares a los de la población total).

	BAT-40			THRA1		
	Controles (n=138)	Pacientes (n=207)	P	Controles (n=141)	Pacientes (n=212)	P
<b>Edad media</b>	38,2±10,2	40,2±7,8	0,002	37,7±10,8	44,4±14,6	0,001
<b>Sexo</b>						
Mujer	70 (50,7%)	152 (73,4%)	0,001	67 (47,5%)	157 (74,1%)	0,001
Hombre	68 (49,3%)	55 (26,6%)		74 (52,5%)	55 (25,9%)	

**Tabla 6.** Características de los grupos genotipados para los microsatélites BAT40 y THRA1.

Ambos microsatélites se analizaron mediante PCR utilizando un termociclador PT-100 (MJ Research, Waltham, MA). Las reacciones, con un volumen final de 30 µL, se prepararon añadiendo: 100 ng de DNA, tampón de PCR 1X (10 mmol/L Tris-HCl pH=8,4, 50 mmol/L KCl, 0,01% gelatina), 2,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mmol/L de cada nucleótido y 0,1 mmol/L de cada cebador. Se añadieron 2,5 unidades de *Taq* polimerasa en el caso de THRA1 y 0,75 unidades para el microsatélite BAT-40. Los cebadores y condiciones de amplificación empleados para analizar cada microsatélite se indican en la tabla 7.

El producto de amplificación de THRA1 se marcó con 2,4 µCi de [ $\alpha$ <sup>33</sup>-P]dCTP (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) y, tras el análisis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6% (2,5 horas a 100W), la visualización se realizó en autorradiografías (figura 10), empleando un marcador de peso molecular de 30-330pb (Invitrogen, Carlsbad, CA)

## Materiales y Métodos

marcado con [ $\gamma^{33}$ -P]dATP (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido).

Microsatélite	Cebadores	Condiciones
<b>THRA1</b>	F 5'-CTTAAGCAGTGGGAACCTG-3' R 5'-ATAGCATTGCCTTCCCATGT-3'	94°C 3min
		94°C 40seg } 30 ciclos
		54°C 40seg }
		72°C 40seg }
		72°C 5min
4°C $\infty$		
<b>BAT-40</b>	F 5'-AATAACTTCCTACACCACAAC-3'* R 5'-GTAGAGCAAGACCACCTT-3'	95°C 5min
		95°C 30seg } 35 ciclos
		55°C 45seg }
		72°C 1min }
		72°C 5min
4°C $\infty$		

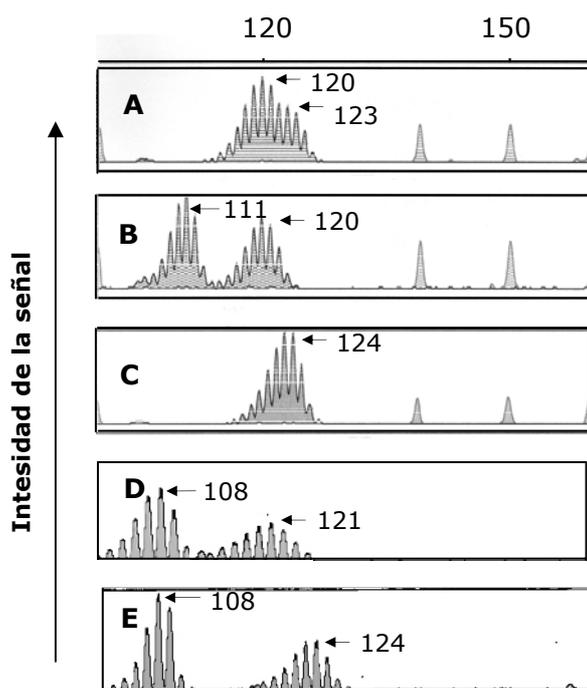
**Tabla 7.** Cebadores y condiciones de amplificación por PCR empleados para genotipar los microsatélites THRA1 y BAT-40 en la población estudiada. Se señala con un asterisco el cebador marcado con fluorescencia.



**Figura 10.** Detección por autorradiografía del producto de PCR de THRA1. Los individuos 1 y 3 son homocigotos (132/132 pb), mientras que los individuos 2, 4, 5 y 6 son heterocigotos (132/128 y 136/132 pb, respectivamente).

El patrón de bandas observado en la figura 10 es típico de la amplificación de microsatélites, donde se detectan varias bandas debido al deslizamiento de la DNA polimerasa durante la replicación de estas secuencias. Según la secuencia del gen *NR1A1a* (nº de acceso en GenBank 7067), el producto de amplificación estándar, de 128 pb, se corresponde con 18 repeticiones CA.

Por otro lado, el producto de amplificación del microsatélite BAT-40 se analizó mediante los sistemas de visualización ABI310 y ABI3100 (*Applied Biosystems Automated Genetic Analysers*), usando el programa Genescan (figura 11). Para ello se marcó uno de los cebadores (señalado en la tabla 7 con un asterisco) con el compuesto fluorescente 4,7,2',4',5',7'-hexa-cloro-6-carboxyfluoresceina.



**Figura 11.** Electroferogramas del microsatélite BAT-40. El individuo C es homocigoto (124/124 pb) y los restantes (A, B, D, E) heterocigotos. En cada caso se indica el tamaño de los alelos.

El producto de PCR de este microsatélite, de 126pb, se corresponde con la repetición estándar de 40A (según la secuencia del gen *HSD3B1*, nº de acceso en GenBank M38180). Al igual que en el caso anterior, en la figura 11 se observa, en cada muestra, un patrón de picos correspondiente a los distintos tamaños de banda debidos al deslizamiento de la polimerasa durante la replicación. En este caso, el pico con mayor área se considera como el más representado e indica el tamaño de la secuencia analizada.

Para cada uno de los marcadores se compararon las distribuciones alélicas y genotípicas de pacientes y controles mediante los tests de Mann-Whitney y  $\chi^2$ , utilizando el programa estadístico Minitab (versión 13). Por otro lado, los alelos se agruparon en intervalos y se analizaron mediante el test de Fisher. Se calcularon también las *odds ratios* de los genotipos. Estos dos últimos análisis se realizaron con el programa SPSS versión 11.5 (SPSS, Inc., Chicago, IL). En todos los casos el nivel de significación fue del 95%.

**3. Análisis de polimorfismos de la región 1p12-13**

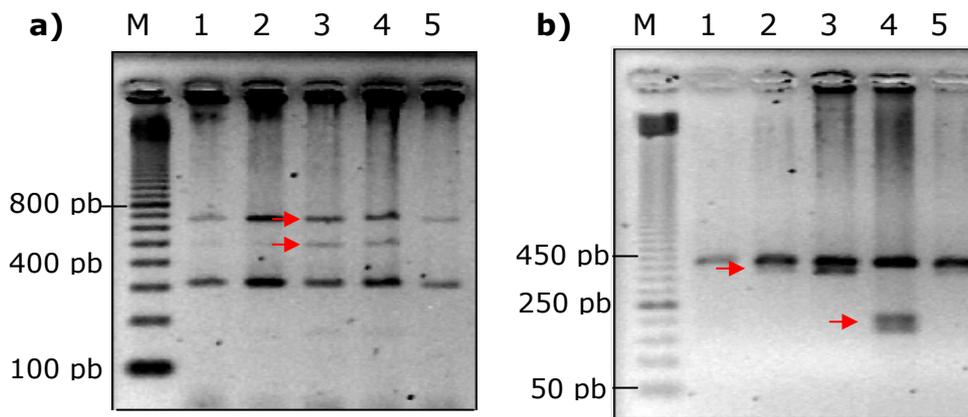
Se emplearon seis polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs): rs4659200, rs3765945, rs2145418, rs7515409, rs4658973 y rs1241, para genotipar, mediante PCR dúplex, la población de controles y pacientes especificada en el apartado 1. Los polimorfismos rs7515409 y rs4658973 se genotiparon en la población completa (202 controles y 227 pacientes), mientras que los restantes SNPs: rs4659200, rs3765945, rs2145418 y rs1241 se analizaron en 136 controles y 201 pacientes pertenecientes a la misma población (coincidiendo con la población analizada para el microsatélite BAT-40). En la tabla 8 se muestran la edad media y el sexo de esta última población (al igual que en los casos anteriores los porcentajes del resto de las variables son similares a los de la población total).

	<b>Controles</b> (n=136)	<b>Pacientes</b> (n=201)	<b>P</b>
<b>Edad media</b>	37,3±10,9	42,7±14,4	0,004
<b>Sexo</b>			
Mujer	66 (48,5%)	148 (73,6%)	0,001
Hombre	70 (51,5%)	53 (26,4%)	

**Tabla 8.** Características de los grupos genotipados para los SNPs rs4659200, rs3765945, rs2145418 y rs1241.

En este caso, la amplificación por PCR se realizó en un termociclador iCycler™ (Bio-Rad Laboratories Inc, EEUU) y consistió en un paso inicial de desnaturalización de 4 min a 94°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 40 seg a 54°C y 1 min a 72°C; y un paso final de 4 min a 72°C. Las reacciones, con un volumen final de 25 µL, se prepararon añadiendo: 100 ng de DNA, tampón de PCR 1X (10 mmol/L Tris-HCl pH=8,4, 50 mmol/L KCl, 0,01% gelatina), 1,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mmol/L de cada nucleótido, 0,2 mmol/L de cada cebador y 1 unidad de *Taq* polimerasa. Se realizaron tres tipos de PCR dúplex mediante las cuales se amplificaron conjuntamente: (1) rs2145418 y rs3765945, (2)

rs1241 y rs4659200, (3) rs4658973 y rs7515409. A continuación, los productos de la PCR se digirieron con las enzimas de restricción específicas de cada SNP y se visualizaron, mediante bromuro de etidio, en geles de agarosa al 2,5% (figura 12). En cada batería de 10-20 digestiones se utilizó como control positivo una muestra homocigota para el alelo reconocido por la enzima de restricción.



**Figura 12.** Representación de los RFLPs visualizados en geles de agarosa. En ambos casos el primer carril se corresponde con el marcador de tamaño. a) Gel de agarosa de los marcadores rs2145418 y rs3765945. Se usó un marcador de 100 pb. Las flechas indican el producto sin digerir de rs2145418 (657 pb) y uno de los fragmentos resultantes de la digestión con *AcsI* (489 pb). La banda inferior (315 pb) es el producto del marcador rs3765945. Como ejemplos, el carril 3 se corresponde con un individuo heterocigoto (T/G) y el carril 5 con uno homocigoto (G/G). b) Gel de agarosa de los marcadores rs4659200 y rs1241. Se empleó un marcador de 50 pb. Las flechas indican el producto de amplificación de rs4659200 sin digerir (374 pb) y los fragmentos resultantes de la digestión con *AfIII* (173 y 201 pb), la banda superior se corresponde con el producto de amplificación de rs1241 (415 pb). Como ejemplos, el carril 2 se corresponde con un individuo homocigoto (G/G) y el 4 con un individuo homocigoto (T/T).

En la tabla 9 se indican los cebadores empleados para amplificar cada uno de los polimorfismos, el tamaño de los productos de PCR, las enzimas de restricción empleadas junto con el alelo que reconocen, y los fragmentos de restricción generados.

SNP	Cebadores	Tamaño producto PCR (pb)	Enzimas restricción y alelos	Fragmentos restricción (pb)
<b>rs2145418</b>	F 5'-GAATGGCTGGTGAGGAAT-3' R 5'-TGTTCAATGCAGCACTATTC-3'	657	<i>AcsI</i> (T)	168+489
<b>rs3765945</b>	F 5'-CAATACCTCTAGGCTGAGCA-3' R 5'-CAAAACAATTCCTGCCTC-3'	315	<i>SapI</i> (C)	153+162
<b>rs1241</b>	F 5'-AGCCACACTGGTAATTGATA-3' R 5'-TTACAACCTGGAGATAGCTG-3'	415	<i>NlaIII</i> (C)	170+245
<b>rs4659200</b>	F 5'-TGATTCCAGCCTCTCATTAG-3' R 5'-GTGTTACAGCCAATGGAGTG-3'	374	<i>AflIII</i> (T)	173+201
<b>rs4658973</b>	F 5'-GGGACACTTGAGACCAAAAG-3' R 5'-TCAAATGGGATTACAAACCT-3'	341	<i>TaqI</i> (G)	142+199
<b>rs7515409</b>	F 5'-GGCTGATTAGCTCCAAGTTC-3' R 5'-GCATACTCCTCAGTGGCAGT-3'	536	<i>BsrI</i> (T)	240+297

**Tabla 9.** Se indican los cebadores empleados, tamaño del producto de PCR en pares de bases, enzimas de restricción utilizadas y alelo reconocido, y fragmentos de restricción de los distintos SNPs analizados.

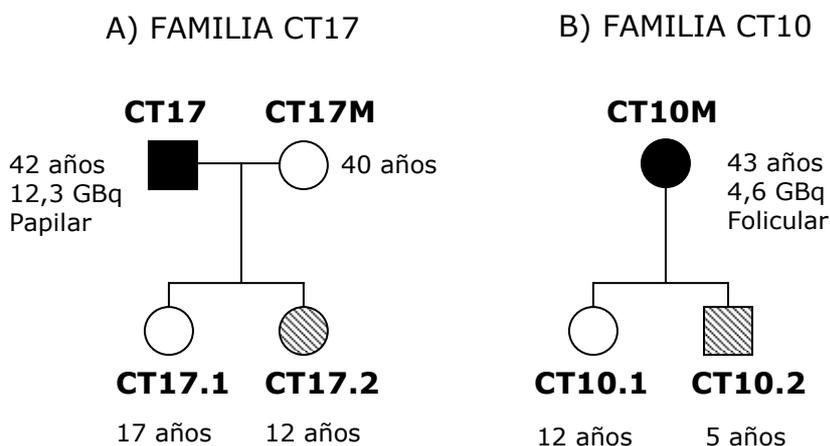
Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes y controles y se compararon estas últimas mediante un test  $\chi^2$ , con una significación del 95%. El equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó en la población de controles como representación de la población general y, en caso de desviación (rs1241 y rs2145418), las frecuencias alélicas se compararon mediante el test de tendencia de Armitage. Asimismo, se estimó la asociación entre cáncer de tiroides y los distintos genotipos mediante *odds ratios* con intervalos de confianza del 95%, calculados mediante regresión logística y ajustados a la edad, sexo y consumo de alcohol y tabaco. Los modelos de herencia se establecieron mediante un test de la razón de verosimilitudes.

El desequilibrio de ligamiento (DL) entre los marcadores se expresó como  $D'$ , que representa la desviación de las frecuencias haplotípicas observadas respecto a las esperadas y toma valores de 0 (no DL) a 1 (DL completo).

Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa SNP.stats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/>) (Solé *et al.*, 2006).

#### 4. Establecimiento de líneas celulares linfoblastoides (LBCLs)

Se establecieron LBCLs, mediante transformación con el virus de Epstein-Barr (EBV), a partir de muestras de sangre periférica (5 mL en tubos con heparina) de siete individuos pertenecientes a dos familias distintas: CT17 y CT10, en las que uno de los padres fue tratado con  $^{131}\text{I}$ . En la figura 13 se detallan las características de las dos familias estudiadas.



**Figura 13.** Representación de las dos familias analizadas en el estudio. Se indican el sexo, edad, dosis de tratamiento y tipo de cáncer. Las figuras en negro representan el paciente con cáncer de tiroides tratado con  $^{131}\text{I}$ , las figuras rayadas representan los hijos concebidos después del tratamiento, y las figuras en blanco denotan los hijos nacidos antes del tratamiento y el cónyuge no tratado.

Al padre de la familia CT17 y a la madre de la familia CT10 se les diagnosticó cáncer de tiroides (papilar y folicular, respectivamente) y, tras la ablación de la glándula, fueron tratados con  $^{131}\text{I}$ . El padre (CT17) recibió una dosis total fraccionada de 12,3 GBq y la madre (CT10) una dosis única de 4,6 GBq, 17 y 7 años antes de la obtención de la muestra de sangre, respectivamente. Ambas familias tenían dos hijos, el primero concebido antes

del tratamiento con  $^{131}\text{I}$  y el segundo después del tratamiento. En el caso de la familia CT10, no se pudo obtener la muestra del padre. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los individuos mediante la encuesta mencionada anteriormente, así como la aprobación de los Comités Éticos correspondientes.

Para la obtención de las LBCLs, a cada muestra de sangre se le añadió el mismo volumen de PBS 1X (5 mL). A continuación se goteó esta mezcla en un nuevo tubo con el mismo volumen de solución de aislamiento de linfocitos (Rafer SL, España) y se centrifugó 30 min a 2100 rpm. De este modo se obtienen cuatro fases de las que recuperamos la segunda, de color blanquecino, formada por los linfocitos, con una pipeta Pasteur. Los linfocitos obtenidos se lavan con PBS 1X, se decanta el sobrenadante y se procede a la transformación con EBV. Para ello se diluyen los linfocitos en 1 mL de medio RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) suplementado con un 20% de suero fetal bovino (FBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fitohemaglutinina (PHA) (Gibco, BRL, Grand Island, EEUU), 1% de penicilina (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) y 1 mL de virus Epstein Barr y se incuban a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad, en recipientes de 75  $\text{cm}^2$ . A medida que las células van creciendo y se duplica la población, se añade medio RPMI con 20% de FBS y penicilina. Se considera que el 100% de las células se ha transformado cuando el crecimiento se mantiene durante al menos trece días.

Cuando el cultivo transformado alcanzó una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL, se establecieron dos cultivos paralelos (réplicas) que se mantuvieron a lo largo del tiempo. Para cada LBCL se partió de una concentración inicial de  $1 \times 10^5$  células/mL y se dejó crecer hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL (pasaje 1, P1). El mismo procedimiento se llevó a cabo para cada réplica hasta llevar a cabo 10 pasajes. En cada pasaje se calculó el número de divisiones celulares mediante la siguiente fórmula:  $\log(\text{Ci}/\text{Cf})/\log 2$ , donde Ci=número de células inicial, y Cf=número de células final. En los pasajes P0, P2, P5 y P10, correspondientes a 0, 6, 16 y 28

divisiones celulares, después de establecer el siguiente pasaje, el cultivo se dividió en tres alícuotas, empleadas para la extracción de DNA y los ensayos de micronúcleos y del cometa.

## **5. Ensayo de micronúcleos**

Para el análisis de MN en las distintas LBCLs se centrifugaron 2 mL de cultivo celular ( $2 \times 10^6$  células) durante ocho minutos a 800 rpm. A continuación se aplicó un tratamiento hipotónico (5 mL de KCl 0,075M a 4°C) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se añadieron 5 mL de una solución de fijación (3:1 metanol/ácido acético) y se centrifugó de nuevo. Este paso se repitió tres veces. La suspensión celular resultante se goteó en portaobjetos limpios, secados al aire, que se tiñeron con Giemsa al 10% (Merck, Darmstadt, Alemania) en tampón fosfato (pH 6,8) durante 15 min. Para cada muestra se realizaron dos preparaciones y se contabilizaron 1000 células mononucleadas (500 en cada preparación), con el citoplasma perfectamente preservado.

Hay que tener en cuenta que, a diferencia del análisis de MN en linfocitos de sangre periférica, que requiere la adición de citocalasina B y en el que se contabilizan células binucleadas; al emplear líneas celulares, que se están dividiendo continuamente, no es necesario el uso de citocalasina y se contabilizan células mononucleadas.

## **6. Ensayo del cometa**

En este caso se llevó a cabo la versión alcalina del ensayo, descrita por Singh y colaboradores en 1988, que detecta roturas de simple y doble cadena y sitios álcali-lábiles; así como una modificación del ensayo para detectar el daño oxidativo (purinas y pirimidinas oxidadas) mediante la digestión enzimática con *EndoIII* y *Fpg* (Sigma-Aldrich). De este modo, para cada uno de los pasajes seleccionados (P0, P2, P5 y P10) se establecieron seis

portaobjetos para cada LBCL, correspondientes al ensayo estándar, a la digestión con *EndoIII*, a la digestión con *Fpg* y a sus réplicas. Estas réplicas fueron procesadas paralelamente en distintos tanques de electroforesis. El procedimiento seguido para el análisis de cada muestra es el siguiente: cada portaobjetos se cubre con 150  $\mu$ L de agarosa NMA (*Normal Melting Agarose*) al 0,5% disuelta en agua bidestilada, y se seca a 65°C. A continuación, se resuspenden las alícuotas de 20  $\mu$ L de cultivo (40.000 células) en 75  $\mu$ L de agarosa LMA (*Low Melting Agarose*) al 0,5%, se pipetea en los portaobjetos anteriormente preparados y se cubren con cubreobjetos de 24mm×60mm. Se dejan solidificar a 4°C y se retira el cubreobjetos. Posteriormente, los portaobjetos se sumergen en tampón de lisis (2,5M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Tritón X-100, 1% Sarcocinato sódico, pH 10) y se mantienen durante 2h a 4°C en oscuridad. A partir de este punto, todo el proceso se realiza en oscuridad para evitar el daño adicional que podría producir la luz. Tras la lisis, los portas se lavan tres veces con el tampón de reacción de las enzimas (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5) y se incuban con 60  $\mu$ L de tampón de reacción y 85 ng de *EndoIII* o *Fpg*, o sin enzima, 30 min a 37°C en una caja cerrada con papel húmedo. Después del tratamiento enzimático, los portas se disponen en una tanque de electroforesis con tampón de desnaturalización (1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH, pH 13,5) durante 40 min y, a continuación, se lleva a cabo la electroforesis (0,73 V/cm, 300 mA) en el mismo tampón durante otros 20 min a 4°C. Estos dos procesos se realizan en un baño de hielo para mantener dicha temperatura. Por último, se lavan los portas dos veces con tampón de neutralización (0,4M Tris, pH 7,5) durante 5 min, y se fijan con 3 mL de etanol absoluto durante 3 min. Una vez secos los portas y justo antes del análisis, se tiñen con 50  $\mu$ L de bromuro de etidio (0,4  $\mu$ g/mL).

La visualización se llevó a cabo en un microscopio de fluorescencia Olympus BX50 a 400x equipado con un filtro de excitación de banda de 480-550nm y un filtro de barrera de 590nm, y conectado con el programa *Komet 3.1 Image Analysis System (Kinetic Imaging, Liverpool, Reino Unido)*. Para cada réplica se contaron 50 células, por tanto, se analizaron 100 células por

muestra. Siguiendo recomendaciones de la bibliografía (Lee *et al.*, 2004), empleamos como medida del daño el OTM (*Olive Tail Moment*), que se define como el producto de la longitud de la cola y la fracción total de DNA en la cola. De este modo, esta medida es capaz de detectar el fragmento más pequeño de DNA migrado (reflejado en la longitud de la cola) y el número de fragmentos relajados o rotos (representado por la intensidad del DNA en la cola).

Se calculó la media y la desviación estándar del OTM de cada réplica. El daño detectado con la versión estándar, sin enzimas, se denominó daño basal (DB). El daño oxidativo detectado por cada enzima se calculó restando el daño basal al daño total detectado por la enzima, y denominamos daño oxidativo total (DO) a la suma del daño oxidativo detectado por cada enzima. Por último, el daño total (DT) se estimó como la suma de los daños basal y oxidativo. De este modo:

$$DO = (\text{daño } Endo III - DB) + (\text{daño } Fpg - DB)$$

$$DT = DB + DO$$

Tanto para el análisis de micronúcleos como para el del cometa, se comprobó la normalidad de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov (SPSS versión 12,5; SPSS, Inc., Chicago, IL). A continuación, se realizaron múltiples comparaciones entre los distintos individuos para determinar la significación de los datos mediante un modelo lineal general (GLM) aplicado a la transformación de los datos  $x' = \log(x)$ , con un intervalo de confianza del 95%. Para este último análisis se empleó el programa estadístico SAS/PC TM v8.0 (SAS Institute, Cary, NC, EEUU).



### **III. RESULTADOS**

#### **1. Susceptibilidad genética al cáncer de tiroides**

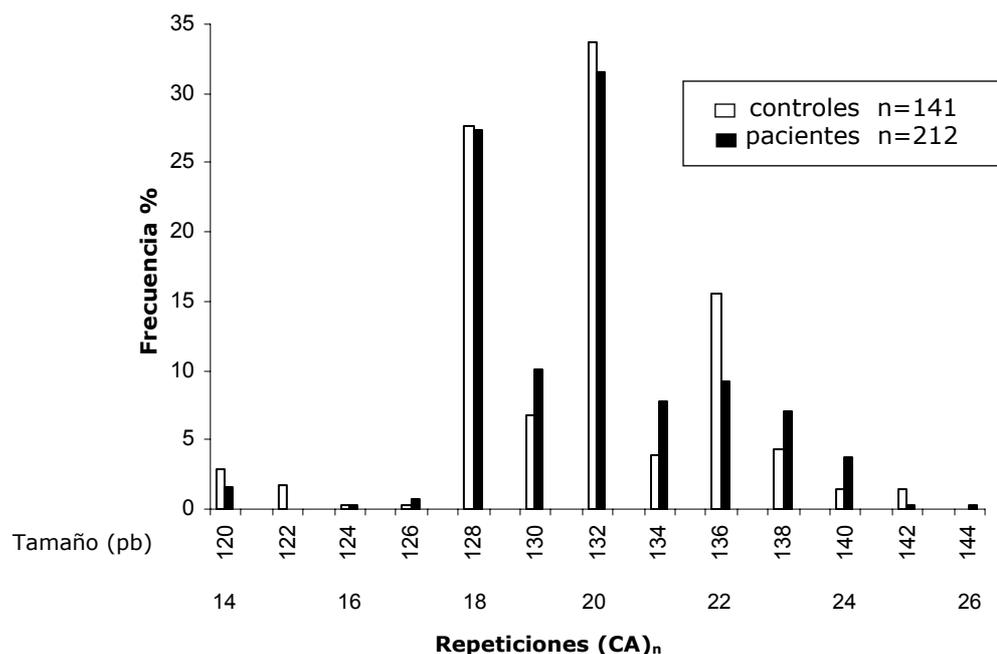
En nuestro estudio hemos genotipado una serie de polimorfismos, tanto microsatélites como SNPs, en una población de pacientes con cáncer de tiroides y de individuos sanos, con el objetivo de establecer la posible asociación entre la susceptibilidad al cáncer de tiroides y dos regiones genómicas diferentes. Por un lado, el gen codificante del receptor  $\alpha 1$  de la hormona tiroidea (*NR1A1a*, también conocido como *c-erbA* y ubicado en la región 17q11.2), y por otro, la región p12-13 del cromosoma 1. Parte de estos resultados, en concreto los referentes al análisis de los microsatélites THRA1 y BAT-40 han sido publicados (ver anexo 2).

##### **1.1 ANÁLISIS DEL MICROSATÉLITE THRA1**

El microsatélite THRA1 es una repetición de tipo (CA)<sub>n</sub>, localizado en una región no codificante del exón 9 del gen *NR1A1a* (receptor  $\alpha 1$  de la hormona tiroidea). Este microsatélite se analizó mediante PCR en una población española de 141 controles y 212 pacientes con cáncer de tiroides (ver Materiales y Métodos). En la tabla 10 se muestran las frecuencias genotípicas encontradas en los grupos de controles y pacientes, con una heterocigosidad del 70,9% y 71,2%, respectivamente. Los alelos observados en nuestra población tienen un rango de variación de 120-144 pb (producto de PCR), que, teniendo en cuenta la secuencia de GeneBank (nº de acceso 7067), se corresponden con (CA)<sub>14</sub> y (CA)<sub>26</sub>, respectivamente. En la figura 14 se representa la distribución alélica en controles y pacientes. En ambos grupos los alelos más representados son (CA)<sub>20</sub> y (CA)<sub>18</sub>, con una frecuencia de 37,7% y 27,7%, respectivamente, y correspondientes a productos de PCR de 132 pb y 128 pb.

<b>THRA1</b>	<b>Controles (n=141)</b>	<b>Pacientes (n=212)</b>
GENOTIPO (pb)	n (%)	n (%)
<b>Homocigotos</b>		
128/128	10 (7,1)	16 (7,5)
130/130	4 (2,8)	9 (4,2)
132/132	16 (11,3)	23 (10,8)
134/134	2 (1,4)	6 (2,8)
136/136	7 (5)	3 (1,4)
138/138	1 (0,7)	3 (1,4)
140/140	0 (0)	1 (0,5)
<b>Heterocigotos</b>		
120/126	1 (0,7)	0 (0)
120/128	2 (1,4)	3 (1,4)
120/130	0 (0)	1 (0,5)
120/132	5 (3,5)	2 (0,9)
120/134	0 (0)	1 (0,5)
122/128	2 (1,4)	0 (0)
122/132	2 (1,4)	0 (0)
122/136	1 (0,7)	0 (0)
124/128	0 (0)	1 (0,5)
124/132	1 (0,7)	0 (0)
126/128	0 (0)	1 (0,5)
126/132	0 (0)	1 (0,5)
126/134	0 (0)	1 (0,5)
128/130	6 (4,3)	6 (2,8)
128/132	29 (20,6)	50 (23,6)
128/134	3 (2,1)	4 (1,9)
128/136	7 (5)	11 (5,2)
128/138	4 (2,8)	7 (3,3)
128/140	3 (2,1)	1 (0,5)
128/142	2 (1,4)	0 (0)
130/132	3 (2,1)	8 (3,8)
130/134	0 (0)	3 (1,4)
130/136	0 (0)	3 (1,4)
130/138	2 (1,4)	5 (2,4)
130/140	0 (0)	1 (0,5)
132/134	1 (0,7)	1 (0,5)
132/136	19 (13,5)	14 (6,6)
132/138	2 (1,4)	3 (1,4)
132/140	1 (0,7)	9 (4,2)
134/136	1 (0,7)	2 (0,9)
134/138	1 (0,7)	5 (2,4)
134/140	0 (0)	2 (0,9)
134/142	1 (0,7)	0 (0)
136/138	1 (0,7)	2 (0,9)
136/140	0 (0)	1 (0,5)
136/142	1 (0,7)	0 (0)
138/142	0 (0)	1 (0,5)
138/144	0 (0)	1 (0,5)

**Tabla 10.** Genotipos del *locus* THRA1.



**Figura 14.** Distribución alélica de la repetición (CA)<sub>n</sub> THRA1 en controles y pacientes con cáncer de tiroides. Según la secuencia de GenBank (nº 7067), el producto de PCR de 128 pb se corresponde con el número de repeticiones estándar (CA)<sub>18</sub>.

Dada la distinta proporción de sexos entre el grupo de pacientes y el de controles (ver apartado 2 de Materiales y Métodos), previamente al análisis de la posible asociación del microsatélite THRA1 con la susceptibilidad al cáncer de tiroides, examinamos la distribución de genotipos en función del sexo considerando la población total ( $p=0,27$ ,  $\chi^2$ ) y los grupos de controles y pacientes por separado ( $p=0,55$  y  $p=0,37$ , respectivamente,  $\chi^2$ ). Los valores de  $p$  indican que la distribución de los genotipos es independiente del sexo y, por tanto, que este factor no afecta a nuestros análisis de asociación.

Las frecuencias alélicas entre controles y pacientes no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,58$ , U de Mann-Whitney). Sin embargo, teniendo en cuenta que el tamaño de este microsatélite se ha relacionado directamente con la expresión del gen *NR1A1a* y que, a su vez, se ha sugerido que dicha expresión podría afectar a la diferenciación celular de los carcinomas de tiroides (Onda *et al.*, 2002), examinamos si los genotipos con alelos pertenecientes a los extremos de la distribución mostraban

## Resultados

---

asociación con el cáncer de tiroides. En concreto, seleccionamos a los portadores de uno o dos alelos menores del alelo mayoritario de 128 pb y a los portadores de uno o dos alelos mayores del alelo mayoritario de 132 pb. Estos dos grupos se analizaron por separado y los resultados se muestran en la tabla 11.

Alelo (bp)	Controles	Pacientes	Odds Ratio (95% CI)	P
<128	14	11	0,50 (0,21-1,13)	0,09
>132	60	91	1,04 (0,68-1,61)	0,88

**Tabla 11.** Genotipos del microsatélite THRA1 con uno o ambos alelos pertenecientes a los extremos del rango de distribución.

Los genotipos con uno o dos alelos >132 pb no mostraron asociación con la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Sin embargo, los genotipos con al menos un alelo <128 pb podrían tener un efecto protector respecto al riesgo a padecer cáncer de tiroides (OR 0,50, IC 95% 0,22-1,13), aunque estadísticamente la diferencia no es significativa ( $p=0,09$ ). Estos genotipos con alelos THRA1 cortos o largos no están asociados con el tipo de cáncer de tiroides papilar o folicular ( $p=0,87$ ). Asimismo, no observamos que el consumo de alcohol, tabaco o café tuviera un efecto modulador en la población de pacientes ( $p=1$ ,  $p=0,43$  y  $p=0,52$ , respectivamente).

### 1.2 ANÁLISIS DEL MICROSATÉLITE BAT-40

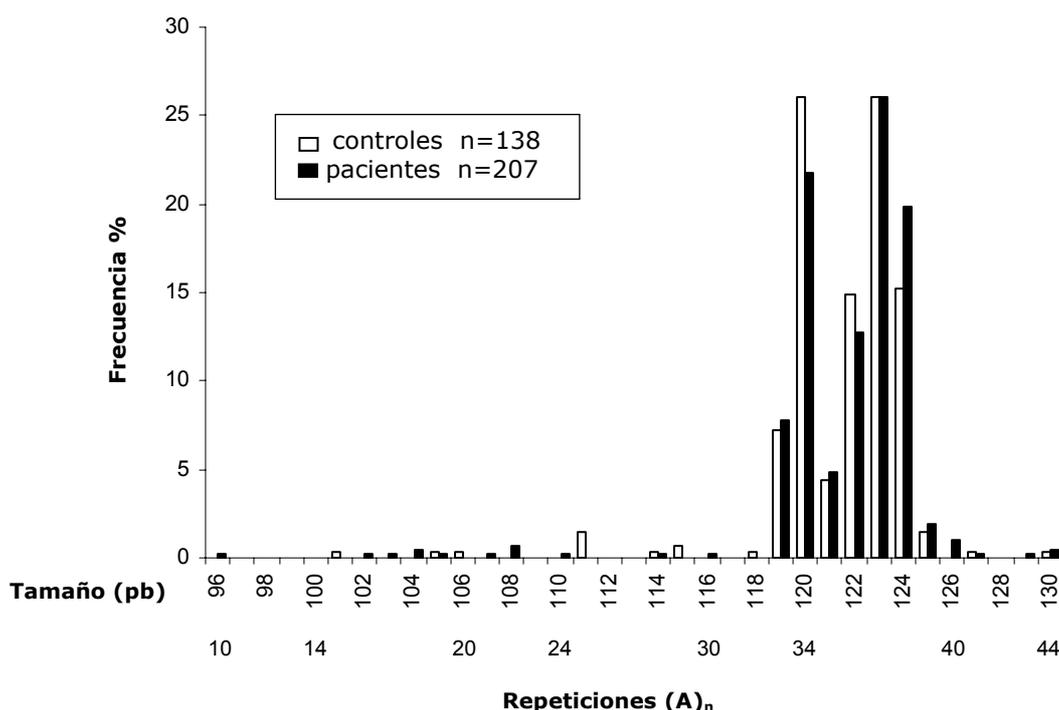
El microsatélite BAT-40 es una repetición de tipo  $(A)_n$ , muy polimórfico y ampliamente empleado en estudios poblacionales. Se sitúa en el intrón 2 del gen *HSD3 $\beta$ 1* (3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1, 1p13.1). Para este estudio se genotiparon, mediante PCR, 138 controles y 207 pacientes con cáncer de tiroides, cuyas frecuencias genotípicas se muestran en la tabla 12.

<b>BAT-40</b>	<b>Controles (n=138)</b>	<b>Pacientes (n=207)</b>
GENOTIPO (pb)	n (%)	n (%)
<b>Homocigotos</b>		
119/119	7 (5,2)	11 (5,3)
120/120	15 (10,9)	21 (10,1)
121/121	5 (3,6)	9 (4,3)
122/122	6 (4,3)	9 (4,3)
123/123	32 (23,1)	51 (24,6)
124/124	17 (12,3)	35 (16,9)
125/125	1 (0,7)	1 (0,5)
<b>Heterocigotos</b>		
96/119	0 (0)	1 (0,5)
101/119	1 (0,7)	0 (0)
102/120	0 (0)	1 (0,5)
103/108	0 (0)	1 (0,5)
104/120	0 (0)	1 (0,5)
104/123	0 (0)	1 (0,5)
105/125	1 (0,7)	1 (0,5)
106/120	1 (0,7)	0 (0)
107/120	0 (0)	1 (0,5)
108/121	0 (0)	1 (0,5)
108/124	0 (0)	1 (0,5)
110/124	0 (0)	1 (0,5)
111/120	1 (0,7)	0 (0)
111/123	2 (1,4)	0 (0)
111/124	1 (0,7)	0 (0)
114/120	1 (0,7)	0 (0)
114/124	0 (0)	1 (0,5)
115/118	1 (0,7)	0 (0)
115/119	1 (0,7)	0 (0)
116/123	0 (0)	1 (0,5)
119/121	1 (0,7)	0 (0)
119/122	2 (1,4)	5 (2,4)
119/123	0 (0)	3 (1,6)
119/124	1 (0,7)	0 (0)
119/125	0 (0)	1 (0,5)
120/122	28 (20,3)	29 (14)
120/123	4 (3,3)	0 (0)
120/124	5 (4,1)	7 (3,7)
120/125	1 (0,7)	4 (2,1)
120/126	0 (0)	3 (1,6)
120/127	1 (0,7)	1 (0,5)
120/130	0 (0)	1 (0,5)
121/123	1 (0,7)	1 (0,5)
122/129	0 (0)	1 (0,5)
124/126	0 (0)	1 (0,5)
124/130	1 (0,7)	1 (0,5)

**Tabla 12.** Genotipos del *locus* BAT-40.

## Resultados

En ambos grupos la heterocigosidad fue similar, 39,9% en controles y 33,8% en pacientes. A pesar de la distinta proporción de sexos entre el grupo de controles y el de pacientes, al igual que en el análisis del microsatélite THRA1, no se encontraron diferencias significativas en la distribución de genotipos entre hombres y mujeres ( $p=0,43$  en la población total,  $p=0,19$  en controles y  $p=0,43$  en pacientes). La distribución de las frecuencias alélicas de BAT-40 en controles y pacientes se representa en la figura 15.



**Figura 15.** Distribución alélica del microsatélite BAT-40 en controles y pacientes con cáncer de tiroides. Según la secuencia de GenBank (nº M38180), el producto de PCR de 126 pb se corresponde con el número de repeticiones estándar (A)<sub>40</sub>.

En ambos grupos las frecuencias alélicas siguen una distribución bimodal, siendo los alelos de 120 y 123 pb (producto de PCR) los más representados. Al comparar las frecuencias alélicas entre ambos grupos no encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,074$ , U de Mann Whitney), sin embargo, observamos que el intervalo de tamaños de los alelos en los pacientes era mayor que en los controles (96-130 pb y 101-130 pb,

respectivamente) (figura 15). Asimismo, en el intervalo de alelos de menor tamaño, la distribución es diferente entre controles y pacientes.

Teniendo en cuenta estas diferencias, se sugirió que los alelos más frecuentes podrían enmascarar posibles diferencias entre controles y pacientes debidas a los alelos de tamaño menos frecuente. Así, se continuó el análisis agrupando los alelos en intervalos de 5 pb de diferencia (<111, 111-115, 116-120, 121-125 y >125). Este análisis mostró diferencias estadísticamente significativas entre controles y pacientes ( $p=0,035$ , *Likelihood Ratio*). En concreto, el intervalo correspondiente a los alelos de 111-115 pb se identificó como el responsable de dicha diferencia ( $p=0,008$ , test de Fisher). Estas diferencias también se apreciaron al comparar los genotipos de controles y pacientes (ver tabla 13).

<b>Intervalos alélicos (bp)</b>	<b>Controles</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Odds Ratio (95% CI)</b>	<b>P</b>
<b>&lt;111</b>	3	10	2,28 (0,62-8,45)	0,22
<b>111-115</b>	7	1	0,18 (0,01-0,75)	0,02
<b>116-120</b>	72	91	0,72 (0,47-1,10)	0,14
<b>121-125</b>	109	165	1,04 (0,61-1,78)	0,87
<b>&gt;125</b>	2	8	2,73 (0,57-18,1)	0,21

**Tabla 13.** Genotipos de BAT40 con uno o ambos alelos pertenecientes a los intervalos señalados.

En el grupo de controles, siete individuos presentan un genotipo con uno o dos alelos del intervalo 111-115 (5,1%), respecto a un sólo paciente (0,05%). La *odds ratio* indica que, en la población estudiada, estos genotipos del intervalo 111-115 tienen un efecto protector frente a la susceptibilidad al cáncer de tiroides (OR=0,18, IC 95% 0,01-0,75,  $p=0,02$ ). Asimismo, se observa que los genotipos con alelos <111 pb y >125 pb están dos veces más representados en pacientes que en controles. En concreto, la frecuencia de genotipos con alelos <111 pb es de 4,8% y 2,1% en pacientes y controles, respectivamente; y la frecuencia de genotipos con alelos >125 pb de 3,9% y

## Resultados

1,5%, respectivamente. Sin embargo, no se observó asociación entre estos grupos de genotipos y la susceptibilidad al cáncer de tiroides (tabla 13). Hay que destacar que la falta de asociación puede estar determinada por la baja frecuencia de los alelos de menor tamaño y por el tamaño muestral.

Nuestro análisis también indica que el consumo de alcohol, tabaco o café no modula el efecto del genotipo en los pacientes ( $p=0,97$ ,  $p=0,85$  y  $p=0,79$ , respectivamente). Por otro lado, el análisis de las características clinicopatológicas (sexo, edad de diagnóstico, tipo de cáncer y antecedentes familiares de cáncer) en función de los grupos de genotipos, no mostró diferencias significativas (tabla 14).

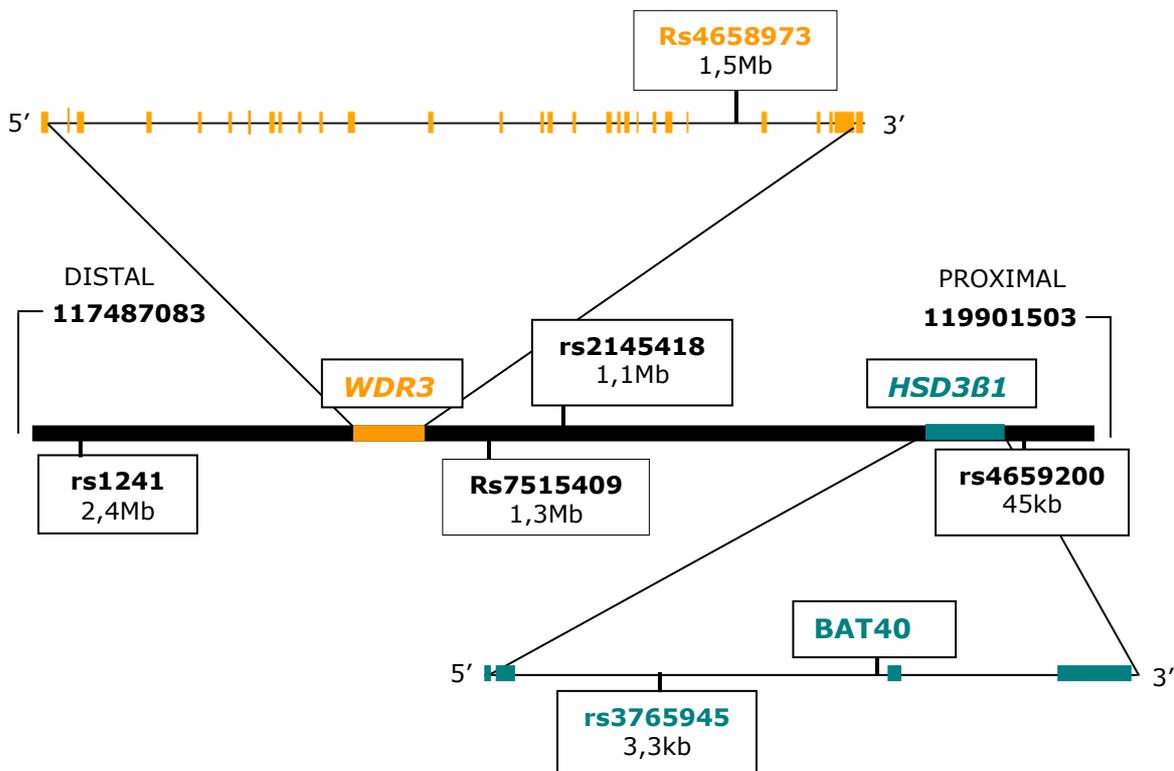
<b>BAT-40</b>	<b>&lt;111 (n=10) n (%)</b>	<b>111-115 (n=1) n (%)</b>	<b>116-125 (n=184) n (%)</b>	<b>&gt;125 (n=8) n (%)</b>	<b>p<sup>a</sup></b>
<b>Sexo</b>					
Hombres	2 (20)	1 (100)	48 (26,1)	3 (37,5)	0,32
Mujeres	8 (80)	0 (0)	136 (73,9)	5 (62,5)	
<b>Edad diagnóstico</b>					
≤45	6 (60)	1(100)	129 (70,1)	4 (50)	0,51
>45	4 (40)	0 (0)	55 (29,9)	4 (50)	
<b>Tipo de cáncer</b>					
Folicular	1 (10)	0 (0)	33 (18,3)	1 (12,5)	0,62
Papilar	9 (90)	1 (100)	143 (79,4)	6 (75)	
Otros	0 (0)	0 (0)	4 (2,2)	1 (12,5)	
<b>Antec. de cáncer</b>					
Sí	9 (90)	0 (0)	131 (71,2)	7 (87,5)	0,15
No	1 (10)	1 (100)	53 (28,8)	1 (12,5)	

**Tabla 14.** Características clinicopatológicas de los pacientes según el genotipo de BAT-40. <sup>a</sup>El valor de p se calculó mediante el test de Fisher.

### 1.3 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN 1p12-13

Teniendo en cuenta que el microsatélite BAT-40, empleado en el análisis anterior, muestra la asociación de la región 1p13 con la susceptibilidad al cáncer de tiroides, con el fin de delimitar con más detalle la región de susceptibilidad, nos propusimos analizar seis polimorfismos (SNPs) situados alrededor del marcador BAT-40, que comprenden una región de

aproximadamente 2,5 Mb: rs3765945, rs4659200, rs2145418, rs7515409, rs4658973 y rs1241. Excepto los marcadores rs4659200 y rs3765945, situados, respectivamente, en la región flanqueante 3' del gen *HSD3 $\beta$ 1* y en el intrón 2 del mismo gen; el resto de marcadores se localizan en la región flanqueante 5' de dicho gen y, en concreto, rs4658973 se ubica en el intrón 25 del gen *WDR3* (nº de acceso GenBank 10885). La elección de estos marcadores se basó en la frecuencia alélica (>0,2) y en la posibilidad de análisis mediante PCR-RFLP. En la figura 16 se muestra la posición relativa de estos marcadores con respecto a BAT-40.



**Figura 16.** Representación gráfica de la región 1p12-13. Se indica la posición de los polimorfismos analizados respecto al microsatélite BAT-40. Asimismo, se indica la posición de rs3765945 en el intrón 2 del gen *HSD $\beta$ 1* y de rs4658973 en el intrón 25 del gen *WDR3*.

Los polimorfismos rs4659200, rs3765945, rs2145418 y rs1241 se analizaron en 136 controles (edad media  $37,3 \pm 10,9$ ) y 201 pacientes (edad media  $42,7 \pm 14,4$ ), mientras que rs7515409 y rs4658973 se analizaron en 202

## Resultados

controles (edad media 41,22±13,20) y 227 pacientes (edad media 43,50±14,6). El análisis de las frecuencias genotípicas en la población control indica que todos los polimorfismos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto rs2145418 y rs1241 ( $p=0,005$  y  $p=0,007$ , respectivamente). En concreto, para rs1241 la frecuencia observada de heterocigotos (75/136) era mayor que la esperada (61/136), y la frecuencia observada de homocigotos variantes era menor que la esperada (8/136 respecto a 16/136). En el caso del polimorfismo rs2145418 la frecuencia observada de homocigotos variantes era mayor que la esperada (13/136 respecto a 8/136), y la de heterocigotos menor (35/136 respecto a 49/136). Hay que tener en cuenta que cuando no se cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg, las frecuencias alélicas no se pueden comparar mediante un  $\chi^2$ , sino mediante el test de tendencia de Armitage. Por el contrario, la comparación de las frecuencias genotípicas mediante regresión logística no está influida por el equilibrio de Hardy-Weinberg (Iniesta *et al.*, 2005).

En la tabla 15 se muestran los cambios nucleotídicos para cada polimorfismo, siendo el primer alelo el más frecuente. Asimismo, se indican las frecuencias alélicas del alelo menos representado o variante en los dos grupos analizados, y los valores de  $p$  correspondientes a la comparación de dichas frecuencias mediante un  $\chi^2$  o mediante el test de Armitage.

SNPs	Alelos	Frecuencia del alelo variante		P( $\chi^2$ )
		Controles	Pacientes	
<b>rs4659200</b>	C>T	0,39	0,35	0,28
<b>rs3765945</b>	T>C	0,33	0,35	0,60
<b>rs2145418</b>	T>G	0,24	0,57	<00001 <sup>a</sup>
<b>rs1241</b>	T>C	0,33	0,35	0,49 <sup>a</sup>
<b>rs7515409</b>	T>C	0,46	0,46	0,86
<b>rs4658973</b>	T>G	0,48	0,26	<0,0001

**Tabla 15.** Cambios nucleotídicos y frecuencias del alelo variante en los grupos de controles y pacientes con cáncer de tiroides, para cada SNP. <sup>a</sup>Valor de  $p$  correspondiente al test de tendencia de Armitage.

Se observan diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas de controles y pacientes en los polimorfismos rs2145418 y rs4658973 ( $p < 0,0001$ ). Dada la distinta proporción de sexos entre la población de pacientes y la de controles (ver apartado 2 de Materiales y Métodos), como mencionamos en el análisis de los microsatélites, previamente al análisis de la asociación de los polimorfismos con la susceptibilidad al cáncer de tiroides, examinamos la distribución de genotipos en función del sexo, para cada polimorfismo, considerando la población total y los grupos de controles y pacientes por separado. En la tabla 16 se muestra la distribución de genotipos respecto al sexo, para cada polimorfismo, considerando la población total. Sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de genotipos entre hombres y mujeres en el polimorfismo rs2145418 ( $p = 0,03$ , tabla 16), aunque al considerar controles y pacientes por separado no se detectó esta diferencia (controles  $p = 0,92$ ; pacientes  $p = 0,78$ ). En el resto de SNPs no encontramos diferencias significativas ni en la población total (tabla 16), ni considerando controles y pacientes por separado.

<b>Genotipo</b>	<b>Mujeres n (%)</b>	<b>Hombres n (%)</b>	<b>p(<math>\chi^2</math>)</b>
<b>rs4659200</b>			
CC	89 (41,8)	50 (40,6)	0,91
TC	93 (43,7)	53 (43,1)	
TT	31 (14,6)	20 (16,3)	
<b>rs3765945</b>			
TT	83 (39,1)	46 (37,4)	0,09
CT	108 (50,9)	72 (58,5)	
CC	21 (9,9)	5 (4,1)	
<b>rs2145418</b>			
TT	74 (35,1)	58 (47,5)	0,03*
TG	77 (36,5)	43 (35,2)	
GG	60 (28,4)	21 (17,2)	
<b>rs1241</b>			
TT	98(45,8)	46 (37,7)	0,33
CT	100(46,7)	67 (54,9)	
CC	16 (7,5)	9 (7,4)	
<b>rs7515409</b>			
TT	74 (26,6)	45 (31,5)	0,56
CT	151 (54,3)	74 (51,8)	
CC	53 (19,1)	24 (16,8)	
<b>rs4658973</b>			
TT	130(48,1)	57 (41,3)	0,20
GT	115(42,6)	61 (44,2)	
GG	25 (9,3)	20 (14,5)	

**Tabla 16.** Distribución genotípica de cada SNP por sexos en la población total.

## Resultados

Seguidamente, se analizó la posible asociación de cada polimorfismo con la susceptibilidad al cáncer de tiroides mediante regresión logística y siguiendo un modelo de herencia codominante. Así, se utilizó como referencia el genotipo homocigoto para el alelo más frecuente ya que, biológicamente, se supone que, en caso de asociación, el alelo menos frecuente sería el de riesgo. En la tabla 17 se muestran las frecuencias genotípicas y los valores de *odds ratio* para cada polimorfismo en la población de controles y pacientes con cáncer de tiroides. Hay que indicar que los valores de *odds ratio* ajustados al sexo, edad, alcohol y tabaco no variaban respecto a los originales, por lo que nos referimos a estos últimos.

Genotipo	Controles (n=136) n (%)	Pacientes (n=201) n (%)	Odds Ratio (IC 95%)	P
<b>rs4659200</b>				
CC	54 (39,7)	85 (42,5)	1,0 (Ref.) <sup>a</sup>	
TC	57 (41,9)	89 (44,5)	0,9 (0,62-1,60)	0,97
TT	25 (18,4)	26 (13,0)	0,7 (0,35-1,26)	0,28
<b>rs3765945</b>				
TT	55 (40,4)	74 (37,2)	1,0 (Ref.)	
CT	71 (52,2)	109 (54,8)	1,1 (0,72-1,81)	0,57
CC	10 (7,4)	16 (8)	1,2 (0,50-2,82)	0,69
<b>rs2145418</b>				
TT	87 (64)	44 (22,3)	1,0 (Ref.)	
TG	34 (25)	85 (43,1)	5,0 (2,8-8,83)	<0,0001
GG	15 (11)	68 (34,5)	9,2 (4,5-18,6)	<0,0001
Aditivo				<0,0001
<b>rs1241</b>				
TT	52 (38,5)	92 (45,8)	1,0 (Ref.)	
CT	75 (55,6)	92 (45,8)	0,7 (0,44-1,09)	0,12
CC	8 (5,9)	17 (8,4)	1,2 (0,49-1,16)	0,69
Genotipo	(n=202)	(n=227)	Odds Ratio (IC 95%)	P
<b>rs7515409</b>				
TT	54 (26,7)	65 (29,3)	1,0 (Ref.)	
CT	112 (55,4)	113 (50,9)	0,8 (0,54-1,31)	0,51
CC	33 (16,3)	44 (19,8)	1,1 (0,62-1,97)	0,73
<b>rs4658973</b>				
TT	60 (30,9)	127 (59,3)	1,0 (Ref.)	
GT	95 (48,9)	81 (37,9)	0,4 (0,26-0,62)	<0,0001
GG	39 (20,1)	6 (2,8)	0,07(0,03-0,2)	<0,0001
Aditivo				<0,0001

**Tabla 17.** Frecuencias genotípicas y *odds ratios* de cada SNP según el modelo de herencia codominante. Para los SNPs rs2145418 y rs4658973 se indica también la asociación según un modelo de herencia aditivo <sup>a</sup> Ref, grupo de referencia.

Los polimorfismos rs4659200, rs3765945, rs1241 y rs7515409 no mostraron asociación con la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Por el contrario, los polimorfismos rs2145418 y rs4658973 mostraron una clara asociación, estadísticamente significativa, con el cáncer de tiroides, que se refleja tanto en las frecuencias alélicas como en las genotípicas. Además, ambos marcadores se ajustan a un modelo de herencia aditivo, en el que la posesión de un solo alelo es suficiente para provocar un efecto. En concreto, para el marcador rs2145418, el alelo variante G confiere riesgo a padecer cáncer de tiroides, mientras que para el marcador rs4658973, el alelo variante G tiene un efecto protector (ver tabla 17).

Para el marcador **rs2145418**, los genotipos TG y GG muestran un valor de *odds ratio* de 5 y 9,2, respectivamente (IC 95% 2,8-8,8; IC 95% 4,5-18,6, respectivamente;  $p < 0,0001$ ), lo que indica que, tomando como referencia a los individuos con genotipo TT, los individuos portadores del alelo variante G presentan un riesgo elevado de cáncer de tiroides, y sugiere un efecto aditivo del polimorfismo. Dado que, para este polimorfismo, existe una diferencia estadísticamente significativa en la distribución de los genotipos en función del sexo en la población total (ver tabla 16), analizamos las frecuencias genotípicas por separado en hombres y mujeres. Como se muestra en la tabla 18, en ambos casos los valores de *odds ratio* son similares a los de la población sin estratificar.

Sexo	Genotipo	Controles (66♀+70♂) n (%)	Pacientes (145♀+52♂) n (%)	Odds ratio (IC 95%)	p
<b>Mujeres</b>	TT	41 (62,1)	32 (22,1)	1,0 (Ref.)	
	TG	16 (24,2)	60 (41,4)	4,6 (2,3-9,4)	P<0,0001
	GG	9 (13,6)	53 (36,5)	9,9 (3,9-24,7)	P<0,0001
<b>Hombres</b>	TT	46 (65,7)	12 (23,1)	1,0 (Ref.)	
	TG	18 (25,7)	25 (48,1)	5,3 (2,2-12,8)	P=0,0001
	GG	6 (8,6)	15 (28,8)	9,6 (3,1-29,9)	P<0,0001

**Tabla 18.** Frecuencias genotípicas y *odds ratios* del SNP rs2145418 estratificado en función del sexo. Se indican las *odds ratios* de cada genotipo según el modelo codominante y tomando como referencia los homocigotos del alelo más representado.

## Resultados

En el caso del marcador **rs4658973**, los genotipos GT y GG son más frecuentes en el grupo de controles (tabla 17) y muestran unas *odds ratios* de 0,4 y 0,07, respectivamente (IC 95% 0,26-0,62; IC 95% 0,03-0,2, respectivamente;  $p < 0,0001$ ), lo que indica un efecto protector del alelo variante G, que sigue un modelo aditivo. Para este polimorfismo también analizamos las frecuencias genotípicas en cada sexo (tabla 19). En este caso, el efecto protector del alelo variante G en las mujeres es similar al de la población sin estratificar, con valores de *odds ratio* para los genotipos GT y GG de 0,48 y 0,05, respectivamente. Sin embargo, en los hombres se observa que el efecto protector del alelo G en homocigosis es aproximadamente la mitad que en las mujeres, con *odds ratios* de 0,12 en los hombres y 0,05 en las mujeres; mientras que el genotipo heterocigoto GT tiene un efecto protector mayor en los hombres que en las mujeres, con *odds ratios* de 0,28 y 0,48, respectivamente.

Sexo	Genotipo	Controles (111♀+83♂) n (%)	Pacientes (159♀+55♂) n(%)	Odds ratio (IC 95%)	P
Mujeres	TT	37 (33,3)	93 (58,5)	1,00 (Ref.)	
	GT	52 (46,9)	63 (39,6)	0,48 (0,3-0,8)	P=0,002
	GG	22 (19,8)	3 (1,9)	0,05 (3,9-24,7)	p<0,0001
Hombres	TT	23 (27,7)	34 (61,8)	1,00 (Ref.)	
	GT	43 (51,8)	18 (32,7)	0,28 (0,1-0,6)	P=0,001
	GG	17 (20,5)	3 (5,5)	0,12 (0,03-0,4)	P=0,0006

**Tabla 19.** Frecuencias genotípicas y *odds ratios* del SNP rs4658973 estratificado en función del sexo. Se indican las *odds ratios* de cada genotipo según el modelo codominante y tomando como referencia los homocigotos del alelo más representado.

Asimismo, para los polimorfismos rs2145418 y rs4658973, que mostraron asociación con el cáncer de tiroides, comparamos las características clinicopatológicas del grupo de pacientes en función de los distintos genotipos y los resultados de este análisis se muestran en la tabla 20. No hay diferencias estadísticamente significativas en ningún caso (test  $\chi^2$ ). Sin embargo, en ambos marcadores se observa que la frecuencia de individuos con edad de diagnóstico  $\leq 45$  años es mayor para la combinación de los genotipos de riesgo

(GT+GG) que para el genotipo TT (71,2% y 61,4%, respectivamente, para rs2145418; 73,9% y 66,9% para rs4658973, respectivamente). Asimismo, para el SNP rs2145418, la frecuencia de casos de cáncer en familiares en los individuos con genotipos de riesgo es mayor que para el genotipo TT (75,2% y 63,6%, respectivamente).

SNP	rs2145418			rs4658973		
	T/T (n=44) n (%)	T/G+G/G (n=153) n(%)	p	T/T (n=127) n (%)	G/T+G/G (n=87) n (%)	p
<b>Sexo</b>						
Hombres	12 (27,3)	40 (26,1)	0,88	34 (26,8)	21 (24,1)	0,66
Mujeres	32 (72,7)	113 (73,9)		93 (73,2)	66 (75,9)	
<b>Edad diagnóst.</b>						
≤45	27 (61,4)	109 (71,2)	0,21	77 (66,9)	51 (73,9)	0,32
>45	17 (38,6)	44 (28,2)		38 (33,1)	18 (26,1)	
<b>Tipo cáncer</b>						
Papilar	36 (83,7)	117 (78,0)	0,71	100 (82,6)	63 (74,1)	0,21
Folicular	6 (14,0)	29 (19,3)		17 (14,0)	20 (23,5)	
Otro	1 (2,3)	4 (2,7)		4 (3,3)	2 (2,4)	
<b>Antec. cáncer</b>						
Sí	28 (63,6)	115 (75,2)	0,13	91 (72,8)	61 (70,9)	0,77
No	16 (36,4)	38 (24,8)		34 (27,2)	25 (29,1)	

**Tabla 20.** Análisis de las características clinicopatológicas para los SNPs asociados a la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Se indican las variables sexo, edad de diagnóstico, tipo de cáncer y antecedentes familiares de cáncer, para cada genotipo y para la combinación de los genotipos heterocigoto y homocigoto variante.

### 1.3.1 Efecto modulador de factores genético-ambientales

Las comparaciones entre los distintos genotipos de cada polimorfismo se realizaron teniendo en cuenta las variables sexo, edad y consumo de alcohol y tabaco en controles y pacientes. Para cada polimorfismo y genotipo se consideró como categoría de referencia a los individuos controles y de sexo femenino, de edad  $\leq 45$  años, no bebedores o no fumadores, respectivamente. Así, el valor de *odds ratio* nos indica el riesgo relativo de los distintos genotipos en las personas de sexo masculino, con el hábito o mayores de 45 años. Hay que señalar que en el análisis de cada variable, se ajustaron las *odds ratios* al resto de las variables para evitar la posible interferencia en los resultados.

- **Sexo**

En la tabla 21 se muestra el análisis mediante regresión logística del efecto modulador del sexo en los polimorfismos estudiados. En todos los SNPs, excepto para el genotipo GG de rs4658973 y el CC de rs1241, se observa una tendencia similar, en la que, para un mismo genotipo, los hombres tienen menos riesgo de cáncer de tiroides que la mujeres. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en todos los casos debido principalmente a la reducción del tamaño de la muestra como resultado de la estratificación de la población. En el caso del polimorfismo rs4658973, los hombres con genotipo GG tienen más riesgo que las mujeres, aunque no hay diferencias estadísticamente significativas. Esta tendencia ya se observó en el análisis previo que se muestra en la tabla 19. De hecho, sólo encontramos diferencias significativas en los heterocigotos y en la combinación GT-GG, donde los hombres tienen 0,44 y 0,49 veces, respectivamente, menos riesgo de padecer cáncer de tiroides respecto a las mujeres con el mismo genotipo. Asimismo, para el polimorfismo rs2145418 observamos la tendencia general de riesgo mayor asociado a las mujeres, para un mismo genotipo y, en concreto, detectamos diferencias significativas en los homocigotos TT, los heterocigotos y la combinación TG-GG.

<b>Genotipo</b>	<b>Mujeres (C/P)<sup>a</sup></b>	<b>Hombres (C/P)</b>	<b>Odds Ratio (IC 95%)</b>
<b>rs4659200</b>			
CC	24/65	30/20	<b>0,28 (0,1-0,6)</b>
TC	28/65	29/24	<b>0,46 (0,2-0,9)</b>
TT	14/17	11/9	0,82 (0,2-2,7)
<b>rs3765945</b>			
TT	29/54	26/20	<b>0,46 (0,2-0,9)</b>
CT	30/78	41/31	<b>0,34 (0,2-0,7)</b>
CC	7/14	3/2	0,40 (0,05-3,3)
<b>rs2145418</b>			
TT	41/32	46/12	<b>0,38 (0,2-0,9)</b>
TG	16/60	18/25	<b>0,37 (0,2-0,9)</b>
GG	9/53	6/15	0,72 (0,2-2,5)
TG-GG	25/113	24/40	<b>0,43 (0,2-0,9)</b>
<b>rs1241</b>			
TT	28/70	24/22	0,48 (0,2-1,0)
CT	33/67	42/25	<b>0,31 (0,2-0,6)</b>
CC	5/11	3/6	1,26 (0,2-8,1)
<b>rs7515409</b>			
TT	30/44	24/21	0,65 (0,3-1,4)
CT	67/84	45/29	0,66 (0,4-1,2)
CC	18/35	15/9	<b>0,35 (0,1-0,9)</b>
<b>rs4658973</b>			
TT	37/93	23/34	0,68 (0,4-1,3)
GT	52/63	43/18	<b>0,44 (0,2-0,9)</b>
GG	22/3	17/3	1,43 (0,3-8,0)
GT-GG	74/66	60/21	<b>0,49 (0,3-0,9)</b>

**Tabla 21.** Efecto modulador del sexo. Se muestran las *odds ratios*, ajustadas a edad y consumo de alcohol y tabaco, correspondientes a cada genotipo y a la combinación de heterocigotos y homocigotos variantes para los polimorfismos rs2145418 y rs4658973. Se señalan en negrita aquellos con  $p < 0,05$ .<sup>a</sup> C=controles, P=pacientes.

- **Edad**

Para el análisis del efecto modulador de la edad en la susceptibilidad al cáncer de tiroides consideramos dos grupos: edad superior a 45 años y edad igual o inferior a 45 años. Puesto que un 80% de los casos de cáncer de tiroides es de tipo papilar, y que la edad media de aparición de éste es a los 45 años, seleccionamos este valor como edad de corte. Como podemos observar en la tabla 22, en general, para los distintos genotipos, el tener más de 45 años no incrementa el riesgo. En el caso del marcador rs2145418, los

individuos con genotipo GG y mayores de 45 años tienen aproximadamente el doble de riesgo que los menores de 45 años, aunque no hay diferencias significativas. Por otro lado, para los genotipos de los polimorfismos rs7515409 y rs4658973, los individuos mayores de 45 años muestran tendencia de reducción del riesgo, aunque no es estadísticamente significativa. Estos resultados pueden estar sesgados por el hecho de que, en nuestra población, el número de individuos >45 años es inferior al de individuos ≤45 años, tanto en el grupo de controles como en el de pacientes.

<b>Genotipo</b>	<b>≤45 años (C/P)<sup>a</sup></b>	<b>&gt;45 años (C/P)</b>	<b>Odds Ratio (IC 95%)</b>
<b>rs4659200</b>			
CC	44/51	10/34	<b>3,83 (1,6-9,4)</b>
TC	39/64	18/25	0,56 (0,2-1,3)
TT	20/15	5/11	3,19 (0,8-12,5)
<b>rs3765945</b>			
TT	42/44	13/30	2,10 (0,9-4,9)
CT	53/77	18/32	1,18 (0,6-2,5)
CC	8/8	2/8	3,53 (0,5-24,3)
<b>rs2145418</b>			
TT	52/27	35/17	0,94 (0,4-2,1)
TG	23/59	11/26	1,02 (0,4-2,5)
GG	13/50	2/18	1,86 (0,4-9,5)
TG-GG	36/109	13/44	1,11 (0,5-2,4)
<b>rs1241</b>			
TT	44/59	8/33	<b>3,29 (1,3-8,5)</b>
CT	53/61	22/31	1,11 (0,5-2,3)
CC	5/10	3/7	0,71 (0,1-4,6)
<b>rs7515409</b>			
TT	38/46	16/19	0,82 (0,4-1,9)
CT	65/78	47/35	0,57 (0,3-1,0)
CC	18/28	15/16	0,61 (0,2-1,6)
<b>rs4658973</b>			
TT	35/90	25/37	0,53 (0,3-1,0)
GT	58/55	37/26	0,60 (0,3-1,2)
GG	22/4	17/2	0,70 (0,1-4,4)
GT-GG	80/59	54/28	0,61 (0,3-1,1)

**Tabla 22.** Efecto modulador de la edad. Se muestran las *odds ratios* ajustadas al sexo y consumo de alcohol y tabaco, correspondientes a cada genotipo y a la combinación de heterocigotos y homocigotos variantes para los polimorfismos rs2145418 y rs4658973. Se señalan en negrita aquellos con  $p < 0,05$ .<sup>a</sup> C=controles, P=pacientes.

• **Alcohol**

En la tabla 23 se muestra el análisis mediante regresión logística del efecto modulador del consumo de alcohol en los polimorfismos estudiados.

<b>Genotipo</b>	<b>No bebedores (C/P)</b>	<b>Bebedores (C/P)</b>	<b>Odds Ratio (IC 95%)</b>
<b>rs4659200</b>			
CC	30/65	24/20	0,57 (0,2-1,3)
TC	30/60	27/29	0,78 (0,4-1,6)
TT	15/17	10/9	1,21 (0,4-4,2)
<b>rs3765945</b>			
TT	29/57	26/17	0,44 (0,2-1,0)
CT	41/72	30/37	1,13 (0,6-2,2)
CC	5/12	5/4	0,58 (0,1-3,4)
<b>rs2145418</b>			
TT	44/36	43/8	<b>0,33 (0,1-0,8)</b>
TG	22/60	12/25	1,15 (0,5-2,8)
GG	9/43	6/25	1,19 (0,4-3,9)
TG-GG	31/103	18/50	1,22 (0,6-2,5)
<b>rs1241</b>			
TT	30/66	22/26	0,73 (0,3-1,6)
CT	41/67	34/25	0,67 (0,3-1,4)
CC	4/10	4/7	1,41 (0,2-8,5)
<b>rs7515409</b>			
TT	35/48	19/15	0,65 (0,3-1,5)
CT	78/84	34/22	0,77 (0,4-1,5)
CC	21/37	12/7	0,37 (0,1-1,1)
<b>rs4658973</b>			
TT	44/100	16/23	0,73 (0,3-1,5)
GT	62/62	33/17	0,63 (0,3-1,3)
GG	25/5	14/1	0,42(0,04-3,7)
GT-GG	87/67	47/18	0,61 (0,3-1,2)

**Tabla 23.** Efecto modulador del consumo de alcohol. Se muestran las *odds ratios* ajustadas al sexo, edad y consumo de tabaco, correspondientes a cada genotipo y a la combinación de heterocigotos y homocigotos variantes para los polimorfismos rs2145418 y rs4658973. Se señalan en negrita aquellos con  $p < 0,05$ .<sup>a</sup> C=controles, P=pacientes.

En general, las *odds ratios* indican la tendencia de que los bebedores tienen menos riesgo que los no bebedores. Para el polimorfismo rs2145418 los individuos TT bebedores tienen 0,3 veces menos riesgo de cáncer de tiroides ( $p < 0,05$ ) que los no bebedores; mientras que, en el resto de genotipos, no se

observa un efecto modulador del alcohol. De igual modo, en ninguno de los genotipos de rs4658973 detectamos una asociación significativa, pero sí la tendencia general de disminución de riesgo asociada a los bebedores.

- **Tabaco**

En la tabla 24 se muestra el análisis mediante regresión logística del efecto modulador del consumo de tabaco en los polimorfismos estudiados.

<b>Genotipo</b>	<b>No fumadores (C/P)</b>	<b>Fumadores (C/P)</b>	<b>Odds Ratio (IC 95%)</b>
<b>rs4659200</b>			
CC	33/65	21/20	0,50 (0,2-1,1)
TC	30/66	27/23	<b>0,45 (0,2-0,9)</b>
TT	15/22	10/4	0,27 (0,07-1,1)
<b>rs3765945</b>			
TT	37/57	18/17	0,68 (0,3-1,5)
CT	37/83	34/26	<b>0,37 (0,2-0,7)</b>
CC	4/13	6/3	0,16 (0,03-1,1)
<b>rs2145418</b>			
TT	48/38	39/6	<b>0,20 (0,1-0,5)</b>
TG	20/66	14/19	0,43 (0,2-1,0)
GG	10/48	5/20	1,05 (0,3-3,6)
TG-GG	30/114	19/39	0,61 (0,3-1,2)
<b>rs1241</b>			
TT	28/71	24/21	<b>0,42 (0,2-0,9)</b>
CT	44/69	31/23	<b>0,48 (0,2-0,9)</b>
CC	5/14	3/3	0,35 (0,05-2,5)
<b>rs7515409</b>			
TT	36/46	17/17	0,91 (0,4-2,1)
CT	75/84	36/22	0,63 (0,3-1,2)
CC	21/38	12/6	<b>0,25 (0,1-0,8)</b>
<b>rs4658973</b>			
TT	40/92	20/31	0,72 (0,4-1,5)
GT	63/62	31/17	0,63 (0,3-1,3)
GG	27/6	12/0	-
GT-GG	90/98	43/17	0,61 (0,3-1,2)

**Tabla 24.** Efecto modulador del consumo de tabaco. Se muestran las *odds ratios* ajustadas al sexo, edad y consumo de alcohol, correspondientes a cada genotipo y a la combinación de heterocigotos y homocigotos variantes para los polimorfismos rs2145418 y rs4658973. Se señalan en negrita aquellos con  $p < 0,05$ .<sup>a</sup> C=controles, P=pacientes.

## Resultados

---

Al igual que para el sexo y el alcohol, en todos los SNPs se observa una tendencia similar en la que los fumadores tienen menos riesgo que los no fumadores, aunque no en todos los casos esta asociación es significativa. En el SNP rs2145418, el genotipo TT presenta una asociación estadísticamente significativa con el consumo de tabaco. De forma que para este polimorfismo, los individuos fumadores y con dicho genotipo tienen menos riesgo a padecer cáncer de tiroides que los no fumadores con el mismo genotipo ( $p < 0,05$ ).

### 1.3.2 Interacción entre los polimorfismos de la región 1p12-13

Con el fin de determinar si existe una interacción entre los polimorfismos de la región 1p12-13 estudiados que pueda tener consecuencias en la susceptibilidad al cáncer de tiroides, calculamos, en primer lugar, el desequilibrio de ligamiento entre estos marcadores mediante el coeficiente  $D'$ . Este coeficiente toma valores entre 0 y 1, siendo  $D'=0$  el equilibrio perfecto y  $D'=1$  el desequilibrio perfecto. Como se muestra en la tabla 25, no hallamos asociación entre ninguno de los polimorfismos, por lo que deducimos que se transmiten de forma independiente.

SNPs	rs4659200	rs3765945	rs2145418	rs7515409	rs4658973	rs1241
rs4659200	-	0,35	0,02	0,09	0,12	0,12
rs3765945	0,35	-	0,04	0,01	0,09	0,04
rs2145418	0,02	0,04	-	0,04	0,05	0,27
rs7515409	0,09	0,01	0,04	-	0,47	0,11
rs4658973	0,12	0,09	0,05	0,47	-	0,12
rs1241	0,12	0,04	0,27	0,11	0,12	-

**Tabla 25.** Valores de  $D'$  para el desequilibrio de ligamiento de las distintas combinaciones de SNPs.  $D'=0$  equilibrio perfecto y  $D'=1$ , desequilibrio perfecto.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que, a nivel funcional, la combinación de genotipos de distintos *loci* puede, a su vez, conferir un efecto protector o de riesgo al cáncer. De hecho, se supone que la susceptibilidad al cáncer podría ser debida al efecto conjunto de varios factores que, de manera individual, tendrían un efecto pequeño. Por este motivo, nos propusimos

analizar la interacción entre los polimorfismos de susceptibilidad rs2145418 y rs4658973 con cada uno de los restantes SNPs y entre sí. En la tabla 26 se muestran los resultados del análisis de la interacción entre rs2145418 y rs4658973, las *odds ratios* corresponden a las distintas combinaciones de genotipos tomando como referencia al formado por el doble homocigoto de los alelos más frecuentes (TT TT). Los resultados de la interacción entre estos marcadores y el resto de SNPs se muestran en el anexo 3.

rs2145418	rs4658973	Controles (n=130) n (%)	Pacientes (n=179) n (%)	Odds Ratio IC 95%
TT	TT	32 (24,6)	22 (12,3)	1,00 (Ref.)
TT	GT	35 (26,9)	17 (9,5)	0,77(0,33-1,82)
TT	GG	17 (13,1)	1 (0,6)	<b>0,11(0,01-0,93)</b>
TG	TT	7 (5,38)	46 (25,7)	<b>8,56 (3,1-23,43)</b>
TG	GT	19 (14,6)	24 (13,4)	2,05(0,84-4,99)
TG	GG	7 (5,4)	5 (2,8)	1,07 (0,27-4,15)
GG	TT	3 (2,31)	42 (23,5)	<b>27,25 (6,9-107,4)</b>
GG	GT	8 (6,2)	22 (12,3)	<b>3,86(1,31-11,3)</b>
GG	GG	2 (1,5)	0 (0)	-----

**p de Interacción: 0,089**

**Tabla 26.** Análisis de la interacción entre los marcadores rs2145418 y rs4658973. Se señalan en negrita aquellos con  $p < 0,05$ .

Nuestros resultados indican que no existe interacción entre rs2145418 y rs4658973 ( $p$  de interacción = 0,089). Sin embargo, dado que ambos polimorfismos presentan una clara asociación con el cáncer de tiroides, los valores de *odds ratio* correspondientes a la combinación de genotipos reflejan esta asociación. Así, la presencia de un solo alelo G de rs2145418 es suficiente para incrementar el riesgo. Este riesgo aumenta cuando dicho alelo se combina con el alelo T de rs4658973, de tal forma que los genotipos TGTT y GGTT son los que presentan mayor riesgo, con *odds ratios* de 8,56 (IC 95% 3,1-23,4;  $p < 0,05$ ) y 27,25 (IC 95% 6,9-107,4;  $p < 0,05$ ), respectivamente. Asimismo, la posesión de un solo alelo G de rs4658973 es suficiente para observar un efecto protector, que se hace más evidente cuando se combina con el alelo T de rs2145418, como puede observarse en los genotipos TTGT y

TTGG, con *odds ratios* de 0,77 (IC 95% 0,33-1,82) y 0,11 (IC 95% 0,01-0,93;  $p < 0,05$ ), respectivamente. En concordancia con el efecto de riesgo de rs2145418 y el de protección de rs4658973, la combinación del alelo de riesgo G de rs2145418 con el alelo protector G de rs4658973 muestra valores de *odds ratio* intermedios, aunque con un efecto neto de riesgo, como es el caso del genotipo TGGT (OR 2,05, IC 95% 0,84-4,99).

En el análisis de la posible interacción entre los polimorfismos rs2145418 y rs4658973 y el resto de SNPs, se vuelve a poner de manifiesto la susceptibilidad asociada a estos marcadores de manera individual, y no se detectaron interacciones entre las combinaciones de genotipos analizadas (ver anexo 3).

## **2. Análisis de la inestabilidad genómica inducida por el $^{131}\text{I}$ en individuos expuestos y en sus familias**

La finalidad de este estudio era analizar el posible efecto a largo plazo del tratamiento con  $^{131}\text{I}$  en la estabilidad genómica, en células humanas. Para ello se analizó, mediante los ensayos de micronúcleos y del cometa, el daño genómico en líneas celulares linfoblastoides (LBCLs) establecidas a partir de linfocitos de los miembros de dos familias (ver Materiales y Métodos, figura 13) en las que uno de los padres recibió tratamiento con  $^{131}\text{I}$ . Este estudio nos permite determinar el efecto indirecto del tratamiento con  $^{131}\text{I}$  al estudiar el daño genómico en cultivos celulares provenientes de individuos irradiados. Como controles se emplearon las muestras del cónyuge de la familia CT17 y de los hijos de ambas familias concebidos antes del tratamiento (CT10.1 y CT17.1).

### **2.1 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS**

Los resultados del análisis de micronúcleos (MN) se muestran en la tabla 27. En este experimento se analizaron dos réplicas por cada individuo y

pasaje estudiados. Aparentemente, en el momento de inicio del estudio (P0) se observa que la frecuencia de MN difiere entre las distintas LBCLs (2-12 MN/1000 células). Sin embargo, teniendo en cuenta la edad como factor de confusión, estas diferencias no son estadísticamente significativas en ninguna de las familias ( $p=0,06$  en la familia CT17 y  $p=0,29$  en la CT10).

LBCLs	Nº de micronúcleos (media± DE)			
	Tiempo (pasajes)			
	P0 <sup>a</sup>	P2	P5	P10
<b>Familia CT17</b>				
CT17P (12,3GBq)	4	4,0 ± 2,8	8,0 ± 1,4	9,0 ± 2,8
CT17M	9	6,5 ± 0,7	11 ± 1,4	N.D.
CT17.1	3	5,5 ± 2,1	8,0 ± 5,7	11,5 ± 7,8
CT17.2	2	3,0 ± 1,4	7,0 ± 1,4	5,0 ± 1,4
media	4,5 ± 3,1	4,7 ± 1,6	8,5 ± 1,7	8,5 ± 3,3
<b>Familia CT10</b>				
CT10M (4,6 GBq)	4	1,0 ± 1,4	4,5 ± 2,1	4,0 ± 1,4
CT10.1	7	8,0 ± 1,4	7 <sup>b</sup>	6,0 ± 1,4
CT10.2	12	3,5 ± 0,7	2 <sup>b</sup>	6,0 ± 2,8
media	7,7 ± 4,0	4,2 ± 3,5	4,5 ± 2,5	5,3 ± 1,2

**Tabla 27.** Frecuencia de MN en las distintas LBCLs a lo largo del tiempo. Se muestran la media y desviación estándar de las 1000 células contadas en las dos réplicas de cada individuo. <sup>a</sup> Cultivo inicial con sólo una réplica. <sup>b</sup> Sólo se analizó una réplica. N.D. Muestra no analizada.

En la familia CT17 se observó un incremento en la frecuencia de MN a lo largo del tiempo, aunque no hay diferencias significativas entre los pasajes P0 y P10 (media P0  $4,5 \pm 3,1$ , media P10  $8,5 \pm 3,3$ ;  $p=0,09$ ). Este incremento de la frecuencia de MN es estadísticamente significativo en el individuo CT17.1 ( $p=0,02$ ) y roza la significación en el individuo CT17P ( $p=0,08$ ). Por otro lado, en la familia CT10 no se observaron cambios en la frecuencia de MN a lo largo del tiempo. Asimismo, tampoco encontramos diferencias estadísticamente

significativas cuando comparamos, para cada familia, la frecuencia de micronúcleos del hijo concebido antes del tratamiento con la de su hermano concebido después, ni al comparar el progenitor tratado con su cónyuge o el progenitor tratado con cualquiera de sus hijos. Por otro lado, aunque a simple vista se observa que la frecuencia de MN de CT17P es superior a la de CT10M, lo que se podría justificar por la dosis de  $^{131}\text{I}$  recibida en cada caso, estadísticamente no hay diferencias significativas.

### 2.2 ENSAYO DEL COMETA

El ensayo del cometa realizado en condiciones alcalinas detecta roturas de cadena y sitios álcali-lábiles, lo que en nuestro estudio denominamos daño basal (DB). Por otro lado, para detectar el daño oxidativo tratamos las muestras con las enzimas Endo III y Fpg, que reconocen pirimidinas oxidadas y 8-oxoguanina, así como otras purinas alteradas, respectivamente. El análisis de cada enzima se realizó por separado y, para calcular el daño oxidativo, al daño detectado tras el tratamiento con las enzimas se restó el daño basal. La suma del daño oxidativo calculado para cada enzima constituye el daño oxidativo total (DO). Por último, el daño total detectado por este ensayo (DT) lo definimos como la suma del daño basal y el daño oxidativo total ( $\text{DT}=\text{DB}+\text{DO}$ ).

En la tabla 28 se muestran los resultados obtenidos con el ensayo del cometa, empleando como medida del daño la media del *Olive Tail moment* (OTM) obtenido en cada réplica. En conjunto, nuestros resultados indican que el daño basal y el oxidativo contribuyen en igual medida al daño total detectado en las distintas LBCLs. Por tanto, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos tipos de daño en ningún punto del estudio, excepto en los individuos CT17P y CT10.2, en los que el DO es menor que el DB ( $p=0,001$  y  $p<0,0001$ , respectivamente). De este modo, a menos que se indique otra cosa, los resultados que se comentan a continuación se referirán al DT. La representación gráfica de estos resultados se muestra en la figura 17.

LBCLs	<i>Olive Tail Moment (media±DE)</i>			
	Tiempo (pasajes)			
	P0	P2	P5	P10
<b>Familia CT17</b>				
<b>CT17P</b> (12,3 GBq)				
DB	1,62±1,30	1,57±0,11	1,82±0,76	1,68±0,01
DO	1,08	1,02±0,32	0,60±0,85	0,57±0,71
DT	2,68	2,58±0,39	2,41±0,09	2,25±0,72
<b>CT17M</b>				
DB	1,43±1,17	1,68±0,23	1,69±0,25	
DO	2,12	0,69±0,37	1,73±1,74	ND
DT	3,55	2,38±0,60	3,41±1,47	
<b>CT17.1</b>				
DB	3,14±3,29	3,09±0,64	2,88±0,57	2,49±0,09
DO	2,51	4,62±1,32	1,48±1,95	2,73±0,84
DT	5,65	7,71±0,68	4,36±1,37	5,22±0,75
<b>CT17.2</b>				
DB	3,65±2,51	2,98±0,14	2,56±0,95	2,29±0,04
DO	2,16	3,28±0,39	2,06±2,71	1,24±0,20
DT	5,81	6,26±0,53	4,62±1,80	3,54±0,23
<b>Familia CT10</b>				
<b>CT10M</b> (4,6GBq)				
DB	1,31±1,10	1,56±0,37	2,08±0,48	1,32±0,01
DO	1,65	0,84±1,18	1,56±0,80	1,28±0,40
DT	2,96	2,39±0,81	3,64±0,32	2,59±0,41
<b>CT10.1</b>				
DB	2,27±2,64	1,75±0,18	1,96±0,02	1,42±0,08
DO	1,67	1,72±0,50	1,09±1,06	2,26±0,91
DT	3,94	3,47±0,21	3,04±1,08	3,68±0,83
<b>CT10.2</b>				
DB	2,55±2,04	1,87±0,24	1,36±0,10	1,84±0,06
DO	0	0,69±0,97	0,59±0,25	0,42±0,02
DT	2,55	2,56±0,73	1,94±0,15	2,25±0,08

**Tabla 28.** Resultados del análisis de las distintas LBCLs mediante el ensayo del cometa. Se indican la media y desviación estándar del daño basal (DB), oxidativo (DO) y total (DT) para cada pasaje, medidos mediante el OTM.

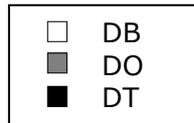
No encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,061$ ) en el DT a lo largo del tiempo en ninguna de las LBCLs analizadas. En la familia CT17, no se encontraron diferencias significativas ni entre los progenitores ( $p=0,12$ ) ni entre los dos hijos ( $p=0,39$ ). Sin embargo, los hijos muestran más daño que los padres ( $p<0,0001$  entre CT17P y sus hijos,  $p=0,0004$  entre CT17M y CT17.1,  $p<0,004$  entre CT17M y CT17.2).

## **Resultados**

---

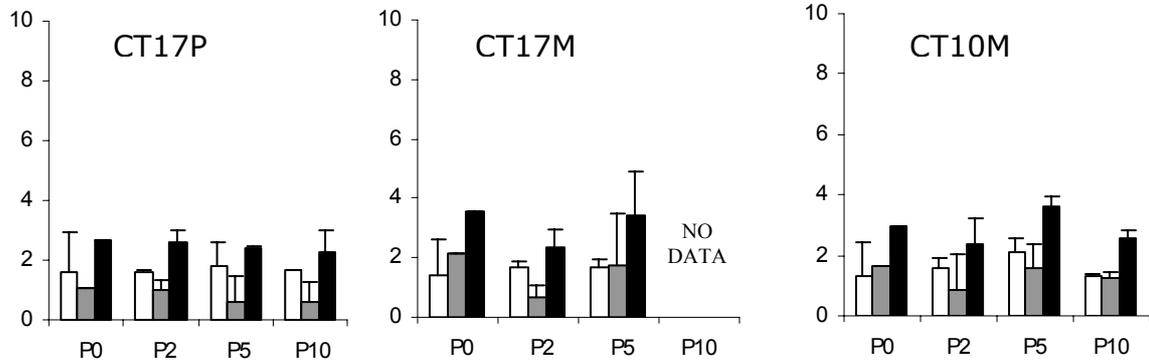
En la familia CT10 no encontramos diferencias significativas en el DT entre la madre y el hijo concebido antes del tratamiento ( $p=0,18$ ), pero sí al comparar la madre y el hijo concebido después ( $p=0,04$ ) y al comparar ambos hijos ( $p=0,002$ ). En ambos casos las diferencias se deben al DO ( $p=0,0007$  entre CT10M y CT10.2 y  $p<0,0001$  entre CT10.1 y CT10.2), siendo el hijo concebido después del tratamiento el que presentaba menos daño. Como indicamos antes, en este individuo (CT10.2) el DO era significativamente más bajo que el DB ( $p<0,0001$ ).

Familia CT17

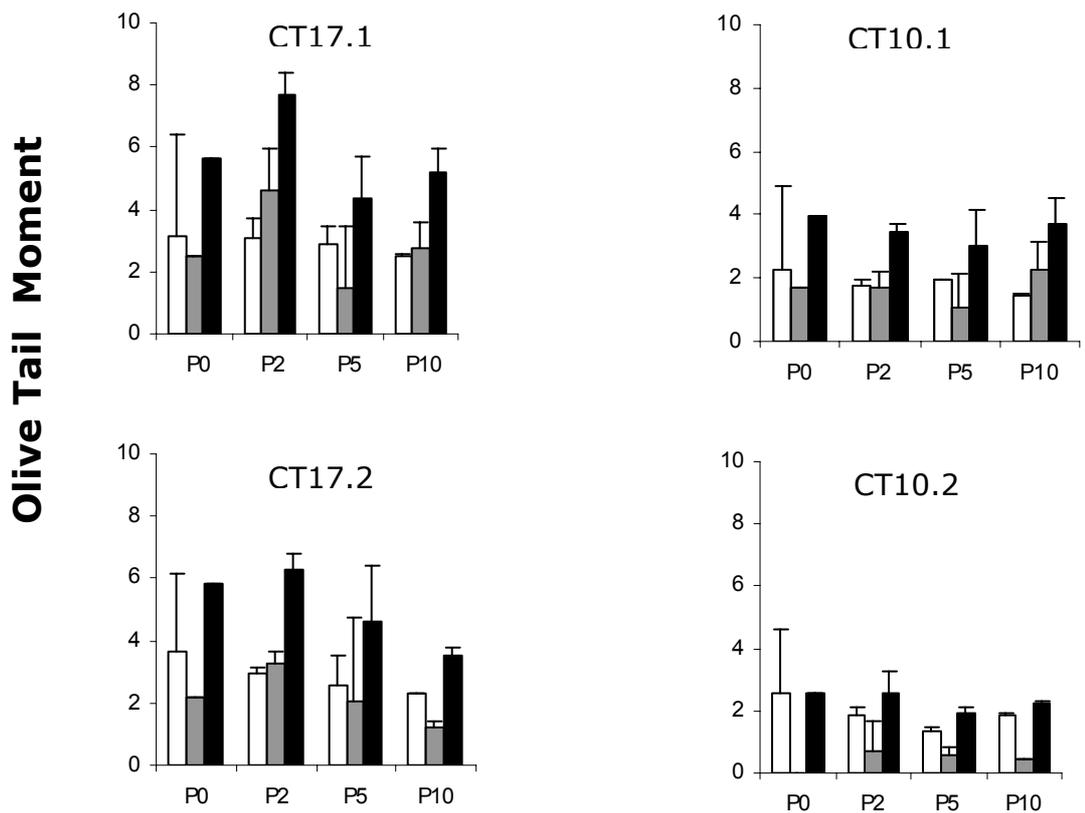


Familia CT10

Padres

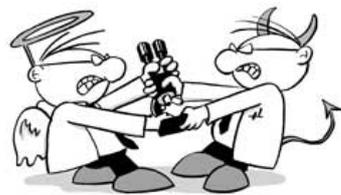


Descendencia



Pasajes

**Figura 17.** Daño genómico detectado mediante el ensayo del cometa en las LBCLs de los miembros de las familias CT17 y CT10. Se representa la media del *Olive tail moment* correspondiente al daño basal (blanco), el daño oxidativo (gris) y el daño total (negro).



## **V. DISCUSIÓN**

## V. DISCUSIÓN

### 1. Susceptibilidad al cáncer de tiroides

En los últimos años, se está analizando con mucha atención el papel de los polimorfismos genéticos en la susceptibilidad individual a padecer cáncer. Aunque la información todavía es escasa, cada vez hay más estudios cuyo objetivo es la identificación de factores genéticos de riesgo (González *et al.*, 2002; Kiyohara *et al.*, 2002; Lillie *et al.*, 2003; Ntais *et al.*, 2003). Respecto al cáncer de tiroides, a diferencia de lo que ocurre con otros tipos de cáncer con mayor incidencia (pulmón, mama, vejiga), hay pocos estudios sobre factores de susceptibilidad y la mayoría de ellos hacen referencia a factores ambientales (Farahati *et al.*, 2000; Frenzel-Beyme y Helmert, 2000; Moysich *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2003; Hamel *et al.*, 2004), que pueden interaccionar con los genéticos. También hay que tener en cuenta la importancia de los polimorfismos genéticos en la susceptibilidad al cáncer de tiroides esporádico, mucho más frecuente que el familiar. En nuestro estudio, hemos utilizado una serie de polimorfismos, tanto microsatélites como SNPs, para genotipar una población de pacientes y controles con el objetivo de determinar la posible asociación entre la susceptibilidad al cáncer de tiroides y dos regiones genómicas diferentes. Por un lado, el gen codificante del receptor  $\alpha 1$  de la hormona tiroidea (*NR1A1a*, también conocido como *c-erbA*, 17q11.2), y por otro, la región p12-13 del cromosoma 1.

#### 1.1 SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES Y EL RECEPTOR $\alpha 1$ DE LA HORMONA TIROIDEA

El gen *NR1A1a* está situado en el cromosoma 17 (17q11.2) y codifica el receptor  $\alpha 1$  de la hormona tiroidea, que se une a la hormona T3 y al DNA. Este gen tiene distintas variantes e isoformas truncadas y su expresión se ha relacionado con varios tipos de cáncer (González-Sancho *et al.*, 2003). Además, se ha sugerido una relación entre la pérdida de expresión de este gen, observada en los carcinomas anaplásicos, y la dediferenciación celular

(Wallin *et al.*, 1992; Onda *et al.*, 2002). Asimismo, se ha observado una correlación entre la expresión de este gen y la agresividad de los carcinomas de tiroides, de forma que el aumento de la expresión del receptor se relaciona con carcinomas menos agresivos (Onda *et al.*, 2002). En nuestro estudio hemos genotipado el microsatélite THRA1 (CA)<sub>n</sub>, ubicado en una región no codificante del exón 9 de dicho gen (Laudet *et al.*, 1991) y cercano a una zona de procesamiento alternativo (Onda *et al.*, 2002), en una población de 141 controles y 212 pacientes con cáncer de tiroides. Este microsatélite se ha relacionado con el nivel de expresión del gen *NR1A1a* y, por tanto, con la agresividad de los carcinomas de tiroides (Onda *et al.*, 2002). En particular, en el estudio llevado a cabo por Onda y colaboradores en 2002 con 30 muestras de tumores tiroideos, se sugiere que la disminución de la expresión del gen *NR1A1a* está relacionada con un tamaño del microsatélite THRA1 <18 repeticiones y, a la vez, con tumores más agresivos.

En nuestros resultados observamos una heterocigosidad del 70,9% en controles y 71,2% en pacientes, que concuerda con un estudio previo que describe una heterocigosidad del 78% (Sakurai *et al.*, 1992). Asimismo, tanto en controles como en pacientes el número de repeticiones CA variaba entre 14 y 26 (figura 14), lo que también concuerda con un estudio previo realizado con muestras de pacientes con cáncer de tiroides y con líneas celulares (Onda *et al.*, 2002). En nuestra población, los alelos más representados estaban formados por 18 y 20 repeticiones, correspondientes a productos de PCR de 128 y 132 pb, respectivamente y, al comparar la distribución de alelos entre ambas poblaciones (figura 14), no encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,58$ ). Dada la asociación entre la longitud de THRA1, la expresión del gen *NR1A1a* y la agresividad de los carcinomas de tiroides (Onda *et al.*, 2002), estudiamos la posible asociación de los genotipos con uno o dos alelos de tamaño menor de 128 pb o mayor de 132 pb. Mientras que los genotipos con alelos mayores de 132 pb no están asociados con la susceptibilidad al cáncer de tiroides, sí observamos que los genotipos con alelos menores de 128 pb eran dos veces más frecuentes en la población control que en la de pacientes (9,9% y 5,2%, respectivamente; OR 0,5 IC

95% 0,22-1,13). Aunque la diferencia no es estadísticamente significativa ( $p=0,09$ ), los resultados podrían indicar que los genotipos con alelos <128 pb tienen un efecto protector para el riesgo al cáncer de tiroides. Por tanto, nuestros resultados, aparentemente, no concuerdan con la afirmación de que el tamaño de THRA1 <18 repeticiones está asociado a tumores más agresivos. Sin embargo, teniendo en cuenta que el gen *NR1A1a* está implicado en la regulación génica, que afecta a distintas rutas fundamentales para la diferenciación celular (Saatcioglu *et al.*, 1993; Horwitz *et al.*, 1996; Dellovade *et al.*, 2000), nuestros resultados sugieren que repeticiones cortas del marcador THRA1 y, por tanto, una disminución de la expresión del gen *NR1A1a* podría dar lugar a un efecto protector frente a la susceptibilidad al cáncer de tiroides. A su vez, en el contexto de las células tumorales, la disminución del receptor  $\alpha 1$  de la hormona tiroidea podría estar implicada en la invasión celular, como sugieren Onda y colaboradores (2002).

## 1.2 SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES Y LA REGIÓN 1p12-13

Se han identificado numerosas regiones cromosómicas relacionadas con el cáncer de tiroides, entre ellas los dos brazos del cromosoma 1 (Tung *et al.*, 1997; Kitamura *et al.*, 2000; Kleer *et al.*, 2000; Kjellman *et al.*, 2001; Roque *et al.*, 2001; Stoler *et al.*, 2002; Wreesmann *et al.*, 2002). Este cromosoma está implicado en varios tipos de cáncer (Zhang *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2000) y, en concreto, la región 1p12-13 suele presentar distintos tipos de aberraciones (Rudolph *et al.*, 1988; Vernole *et al.*, 1989; Bieche *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1999), incluyendo reordenaciones cromosómicas (Mitelman *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 1998) y translocaciones (Ng *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta estos datos, decidimos estudiar la implicación de esta región en la susceptibilidad al cáncer de tiroides, analizando una serie de polimorfismos de la región 1p12-13.

### 1.2.1 Análisis del microsatélite BAT-40

En primer lugar, analizamos el microsatélite BAT-40 (A)<sub>n</sub> en una población española de 138 controles y 207 pacientes. Este microsatélite está situado en el segundo intrón del gen 3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (*HSD3β1*, 1p13.1) (Lachance *et al.*, 1990; McBride *et al.*, 1999), que se ha relacionado con el cáncer de próstata (Chang *et al.*, 2002). Es un marcador muy polimórfico, ampliamente utilizado en estudios poblacionales (Zhou *et al.*, 1997; Samowitz *et al.*, 1999; Yokozaki, 2000; Bacon *et al.*, 2001; Mukherjee *et al.*, 2002), por lo tanto, en este estudio nos sirve, además, como posible marcador de otros factores genéticos de riesgo implicados en el cáncer de tiroides.

En este estudio, las frecuencias genóticas del marcador BAT-40 en los grupos de controles y pacientes muestran una heterocigosidad similar, con una media de 36,8%, que difiere del 59,7% observado en una población escocesa (Bacon *et al.*, 2001), así como de la heterocigosidad descrita en otras poblaciones, que varía de un 14,6% en una población japonesa (Yokozaki, 2000) a un 72% en poblaciones americanas (Zhou *et al.*, 1997).

Por otro lado, la distribución de alelos del microsatélite BAT-40 es bimodal, lo que concuerda con lo descrito en otros grupos analizados (Zhou *et al.*, 1997; Samowitz *et al.*, 1999; Bacon *et al.*, 2001). Al comparar las frecuencias alélicas entre controles y pacientes se observa que, en este último grupo, hay un intervalo de alelos mayor, que abarca un mayor número de alelos cortos (110-130 y 96-130, respectivamente, ver figura 15). Además, el intervalo de alelos de 111-115 pb es más frecuente en los controles que en los pacientes ( $p=0,008$ , test de Fisher). Esta diferencia también se refleja en el análisis de genotipos y las *odds ratios* indican que los genotipos con alelos de 111-115 pb tienen un efecto protector para la susceptibilidad al cáncer de tiroides en la población estudiada (OR=0,18, IC 95% 0,01-0,57,  $p=0,02$ ). Este efecto protector no está asociado con el tipo de cáncer de tiroides (papilar o folicular, test de Fisher). En el caso de los genotipos formados por alelos <111

pb o >125 pb, también se encuentran diferencias entre controles y pacientes, estando dos veces más representados en pacientes, aunque no se observó asociación con la susceptibilidad al cáncer de tiroides ( $p=0,2$  y  $0,3$ , respectivamente; ver tabla 13). Es muy probable que esta falta de asociación sea debida a la baja frecuencia de individuos portadores de dichos alelos en nuestra población y al tamaño de la muestra estudiada, ya que sólo encontramos un total de 13 individuos con genotipos portadores de alelos <111 pb, y 10 con alelos >125 pb. Sin embargo, no se debe descartar la importancia de este resultado ya que, teniendo en cuenta que las mutaciones que se producen en repeticiones de mononucleótidos tienden a la expansión (Farrall y Weeks, 1998; Ellegren, 2000), es improbable que la mayor frecuencia de alelos <111 pb observada en el grupo de pacientes sea debida al azar, por lo tanto, nuestros resultados indican que el microsatélite BAT-40 podría un ser un marcador genético de susceptibilidad al cáncer de tiroides.

El análisis de las características clinicopatológicas de los pacientes con alelos <111 pb, >125 pb muestra que no existen diferencias significativas respecto al sexo, edad de diagnóstico, tipo de cáncer o antecedentes familiares de cáncer, aunque son necesarios más análisis para confirmar este resultado.

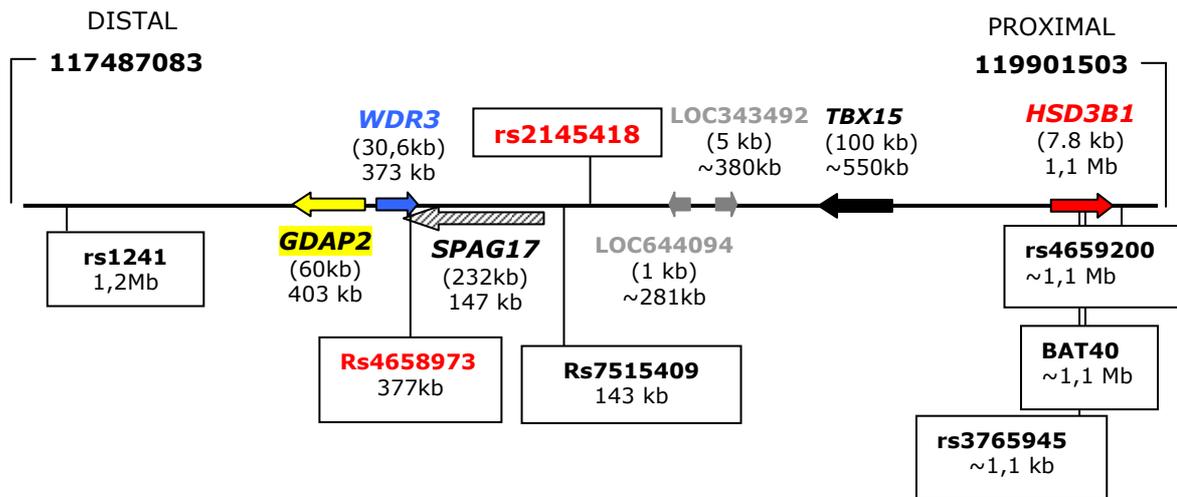
Por otro lado, se han identificado distintas variantes del gen *HSD3B1* relacionadas con el cáncer de próstata (Chang *et al.*, 2002), pero no referentes al microsatélite BAT-40. Tampoco existen indicios de que los polimorfismos en BAT-40, situado en el intrón 2, tengan alguna consecuencia biológica. Por tanto, podemos descartar que los resultados obtenidos en nuestro estudio estén relacionados con un efecto directo del gen *HSD3B1* en la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Sin embargo, nuestros resultados indican que la región del cromosoma 1 donde se ubica el microsatélite BAT-40 contiene algún gen o genes relacionados con la susceptibilidad al cáncer de tiroides, cuyas variantes podrían tener un efecto protector o de riesgo en la susceptibilidad al cáncer de tiroides.

### 1.2.2 Análisis de SNPs en la región 1p12-13

Con el fin de ampliar el estudio previo en el que se sugiere la implicación del brazo pequeño del cromosoma 1 en la susceptibilidad al cáncer de tiroides, se genotiparon 6 polimorfismos no codificantes que abarcan una región de, aproximadamente, 2,5 Mb alrededor del microsatélite BAT-40 (figura 18). Para la elección de los polimorfismos se empleó como criterio la frecuencia alélica y la posibilidad de análisis mediante PCR-RFLP. El polimorfismo rs3765945 se encuentra en el tercer intrón del gen *HSD3 $\beta$ 1*, a 3,3 kb del microsatélite BAT-40, por lo que su análisis nos proporciona resultados adicionales que nos permitieran ratificar nuestra hipótesis de la falta de implicación directa del gen *HSD3 $\beta$ 1* en la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Los polimorfismos restantes nos permitirán delimitar, dentro de esta región, el factor o factores de susceptibilidad.

Como mencionamos anteriormente los seis SNPs estudiados están en regiones no codificantes. Sin embargo, esto no limita la importancia de su posible asociación con la susceptibilidad al cáncer de tiroides, ya que podrían afectar a la regulación y expresión génica o al procesamiento del RNA mensajero (Cordell y Clayton, 2005; Johnson *et al.*, 2005; Raponi *et al.*, 2006; Bu *et al.*, 2006). De hecho, se han relacionado distintos polimorfismos intrónicos con varias enfermedades y hasta un 40% de los sitios de unión de factores de transcripción se localizan en intrones (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005; Bu *et al.*, 2006). Además, en nuestro estudio, el propósito de la utilización de estos SNPs era su uso como marcadores de genes de susceptibilidad al cáncer de tiroides.

En nuestra población, los SNPs rs2145418 y rs4658973 mostraron una clara asociación con el cáncer de tiroides, mientras que los SNPs rs4659200, rs3765945, rs7515409 y rs1241 no mostraron asociación. En la figura 18 se muestra la posición relativa de los SNPs estudiados respecto al polimorfismo de riesgo rs2145418.



**Figura 18.** Representación gráfica de la región 1p12-13 donde se muestra la posición de los SNPs estudiados con respecto a rs2145418. Las flechas indican los genes ubicados en esa región, cuyo tamaño se indica entre paréntesis.

El polimorfismo rs4685973 (T>G) muestra asociación con el cáncer de tiroides, de forma que los individuos portadores del alelo variante G presentan protección al cáncer de tiroides. En la población estudiada, el grado de protección, representado por el valor de *odds ratio*, es de 2,5 para los heterocigotos y 14,28 para los homocigotos variantes. El SNP rs4685973 está situado en el intrón 25 del gen *WDR3*, que se solapa con la region UTR 3' del gen *SPAG17* (*Sperm associated antigen 17*; nº de acceso GenBank 200162), recientemente identificado en humanos y anteriormente denominado *PF6* (Zhang *et al.*, 2005). Hasta la fecha, no existen estudios sobre la asociación de estos genes con la susceptibilidad al cáncer de tiroides. En concreto, el gen *SPAG17* humano es un ortólogo del gen *PF6* de *Chlamydomonas*, que codifica un componente fundamental para la estructura y función de los flagelos. En humanos y ratones la expresión del gen *SPAG17* concuerda con su función en la estructura flagelar del espermatozoide (Zhang *et al.*, 2005). Por tanto, en principio estas características descartan al gen *SPAG17* como responsable de la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Por otro lado, el gen *WDR3* codifica una proteína que pertenece a una familia de proteínas muy conservadas en eucariotas, caracterizadas por la presencia de repeticiones WD (unidades de aproximadamente 40 aminoácidos iniciadas por el dipéptido Gly-His en el

extremo amino terminal, y que finalizan con un dipéptido Trp-Asp en el carboxilo terminal), que están implicadas en una gran variedad de procesos celulares entre los que se incluyen: progresión del ciclo celular, transducción de señales, apoptosis y regulación génica (Van der Voorn y Ploegh, 1992; Neer *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999). La caracterización del gen *WDR3* muestra que codifica una proteína nuclear de 943 aminoácidos que contiene 10 repeticiones WD y se expresa en la gran mayoría de los tejidos, incluyendo el tiroides (Claudio *et al.*, 1999; <http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>), pero cuya función es desconocida. En 1999, Claudio y colaboradores ubicaron este gen en la región 1p12-13 que, a su vez, se encuentra alterada en tumores sólidos y hematológicos (Mitelman *et al.*, 1997), lo que sugiere la posible implicación de *WDR3* en los procesos tumorales. Asimismo, se han encontrado mutaciones en genes pertenecientes a esta familia en una serie de enfermedades humanas, como por ejemplo el síndrome de Cockayne (Li y Roberts, 2001). Esta serie de datos, junto con nuestros resultados con el SNP rs4658973, hace que no se pueda descartar la posible implicación del gen *WDR3* en la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Cerca del gen *WDR3* se localiza el gen *GDAP2* (nº de acceso GenBank 54834; ver figura 18), que forma parte de un grupo de genes (*GDAP1-10*) implicados en un proceso de transducción de señales asociado con la diferenciación de las células de neuroblastoma de ratón Neuro2A (Liu *et al.*, 1999). Por tanto, el papel atribuido a este gen en la diferenciación celular justificaría la hipótesis de su posible implicación en la susceptibilidad al cáncer de tiroides.

Con referencia a nuestros resultados con el SNP rs4658973, hay que destacar que, en el análisis de la asociación con la susceptibilidad al cáncer de tiroides, el alelo menos representado o variante, G, mostró un efecto protector. Sin embargo, dado que la frecuencia de los dos alelos de este *locus* es muy similar (G=0,48 y T=0,52), la designación del alelo variante es prácticamente arbitraria y, por tanto, la asignación del alelo G o T como variante dará lugar a un efecto protector o de riesgo, respectivamente.

Por otro lado, el alelo variante G del SNP rs2145418 está más representado en el grupo de pacientes, y los genotipos homocigoto variante y heterocigoto están claramente asociados con la susceptibilidad al cáncer de tiroides (ver tabla 17), con *odds ratios* de 9,2 en homocigotos y 5 en heterocigotos ( $p < 0,0001$ ); lo que indica que los portadores de un solo alelo variante tienen un incremento del riesgo. El hecho de que este SNP no esté en equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de controles puede ser debido a tres razones:

1. problemas de genotipado
2. problemas de selección (ej. si el SNP se asocia a la longevidad y los individuos son de edad avanzada)
3. azar: el test de equilibrio asume un 5% de probabilidad de error, por lo que la muestra puede haberse seleccionado mal por azar aunque la población esté en equilibrio

En nuestro caso se comprobó la reproducibilidad del genotipado repitiendo el análisis de las muestras con resultado dudoso. Además, la frecuencia observada de homocigotos variantes GG en la población control es mayor que la esperada, por lo que no consideramos que un efecto de selección contrario al genotipo portador del alelo variante sea la razón de las diferencias halladas. Aún así, en el análisis de los resultados se tuvo en cuenta este desequilibrio. El polimorfismo rs2145418 se encuentra en una región no codificante en la que, hasta la fecha, no se ha descrito ningún gen; por tanto, es muy improbable que sea el causante directo de la asociación descrita. Sin embargo, la asociación observada podría deberse a algún otro factor próximo, no identificado todavía, que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con dicho SNP. Ninguno de los otros polimorfismos analizados se encuentra en desequilibrio de ligamiento con rs2145418, probablemente debido a que se encuentran relativamente alejados de él. De hecho, el SNP más cercano se encuentra a 143 kb (rs7515409), distancia en la que, por recombinación, sería poco probable que se diera un desequilibrio de ligamiento. Por tanto, es plausible pensar que rs2145418 es un marcador de susceptibilidad de la

región y, al igual que para rs4658973, cualquier gen descrito en esta zona podría ser el responsable de la susceptibilidad al cáncer de tiroides, como es el caso de los genes *WDR3* y *GDAP2*, situados a 373 kb y 403 kb del SNP rs4658973. Asimismo, en la región más proximal se encuentra el gen *TBX15* (nº de acceso GenBank 6913), a 550 kb del mismo marcador. Este gen pertenece a la familia génica *T-box* y codifica un factor de transcripción implicado en importantes procesos reguladores de la transcripción durante el desarrollo (Agulnik *et al.*, 1998).

Hay que destacar que el análisis de la interacción de los polimorfismos rs2145418 y rs4658973 que, individualmente, muestran asociación con el cáncer de tiroides, no mostró que la combinación de genotipos de estos marcadores modificara de algún modo dicha asociación. Por tanto, dichos SNPs podrían estar ligados a factores de susceptibilidad diferentes o, por el contrario, ser indicadores del mismo factor.

### 1.2.2.1 Efecto modulador de factores genético-ambientales

En general, en todos los SNPs se observó una tendencia clara en la que para un mismo genotipo el sexo masculino está asociado con una reducción del riesgo (tabla 21). Estos datos concuerdan con la bibliografía, ya que el cáncer de tiroides es de dos a tres veces más frecuente en mujeres que en hombres (Grebe y Hay, 1995; Navarro *et al.*, 2005) y, además, la incidencia aumenta durante la edad reproductiva, por lo que se ha sugerido la implicación de las hormonas femeninas, en concreto los estrógenos (La Vecchia *et al.*, 1999), cuyo papel en la etiología del tiroides se está estudiando con gran interés. De hecho, en los carcinomas de tiroides y en particular en las variedades bien diferenciadas, se han observado receptores de estrógenos (Chaudhuri y Printz, 1989; Miki *et al.*, 1990; Takeichi *et al.*, 1991). Además, en 1990, Mori y colaboradores en un estudio con ratones, describieron que los estrógenos, en concreto el estradiol, inducen la tumorigenesis en el tiroides (Mori *et al.*, 1990). Estos resultados han sido corroborados por otros investigadores (Son *et al.*, 2003; Thiruvengadam *et al.*, 2003).

En cuanto a la edad del individuo como factor modulador del riesgo, en nuestro análisis tuvimos en cuenta dos grupos: los individuos con edad superior a 45 años y los individuos con edad igual o inferior a 45 años (ver tabla 22). Este valor de edad de corte fue seleccionado teniendo en cuenta que, en nuestra población, aproximadamente un 80% de los pacientes presentan cáncer papilar, y que la edad media de aparición de este tipo de cáncer es a los 45 años. Existen numerosos estudios que indican que la edad es el principal factor de riesgo en la mayoría de los tipos de cáncer, incluso se ha descrito que el 60% de las neoplasias se desarrollan en personas mayores de 65 años y que, en general, las personas mayores de 65 años tienen 10 veces más posibilidades de desarrollar cáncer y 15 veces más posibilidades de morir debido al cáncer (Jemal *et al.*, 2005; Yancik, 2005). Sin embargo, en nuestro estudio la edad no parece tener un efecto modulador del riesgo, probablemente debido al sesgo de edad de la población analizada, ya que la mayoría de los individuos tienen una edad  $\leq 45$  años.

Por otro lado, en todos los SNPs observamos una tendencia general a una reducción del riesgo asociada al consumo de alcohol y tabaco (tablas 23 y 24). Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se observó una disminución del riesgo de hasta un 40% en fumadores, independientemente del sexo, la edad y la zona geográfica (Berta *et al.*, 1991; Fukayama *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1993; Mack *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios llevados a cabo por Iribarren y colaboradores (2001) y Navarro y colaboradores (2005) no pudieron establecer una asociación entre cáncer de tiroides y el consumo de tabaco (Iribarren *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2005). Existen distintas explicaciones a la posible asociación entre el consumo de tabaco y la reducción del riesgo de cáncer de tiroides. Por un lado, se piensa que un aumento de los niveles de TSH podría incrementar el riesgo a padecer cáncer de tiroides (Henderson *et al.*, 1982; Williams, 1990), y los fumadores (tanto mujeres como hombres) presentan niveles inferiores de TSH que los ex-fumadores y no fumadores (Christensen *et al.*, 1984; Ericsson y Lindgarde, 1991; Fisher *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha asociado el tabaco con un mayor riesgo de bocio (Christensen *et al.*, 1984; Hegedus *et al.*, 1985;

Ericsson y Lindgarde, 1991) que, a su vez, es un factor de riesgo (o al menos un antecedente) del cáncer de tiroides (Franceschi *et al.*, 1999). Según estos datos, aunque el tabaco provoca un aumento de tamaño del tiroides, la aparente disminución del riesgo de cáncer sugiere que este compuesto actúa de diversas formas sobre la glándula, y que la asociación observada no es debida a alteraciones en el tamaño (Mack *et al.* 2003). Otra explicación plausible radica en el potencial efecto anti-estrogénico del tabaco (Baron *et al.*, 1990; Galanti *et al.*, 1997), lo que explicaría también la disminución del riesgo a padecer cáncer de endometrio en las mujeres fumadoras (Mack *et al.*, 2003).

De igual modo, también se ha observado una asociación entre el consumo de alcohol y la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Aunque en un principio se sugirió que el consumo de alcohol podría aumentar el riesgo de cáncer de tiroides mediante el incremento de los niveles de TSH (Ron *et al.*, 1987), hay numerosos estudios que han descrito una disminución del riesgo de cáncer de tiroides asociada al consumo de alcohol (Rossing *et al.*, 2000; Knudsen *et al.*, 2001). Aunque también existen estudios que no han podido detectar ninguna asociación (Iribarren *et al.*, 2001; Mack *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2005).

## 2. Efecto a largo plazo del $^{131}\text{I}$

Desde hace tiempo se conoce que la exposición a la radiación ionizante provoca distintos tipos de alteraciones en el genoma. De hecho, durante mucho tiempo se pensó que la importancia biológica de este tipo de radiación radicaba exclusivamente en su acción directa sobre el DNA y sus efectos sobre la célula irradiada. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la radiación puede inducir inestabilidad genómica en células que no han sido directamente irradiadas, durante un periodo de tiempo considerable tras la irradiación (hasta cuatro años en algunos casos). Este efecto se ha descrito tanto en cultivos celulares como en estudios *in vivo*, donde los efectos se

aprecian en los descendientes de organismos irradiados. Este comportamiento forma parte del denominado efecto indirecto de la radiación ionizante (Morgan, 2003b; Barber y Dubrova, 2006; Little, 2006). El descubrimiento de la inestabilidad genómica inducida por la radiación ha provocado un aumento del interés en conocer los efectos de la exposición a largo plazo, incluyendo la transmisión de estos efectos a la descendencia, lo que se conoce como inestabilidad transgeneracional. Así, en los últimos años han surgido numerosos estudios encaminados a desentrañar si la inestabilidad genómica inducida por la radiación ionizante podría transmitirse a los descendientes a través de la línea germinal y afectar a su tasa de mutación e, incluso, influir en la carcinogénesis (Dubrova, 2003a; Niwa, 2003; Barber y Dubrova, 2006).

En este contexto, el principal objetivo de nuestro estudio fue el análisis a largo plazo de la inestabilidad genómica inducida por la radiación en humanos. Para ello, estudiamos dos familias en las que uno de los progenitores, paciente con cáncer de tiroides, había sido tratado con  $^{131}\text{I}$ , 17 y 7 años antes del estudio, respectivamente. Se establecieron líneas celulares linfoblastoides de cada uno de los miembros de las familias y se realizaron los ensayos del cometa y de micronúcleos para estimar el daño genético producido en los cultivos celulares a lo largo de sucesivas divisiones celulares, para tratar de detectar indicios de inestabilidad genómica. Consideramos que este diseño experimental nos permitiría detectar el posible efecto genético a largo plazo tanto en células somáticas (al comparar los padres entre sí y cada individuo a lo largo de las sucesivas divisiones de las LBCLs obtenidas a partir de sus linfocitos), como en la línea germinal (comparando padres con hijos y hermanos concebidos antes y después del tratamiento).

Hay numerosos estudios que han empleado los ensayos de micronúcleos y del cometa para la detección del efecto del  $^{131}\text{I}$  en linfocitos de sangre periférica (Livingston *et al.*, 1993; Plappert *et al.*, 1997; Gutiérrez *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 1999; Ballardín *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2004). En estos estudios se detectó un incremento significativo de la frecuencia de MN, reflejo del efecto directo del  $^{131}\text{I}$ , así como un incremento del daño detectado

por el ensayo del cometa, que se suele reparar a las pocas horas siguientes. Además, algunos de los estudios mencionados muestran la persistencia de parte de los MN inducidos durante un período relativamente largo de tiempo, desde unas pocas semanas hasta tres años, que se corresponde con la vida media de los linfocitos (Livingston *et al.*, 1993; Gutiérrez *et al.*, 1999; Monteiro-Gil *et al.*, 2000; Ballardin *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2004). En el caso del ensayo del cometa, se ha detectado daño en el DNA de niños de Chernobyl 10 años después del accidente, posiblemente como consecuencia del daño producido en las células madre de la línea hematopoyética (Frenzilli *et al.*, 2001).

Por otro lado, en 1976 Luning y colaboradores observaron el primer indicio de inestabilidad transgeneracional en la descendencia de ratones a los que se había inyectado sales de plutonio (Luning *et al.*, 1976). Más adelante, otros estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, realizados en su mayoría con ratones y analizando frecuencias de mutación (especialmente de secuencias minisatélite), corroboraron dicho descubrimiento (Luke *et al.* 1997; Barber *et al.*, 2002; Barber *et al.*, 2006). Sin embargo, no se puede asegurar que esta inducción y transmisión de inestabilidad genética ocurra también en los seres humanos. La mayor parte de los estudios realizados analizan aberraciones cromosómicas, micronúcleos y minisatélites, y muestran resultados negativos, tanto en células somáticas (Littlefield *et al.*, 1997; Salomaa *et al.*, 1998; Whitehouse y Tawn, 2001) como en la línea germinal (Kodaira *et al.*, 2004; Tawn *et al.*, 2005; Rees *et al.*, 2006). Entre estos resultados negativos, en 1997, Littlefield y colaboradores no pudieron detectar un incremento en la inestabilidad genómica de un individuo que durante 40 años había sido irradiado internamente con partículas  $\alpha$ , aunque sí se detectaron aberraciones cromosómicas estables que probaban la irradiación de la médula ósea. Asimismo, en 1998, Salomaa y colaboradores, en un seguimiento de hombres expuestos accidentalmente a  $^{137}\text{Cs}$ , no observaron inestabilidad genómica en cultivos de linfocitos a corto plazo, aunque hay que señalar que a largo plazo, los cultivos de los individuos, tanto expuestos como no expuestos, presentaban células con inestabilidad cromosómica. En cuanto a la

inestabilidad en la línea germinal, Kodaira y colaboradores analizaron ocho *loci* microsatélite en los descendientes de supervivientes de la bomba atómica y no observaron la transmisión de inestabilidad genómica. Asimismo, en un estudio reciente (Tawn *et al.*, 2005) en el que se analizaron 25 individuos que habían recibido radioterapia en su infancia, así como sus cónyuges y 43 descendientes, no se pudo detectar que la irradiación hubiera provocado una inestabilidad genómica que se transmitiera a la descendencia. Otro estudio de 2006 de Rees y colaboradores analizando minisatélites en 24 familias danesas en las que uno de los progenitores había sido tratado con radioterapia en la infancia o adolescencia tampoco mostró un incremento en la tasa de mutación de minisatélites en la línea germinal (Rees *et al.*, 2006). Sin embargo, una serie de estudios llevados a cabo por Dubrova y colaboradores en distintos años (revisado por Bouffler *et al.*, 2006) en familias residentes en los alrededores de la central nuclear de Chernobyl, así como en una región de la Unión Soviética sometida a pruebas nucleares, y en las que los padres habían sido irradiados, mostró que la tasa de mutación de minisatélites en la línea germinal era significativamente más elevada que en los controles. Hay que indicar que, en los estudios con resultados positivos más recientes, realizados por el grupo de Dubrova, se empleó el análisis de minisatélites para evaluar la inestabilidad, mientras que en la mayoría de los estudios con resultados negativos, excepto el de Rees y colaboradores, se analizaron aberraciones cromosómicas, FISH y micronúcleos. Por tanto, habría que estudiar con más detalle la adecuación de las distintas técnicas en el análisis de la inestabilidad genómica.

A pesar de que la mayoría de los resultados son negativos, existe cierta controversia respecto al papel de la inestabilidad genómica transgeneracional como potencial carcinógeno en la descendencia de individuos expuestos (Goldberg, 2003; Barber y Dubrova, 2006). Existen diversos estudios con ratones expuestos a rayos X que parecen probar esta teoría (revisado por Barber y Dubrova, 2006). En humanos, los datos son contradictorios. En 1990, Gardner y colaboradores observaron un incremento de 6 a 8 veces en la incidencia de cáncer (especialmente leucemia) en los descendientes de

trabajadores de la central nuclear de Sellafield, expuestos a 10-100 mSv de radiación antes de la concepción; así como un incremento de abortos (Gardner *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1999). Sin embargo, no se detectó ningún incremento en los descendientes de los supervivientes del bombardeo de Hiroshima y Nagasaki, expuestos a una dosis media de 435 mSv (Nomura, 2003), ni en otros estudios similares con trabajadores expuestos a dosis menores. Esta discrepancia entre modelos humanos y ratones podría ser debida a que en los experimentos con modelos animales se emplean dosis mayores (0,3-5 Gy) que en los estudios epidemiológicos y que, tanto en las distintas poblaciones humanas como en las cepas de ratones, existen diferencias en la predisposición genética (Nomura, 2003).

En nuestro caso, el resultado de nuestro estudio mediante los ensayos de micronúcleos y del cometa analizando LBCLs de los distintos individuos corrobora los estudios anteriores, ya que no pudimos detectar que el tratamiento con  $^{131}\text{I}$  realizado 17 y 7 años antes del estudio hubiera inducido una inestabilidad genómica que persistiera en las sucesivas generaciones celulares ni en la descendencia de los individuos. No se observaron diferencias significativas en el daño genómico al comparar el progenitor tratado y su cónyuge en el caso de la familia CT17, ni los hijos concebidos antes y después del tratamiento (en ambas familias). Por otro lado, estudios con MN han demostrado que la frecuencia de éstos se incrementa con la edad (Migliore *et al.*, 1991; Fenech, 1993). En nuestro estudio, sólo observamos una asociación entre daño y edad en la familia CT17, en la que la frecuencia de MN es mayor en los padres, pero no llega a ser estadísticamente significativa ( $p=0,06$ ). Sin embargo, en la familia CT10 los hijos presentaban una frecuencia de micronúcleos mayor que la madre. Por otro lado, en los resultados obtenidos con el ensayo del cometa el daño total detectado en los padres era menor que el detectado en los hijos. Si tenemos en cuenta que, aparentemente, la edad no es un factor de confusión en este ensayo (Maluf, 2004) y que su efecto es lo suficientemente débil como para no detectarlo con una muestra tan pequeña, consideramos que el mayor daño detectado en los descendientes de ambas familias probablemente sea causado por algún otro factor o hábito o

por una simple variación estocástica. En cuanto al tratamiento con  $^{131}\text{I}$ , el daño detectado mediante el ensayo del cometa se mantenía relativamente estable a lo largo de las sucesivas divisiones celulares en ambas familias. Sin embargo, se detectó una tendencia hacia el aumento de la frecuencia de MN en la familia CT17, aunque no es estadísticamente significativa ( $p=0,09$ ). Hay que señalar que este resultado concuerda con un estudio en el que se detectó un incremento de aberraciones cromosómicas en cultivos celulares linfoblastoides de individuos irradiados con rayos  $\gamma$  mantenidos durante varias generaciones (Salomaa *et al.*, 1998).

Como conclusión, en nuestro estudio no observamos una transmisión del efecto del tratamiento con  $^{131}\text{I}$  a la línea germinal. No encontramos diferencias significativas en el daño genómico detectado por los ensayos del cometa y de MN en los hijos engendrados antes y después del tratamiento, lo que concuerda con dos estudios recientes que, analizando aberraciones cromosómicas y minisatélites, tampoco pudieron demostrar el efecto transgeneracional de la radiación (Kodaira *et al.*, 2004; Tawn *et al.*, 2005; Rees *et al.*, 2006). En conjunto, nuestros resultados indican que las diferencias detectadas entre los miembros de las familias no son debidas al tratamiento radiactivo, que no influye en la inestabilidad genómica de los individuos tratados ni de su descendencia. En todo caso, teniendo en cuenta las posibles diferencias interindividuales en la respuesta a la radiación y la limitación de la muestra, tenemos que señalar la posibilidad de que nuestras condiciones experimentales carezcan de la sensibilidad necesaria para detectar el efecto de la radiación. Aún así, nuestros resultados se suman al escaso número de publicaciones existentes acerca de la transmisión, en humanos, de inestabilidad genómica inducida por la radiación. Puesto que la gran mayoría de estos estudios han obtenido resultados negativos, parece haber cierta reserva para afirmar la inducción *in vivo* de inestabilidad genómica debido a la exposición a radiación en humanos. Por tanto, son necesarios más estudios para determinar el efecto indirecto de la radiación ionizante en humanos.



## VI. CONCLUSIONES

Del análisis y discusión de los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La distribución alélica y la heterocigosidad de los microsatélites THRA1 y BAT-40 en la población estudiada concuerdan con los resultados de otras poblaciones analizadas en la literatura.
2. Los genotipos portadores de alelos con repeticiones cortas de THRA1 (<18 repeticiones CA) podrían tener un efecto protector respecto a la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Este efecto protector podría estar relacionado con el nivel de expresión del gen codificante del receptor  $\alpha 1$  de la hormona tiroidea.
3. Los genotipos portadores de alelos del intervalo de repeticiones  $A_{25}-A_{29}$  del microsatélite BAT-40 muestran un efecto protector respecto a la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Asimismo, los genotipos portadores de alelos con un número de repeticiones menor de 25 o mayor de 29 podrían estar asociados con el riesgo de cáncer de tiroides. Por lo tanto, proponemos al microsatélite BAT-40 como posible marcador genético de susceptibilidad al cáncer de tiroides.
4. El análisis de susceptibilidad llevado a cabo con el microsatélite BAT-40 y con seis polimorfismos de la región 1p12-13 indica que esta región del cromosoma 1 está asociada con la susceptibilidad al cáncer de tiroides.
5. En nuestra población, cuatro de los polimorfismos de la región 1p12-13 (rs1241, rs7515409, rs3765945 y rs4659200) no muestran asociación con el cáncer de tiroides. Sin embargo, los polimorfismos rs2145418 y rs4658973 muestran una asociación muy significativa.
6. Los genotipos con el alelo variante G del marcador rs2145418 presentan riesgo de cáncer de tiroides, con *odds ratios* de 5 y 9,2 en heterocigotos y homocigotos, respectivamente. Puesto que no se ha descrito ningún

- gen próximo a este marcador, consideramos que el responsable de la asociación detectada podría ser un factor todavía sin identificar.
7. Los genotipos con el alelo variante G del marcador rs4658973 muestran una protección al cáncer de tiroides, con *odds ratios* de 0,4 y 0,07 en heterocigotos y homocigotos, respectivamente. Dado que este polimorfismo está situado en el intrón 25 del gen *WDR3*, que podría estar implicado en procesos de regulación génica y progresión del ciclo celular, postulamos la posible implicación de este gen en la susceptibilidad al cáncer de tiroides.
  8. En nuestra población, no existe interacción entre los marcadores rs2145418 y rs4659873, ambos asociados de forma independiente con la susceptibilidad al cáncer de tiroides.
  9. En todos los SNPs se observó una tendencia general en la que, para un mismo genotipo, el sexo masculino está asociado con una reducción del riesgo. Asimismo, se observó una tendencia general de reducción del riesgo asociada al consumo de alcohol y tabaco. Sin embargo, no se pudo determinar ningún tipo de asociación entre la edad del individuo y la susceptibilidad al cáncer de tiroides.
  10. En nuestras condiciones experimentales, no pudimos detectar que el tratamiento con  $^{131}\text{I}$  produzca una inestabilidad genómica que persista en las sucesivas generaciones celulares, ni su transmisión a la línea germinal.
  11. Teniendo en cuenta las diferencias interindividuales en la respuesta al daño genético de cada individuo, y que partimos de sólo dos familias, no descartamos que nuestro estudio carezca de la sensibilidad necesaria para detectar la inducción de daño genético a largo plazo, en especial si se trata de un efecto débil.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

**VII. BIBLIOGRAFIA**

- Adeniran A.J., Zhu Z., Gandhi M., Steward D.L., Fidler J.P., Giordano T.J., Biddinger, P.W. y Nikiforov Y.E. (2006) Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.*, 30: 216-222.
- Agulnik S.I., Papaioannou V.E. y Silver L.M. (1998) Cloning, mapping, and expression analysis of *TBX15*, a new member of the T-Box gene family. *Genomics*, 51: 68-75.
- Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A.T., Norppa H., Shuker D.E., Tice R. *et al.* (2000) IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.*, 463: 111-172.
- Almudévar E., Puras A., De Miguel C., Urbiola E., López A., Menéndez E., García de Jalón J. y Romeo I. (2000) Aplicación de las oncoproteínas p21RAS, p53, Bcl-2 y del factor de proliferación celular Ki-67(MIB-1) en el diagnóstico y pronóstico de tumores tiroideos. *Anal. Sistem. Sanit. Navarra*, 23: 247-256.
- Bacon A.L., Dunlop M.G. y Farrington S.M. (2001) Hypermutability at a poly(A/T) tract in the human germline. *Nucleic Acids Res.*, 29: 4405-4413.
- Bal C., Kumar A., Tripathi M., Chandrashekar N., Phom H., Murali N.R., Chandra P. y Pant G.S. (2005) High-dose radioiodine treatment for differentiated thyroid carcinoma is not associated with change in female fertility or any genetic risk to the offspring. *Int. J. Radiat. Oncol.*, 63: 449-455.
- Ballardin M., Gemignani F., Bodei L., Mariani G., Ferdeghini M., Rossi A.M., Migliore L. y Barale R. (2002) Formation of micronuclei and of clastogenic factor(s) in patients receiving therapeutic doses of iodine-131. *Mutat. Res.*, 514: 77-85.
- Balmain A., Gray J. y Ponder B. (2003) The genetics and genomics of cancer. *Nat. Genet.*, 33: 238-244.

## **Bibliografía**

---

- Banath J.P., Wallace S.S., Thompson J. y Olive P.L. (1999) Radiation-induced DNA base damage detected in individual aerobic and hypoxic cells with endonuclease III and formamidopyrimidine-glycosylase. *Radiat. Res.* 151: 550-558.
- Barber R., Plumb M.A., Boulton E., Roux I. Y Dubrova Y.E. (2002) Elevated mutation rates in the germ line of first- and second-generation offspring of irradiated male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 6877-6882.
- Barber R.C. y Dubrova Y. (2006) The offspring of irradiated parents, are they stable? *Mutat. Res.*, 598: 50-60.
- Barber R.C., Hickenbotham P., Hatch T., Kelly D., Topchiy N., Almeida G.M., Jones G.D., Johnson G.E., Parry J.M., Rothkamm K. y Dubrova Y.E. (2006) *Oncogene*, 5 (en prensa).
- Baron J.A., LaVecchia C. y Levi F. (1990) The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 162: 502-514.
- Bauer A.J., Cavalli L.R., Rone J.D., Francis G.L., Burch H.B., Tuttle R.M., Ringel M.D., Stratakis C.A. y Haddad B.R. (2002) Evaluation of adult papillary thyroid carcinomas by comparative genomic hybridisation and microsatellite instability analysis. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 135: 182-186.
- Baylin S.B. y Herman J.G. (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.*, 16:168-174.
- Belfiore A., Russo D., Vigneri R. y Filetti S. (2001) Graves' disease, thyroid nodules and thyroid cancer. *Clin. Endocrinol.*, 55: 711-718.
- Bergers G., Hanahan D. y Coussens L.M. (1998) Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 42: 995-1002.
- Berta L., Fortunati N., Gennari P., Appendino M., Casella A. y Frairia R. (1991) Influence of cigarette smoking on pituitary and sex hormone balance in healthy premenopausal women. *Fertil. Steril.*, 56: 788-789.
- Bertram J.S. (2001) The molecular biology of cancer. *Mol. Aspects Med.*, 21: 167-223.

- Bieche I., Champeme M.H., Matifas F., Cropp C., Callahan R. y Lidereau R. (1994) Demonstration of two regions involved in chromosome 1p deletion in breast tumors. *Bull. Cancer*, 81: 108-113.
- Bignon Y.J. (2004) Biological basis of cancer predisposition. En: «Genetic Predisposition to cancer». Ed. Eeles R.A., Easton D.F., Ponder B.A.J. y Eng C. Edición Arnold, pp 11-20.
- Boffetta P. y Hashibe M. (2006) Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.*, 7: 149-156.
- Bojunga J. y Zeuzem S. (2004) Molecular detection of thyroid cancer: an update. *Clin. Endocrinol.*, 61: 523-530.
- Bonilla-Guerrero R. y Roberts, L.R. (2005) The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 42: 760-777.
- Bosetti C., Negri N., Kolonel L., Ron E., Franceschi S., Preston-Martin S., McTiernan A., Dal Maso L., Mark S.D., Mabuchi K. *et al.* (2002) A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer VII. Cruciferous and other vegetables (International). *Cancer Causes Control*, 13: 765-775.
- Bouffler S.D., Bridges B.A., Cooper D.N., Dubrova Y., McMillan T.J., Thacker J., Wright E.G. y Waters R. (2006) Assessing radiation-associated mutational risk to the germline: repetitive DNA sequences as mutational targets and biomarkers. *Radiat. Res.*, 165: 249-268.
- Bounacer A., Wicker R., Caillou B., Cailleux A.F., Sarasin A., Schlumberger M. y Suárez H.G. (1997) High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene*, 15: 1263-1273.
- Brenner D.J., Doll R., Goodhead D.T., Hall E.J., Land C.E., Little J.B., Lubin J.H., Preston D.L., Preston R.J., Puskin J.S. *et al.* (2003) Cancer risks attributable to low doses of ionising radiation: Assessing what we really know. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 13761-13766.
- Brooks A.L. (2005) Paradigm shifts in radiation biology: their impact on intervention for radiation-induced disease. *Radiat. Res.*, 164: 454-461.
- Bu D., Tomlinson G., Lewis C.M., Zhang C., Kildebeck E. y Euhus D.M. (2006) An intronic polymorphism associated with increased XRCC1 expression,

## Bibliografía

---

- reduced apoptosis and familial breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 5 (en prensa).
- Catena C., Villani P., Nastasi R., Conti D., Righi E., Salerno G., Righi V.A. y Rongha G. (1994) Micronuclei and 3AB-index in patients receiving iodine-131 therapy. *J. Nucl. Biol. Med.*, 38: 586-593.
- Cavalieri R.R. (1997) Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts. *Thyroid*, 7: 177-181.
- Cebrian A., Lesueur F., Martin S., Leyland J., Ahmed S., Luccarini C., Smith P.L., Luben R., Whittaker J., Pharoah P.D. *et al.* (2005) Polymorphisms in the initiators of RET (rearranged during transfection) signaling pathway and susceptibility to sporadic medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90: 6268-6274.
- Cerutti J., Delcelo R., Amadei M.J., Nakabashi C., Maciel R., Peterson B., Shoemaker J. y Riggins G.J. (2004) A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. *J. Clin. Invest.*, 113: 1234-1242.
- Chang Y., Cesarman E., Pessin M.S., Lee F., Culpepper J., Knowles D.M. y Moore P.S. (1994) Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, 266: 1865-1869.
- Chang B.L., Zheng S.L., Hawkins G.A., Isaacs S.D., Wiley K.E., Turner A., Carpten J.D., Bleecker E.R., Walsh P.C., Trent J.M. *et al.* (2002) Joint effect of *HSD3B1* and *HSD3B2* genes is associated with hereditary and sporadic prostate cancer susceptibility. *Cancer Res.*, 62: 1784-1789.
- Chaudhuri P.K. y Printz R. (1989) Estrogen receptor in normal and neoplastic human thyroid tissue. *Am. J. Otolaryngol.*, 10: 322-326.
- Christensen S.B., Ericsson U.B., Janzon L., Tibblin S. y Melander A. (1984) Influence of cigarette smoking on goiter formation, thyroglobulin, and thyroid hormone levels in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58: 615-618.
- Ciampi R., Knauf J.A., Kerler R., Gandhi M., Zhu Z., Nikiforova M.N., Rabes H.M., Fagin J.A. y Nikiforov Y.E. (2005) Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J. Clin. Invest.* 115: 20-23.

- Claudio J.O., Liew C.C., Ma J., Heng H.H., Stewart A.K. y Hawley R.G. (1999) Cloning and expression analysis of a novel WD repeat gene, WDR3, mapping to 1p12-p13. *Genomics*, 59: 85-89.
- Collins A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair. *Mol. Biotechnol.*, 26: 249-261.
- Compagni A. y Christofori G. (2000) Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br. J. Cancer*, 83: 1-5.
- Cordell H.J. y Clayton D.G. (2005) Genetic association studies. *Lancet*, 366: 1121-1131.
- Costa P., Domingues R., Sobrinho L.G. y Bugalho M.J. (2005) RET polymorphisms and sporadic medullary thyroid carcinoma in a Portuguese population. *Endocrine*, 27: 239-243.
- Creus A. (2002) Genotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis. En: «Genética toxicológica y carcinogénesis». Eds. Paz-y-Miño *et al.*, PUCE-Fundacyt, pp. 55-63.
- Dellovade T.L., Chan J., Vennstrom B., Forrest D. y Pfaff D.W. (2000) The two thyroid hormone receptor genes have opposite effects on estrogen-stimulated sex behaviors. *Nat. Neurosci.*, 3: 472-475.
- Doll R. y Peto R. (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66: 1191-1308.
- Dottorini M.E., Lomuscio G., Mazzucchelli L., Vignati A. y Colombo L. (1995) Assessment of female fertility and carcinogenesis after iodine-131 therapy for differentiated thyroid carcinoma. *J. Nucl. Med.*, 36: 21-27.
- Douglas D.B., Akiyama Y., Carraway H., Belinsky S.A., Esteller M., Gabrielson E., Weitzman S., Williams T., Herman J.G. y Baylin S.B. (2004) Hypermethylation of a small CpGuanine-rich region correlates with loss of activator protein-2 $\alpha$  expression during progression of breast cancer. *Cancer Res.*, 64: 1611-1620.
- Dubrova Y.E. (2003a) Long-term genetic effects of radiation exposure. *Mutat. Res.*, 544: 433-439.
- Dubrova Y.E. (2003b) Monitoring of radiation-induced germline mutation in humans. *Swiss Med. Wkly*, 133: 474-478.

## **Bibliografía**

---

- Dunning A.M., Healey C.S., Pharoah P.D., Teare M.D., Ponder B.A. y Easton D.F. (1999) A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 8: 843-854.
- Ellegren H. (2000) Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat. Genet.*, 24: 400-402.
- Eng P.H., Cardona G.R., Fang S.L., Previti M., Alex S. Carrasco N., Chin W.W. y Braverman L.E. (1999) Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology*, 140: 3404-3410.
- Epstein M.A., Achong B.G., Barr Y.M. (1964) Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, 28: 702-703.
- Ericsson U.B. y Lindgarde F. (1991) Effects of cigarette smoking on thyroid function and the prevalence of goitre, thyrotoxicosis and autoimmune thyroiditis. *J. Int. Med.*, 229: 67-71.
- Esteller M., Corn P.G., Baylin S.B. y Herman J.G. (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.*, 61: 3225-3229.
- Fagin J.A., Matsuo K., Karmakar A., Chen D.L., Tang S.H. y Koeffler H.P. (1993) High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J. Clin. Invest.*, 91: 179-184.
- Fagin J.A. (2006) Editorial: Challenging dogma in thyroid cancer molecular genetics-role of *RET/PTC* and *BRAF* in tumor initiation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89: 4264-4266.
- Fairbairn D.W., Olive P.L. y O'Neill K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339: 37-59.
- Falvo L., Catania A., Sorrenti S., S'Andrea V., Berni A., De Stefano M. y De Antoni E. (2004) Prognostic significance of the age factor in the thyroid cancer: statistical análisis. *J. Surg. Oncol.*, 88: 217-222.
- Farahati J., Demidchik E.P., Biko J. y Reiners C. (2000) Inverse association between age at the time of radiation exposure and extent of disease in cases of radiation-induced childhood thyroid carcinoma in Belarus. *Cancer*, 88: 1470-1476.

- Farrall M. y Weeks D.E. (1998) Mutational mechanisms for generating microsatellite allele-frequency distributions: an analysis of 4,558 markers. *Am. J. Hum. Genet.*, 62: 1260-1262.
- Fearon E.R. y Vogelstein B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-767.
- Feinendegen L.E. (2005) Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *Br. J. Radiol.*, 78: 3-7.
- Fenech M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.*, 285: 35-44.
- Fenech M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.*, 455: 81-95.
- Fisher C.L. Mannino D.M., Herman W.H. y Frumkin H. (1997) Cigarette smoking and thyroid hormone levels in males. *Int. J. Epidemiol.*, 26: 972-977.
- Foukakkis T., Thoppe S.R., Lagercrantz S., Dwight T., Weng W.H., Svensson A., Hoog A., Zedenius J., Wallin G., Lui W.O. y Larsson C. (2005) Molecular cytogenetic characterization of primary cultures and established cell lines from non-medullary thyroid tumors. *Int. J. Oncol.*, 26: 141-149.
- Franceschi S., Preston-Martin S., Dal Maso L., Franceschi S., Preston-Martin S., Dal Maso L., Negri E., La Vecchia C., Mack W.J., McTiernan A. *et al.* (1999) A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. IV. Benign thyroid diseases. *Cancer Causes Control*, 10: 583-595.
- Frentzel-Beyme R. y Helmert U. (2000) Association between malignant tumors of the thyroid gland and exposure to environmental protective and risk factors. *Rev. Environ. Health*, 15: 337-358.
- Frenzilli G., Bosco E., Antonelli A., Panasiuk G. y Barale R. (2001) DNA damage evaluated by alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) in children of Chernobyl, 10 years after the disaster. *Mutat. Res.*, 491: 139-149.

## **Bibliografía**

---

- Frisk T., Zedenius J., Lundberg J., Wallin G., Kytola S. y Larsson C. (2001) CGH alterations in medullary thyroid carcinomas in relation to the RET M918T mutation and clinical outcome. *Int. J. Oncol.*, 18: 1219-1225.
- Fukayama H., Nasu M., Murakami S. y Sugawara M. (1992) Examination of antithyroid effects of smoking products in cultured thyroid follicles: only thiocyanate is a potent antithyroid agent. *Acta Endocrinol.*, 127: 520-525.
- Galanti M.R., Hansson L., Bergstrom R., Wolk A., Hjartaker A., Lund E., Grimelius L. y Ekblom A. (1997) Diet and the risk of papillary and follicular thyroid carcinoma: a population based case-control study in Sweden and Norway. *Cancer Causes Control*, 8: 205-214.
- García O. y Mandina T. (2005) DNA damage evaluated by the comet assay in lymphocytes of children with <sup>137</sup>Cs internal contamination caused by the Chernobyl accident. *Mutat. Res.*, 565: 191-197.
- García-Rostán G., Tallin G., Herrero A., D'Aquila T.G., Carcangiu M.L. y Rimm D.L. (1999) Frequent mutation and nuclear localization of  $\beta$ -catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res.*, 59: 1811-1815.
- García-Rostán G., Costa A.M., Pereira-Castro I., Salvatore G., Hernández R., Hermsem M.J., Herrero A., Fusco A., Cameselle-Teijeiro J. y Santoro M. (2005) Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res.*, 15: 10199-10207.
- Gardner M.J., Snee M.P., Hall A.J., Powell C.A., Downes S. y Terrell J.D. (1990) Results of case-control study of leukaemia and lymphoma among young people near Sellafield nuclear plant in West Cumbria. *Br. Med. J.*, 300: 423-429.
- Garnis C., Buys T. y Lam W.L. (2004) Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Mol. Cancer*, 3: 9.
- Giarelli E. y Jacobs L.A. (2005) Modifying cancer risk factors: the gene-environment interaction. *Semin. Oncol. Nurs.*, 21: 271-277.
- Gittoes N.J. y Franklyn J.A. (1998) Hyperthyroidism. Current treatment guidelines. *Drugs*, 55: 543-553.
- Goldberg Z. (2003) Clinical implications of radiation-induced genomic instability. *Oncogene*, 22: 7011-7017.

- González C.A., Sala N. y Capella G. (2002) Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int. J. Cancer*, 100: 249-260.
- González-Sancho J.M., García V., Bonilla F. y Muñoz A. (2003) Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer. *Cancer Lett.*, 192: 121-132.
- Grebe S.K. y Hay I.D. (1995) Follicular thyroid cancer. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 24: 761-801.
- Gutiérrez S., Carbonell E., Galofré P., Creus A. y Marcos R. (1998) The alkaline single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay applied to the analysis of radiation-induced DNA damage in thyroid cancer patients treated with <sup>131</sup>I. *Mutat. Res.*, 413: 111-119.
- Gutiérrez S., Carbonell E., Galofré P., Creus A. y Marcos R. (1999) Cytogenetic damage after 131-iodine treatment for hyperthyroidism and thyroid cancer. A study using the micronucleus test. *Eur. J. Nucl. Med.*, 26: 1589-1596.
- Hagmar L., Brogger A., Hansteen I.L., Heim S., Hogstede B., Knudsen L., Lambert B., Linnainmaa K., Mitelman F., Nordenson I. *et al.* (1994) Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.*, 54: 2919-2922.
- Hagmar L., Strömberg U., Bonassi S., Hansteen I.L., Knudsen L., Lindholm C. y Norppa H. (2004) Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from nordic and italian cohorts. *Cancer Res.*, 64: 2258-2263.
- Hall J. y Angele S. (1999) Radiation, DNA damage and cancer. *Mol. Med. Today*, 5: 157-164.
- Hamel M.N., Polpat S., Henderson K., Kantemiroff T., Harmer C., Clarke S.E., Houlston R.S. y Foulkes W.D. (2004) Risk of non-medullary thyroid cancer influenced by polymorphic variation in the thyroglobulin gene. *Carcinogenesis*, 25:369-373.
- Hanahan D. y Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.

## **Bibliografía**

---

- Hegedus L., Karstrup S., Veiergang D., Jacobsen B., Skovsted L. y Feldt-Rasmussen U. (1985) High frequency of goitre in cigarette smokers. *Clin. Endocrinol.*, 22: 287–292.
- Henderson B.E., Ross R.K., Pike M.C. y Casagrande J.T. (1982) Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res.*, 42: 3232–3239.
- Hernández, A.; Céspedes A.; Xamena, N.; Surrallés, J.; Creus, A.; Galofre, P. y Marcos R. (2003) Glutathione S-transferase polymorphisms in thyroid cancer patients. *Cancer Lett.*, 190:37-44.
- Ho T., Li G., Zhao C., Wei Q. y Sturgis E.M. (2005) RET polymorphisms and haplotypes and risk of differentiated thyroid cancer. *Laryngoscope*, 115: 1035-1041.
- Honma M., Izumi M., Sakuraba M., Tadokoro S., Sakamoto H., Wang W., Yatagai F. y Hayashi M. (2003) Deletion, rearrangement, and gene conversion; genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 42: 288–298.
- Horwitz K.B., Jackson T.A., Bain D.L., Richer J.K., Takimoto G.S. y Tung L. (1996) Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol. Endocrinol.*, 10: 1167-1177.
- Houlston R.S. y Tomlinson P.M. (2000) Detecting low penetrance genes in cancer: the way ahead. *J. Med. Genet.*, 37: 161-167.
- Houlston R.S. y Peto J. (2004) Genetics and the common cancers. En: «Genetic Predisposition to cancer». Eds. Eeles R.A., Easton D.F., Ponder B.A.J. y Eng C. Edición Arnold, pp 235-247.
- Huang L., Snyder A.R. y Morgan W.F. (2003) Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene*, 22: 5848-5854.
- Hundahl S.A., Fleming I.D., Fremgen A.M. y Menck H.R. (1998) A National cancer data base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer*, 83: 2638-2648.
- Hyer S., Vini L., O'Connell M., Pratt B. y Harmer C. (2002) Testicular dose and fertility in men following <sup>131</sup>I therapy for thyroid cancer. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 56: 755–758.

- Imyanitov E., Togo A.V. y Hanson K.P. (2004) Searching for cancer-associated gene polymorphisms: promises and obstacles. *Cancer Lett.*, 204: 3-14.
- Iniesta R., Guinó E. y Moreno V. (2005) Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac. Sanit.*, 19:333-341.
- Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S., Shibata D. y Perucho M. (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogénesis. *Nature*, 363: 558-561.
- Iribarren C., Haselkorn T., Tekawa I.S. y Friedman G.D. (2001) Cohort study of thyroid cancer in a San Francisco Bay Area population. *Int. J. Cancer*, 93: 745-750.
- Ito T., Sevama T., Mizuno T., Tsuyama N., Hayashi T., Hayashi Y., Dohi K., Nakamura N. y Akiyama M. (1992) Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res.*, 52: 1369-1371.
- Iuliano R., Le Pera I., Cristofaro C., Baudi F., Arturi F., Pallante P., Martelli M.L., Trapasso F., Chiariotti L. y Fusco A. (2004) The tyrosine phosphatase PTPRJ/DEP-1 genotype affects thyroid carcinogenesis. *Oncogene*, 23: 8432-8438.
- Jemal A., Murray T., Ward E., Samuels A., Tiwari R.C., Ghafoor A., Feuer E.J. y Thun M.J. (2005) Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J. Clin.*, 55: 10-30.
- Jin Y., Jin C., Wennerberg J., Mertens F. y Hoglund M. (1998) Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization characterization of chromosome 1 rearrangements in head and neck carcinomas delineate a target region for deletions within 1p11-1p13. *Cancer Res.*, 58: 5859-5865.
- Johnson A.D., Wang D. y Sadee W. (2005) Polymorphisms affecting gene regulation and mRNA processing: broad implications for pharmacogenetics. *Pharmacol. Ther.*, 106: 19-38.
- Jones P.A. y Baylin S.B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.*, 3: 415-428.
- Jukkola A., Bloigu R., Ebeling T., Salmela P. y Blanco G. (2004) Prognostic factors in differentiated thyroid carcinomas and their implications for current staging classifications. *Endocr. Relat. Cancer*, 11: 571-579.

## **Bibliografía**

---

- Kadhim M.A., Lorimore S.A., Hepburn M.D., Goodhead D.T., Buckle V.J. y Wright E.G. (1994) Alpha- particle-induced chromosomal instability in human bone marrow cells. *Lancet*, 344: 987-988.
- Kadhim M.A., Moore S.R. y Goodwin E.H. (2004) Interrelationships amongst radiation-induced genomic instability, bystander effects, and the adaptive response. *Mutat. Res.*, 568: 21-32.
- Kathren R.L. y Petersen G.R. (1989) Units and terminology of radiation measurements: a primer for the epidemiologist. *Amer. J. Epidemiol.*, 130: 1076-1087.
- Kawata T., Ito H., George K., Wu H. y Cucinotta F.A. (2004) Chromosome aberrations induced by high LET radiations. *Biol. Sci. Space*, 18: 216-223.
- Khoo M.L., Ezzat S., Freeman J.L. y Asa S.L. (2002) Cyclin D1 protein expression predicts metastatic behavior in thyroid papillary microcarcinomas but is not associated with gene amplification. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87: 1810-1813.
- Kimura E.T., Nikiforova M.N., Zhu Z., Knauf J.A., Nikiforov Y.E. y Fagin J.A. (2003) High prevalence of braf mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS\_BRAF signalling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.*, 63: 1454-1457.
- Kitamura Y., Shimizu K., Tanaka S., Ito K. y Emi M. (2000) Allelotyping of anaplastic thyroid carcinoma: frequent allelic losses on 1q, p9, 11, 17, 19p and 22q. *Genes Chrom. Cancer*, 27: 244-251.
- Kitamura Y., Shimizu K., Ito K., Tanaka S. y Emi M. (2001) Allelotyping of follicular thyroid carcinoma: frequent allelic losses in chromosome arms 7q, 11p, and 22q. *J. Clin. Endocrinol.*, 86: 4268-4272.
- Kiyohara C., Otsu A., Shirakawa T., Fukuda S. y Hopkin J.M. (2002) Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: a review. *Lung Cancer*, 37: 241-256.
- Kjellman P., Lagercrantz S., Hoog A., Wallin G., Larsson C. y Zedenius J. (2001) Gain of 1q and loss of 9q21.3-q32 are associated with a less favorable prognosis in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chrom. Cancer*, 32: 43-49.

- Klain M., Ricard M., Leboulleux S., Baudin E. y Schlumberger M. (2002) Radioiodine therapy for papillary and follicular thyroid carcinoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 29: 479-485.
- Kleer C.G., Bryant B.R., Giordano T.J., Sobel M. y Merino M.J. (2000) Genetic changes in chromosomes 1p and 17p in thyroid cancer progression. *Endocr. Pathol.*, 11: 137-143.
- Knudsen N., Bulow I., Laurberg P., Perrild H., Ovesen L. y Jorgensen T. (2001) Alcohol consumption is associated with reduced prevalence of goitre and solitary thyroid nodules. *Clin. Endocrinol.*, 55: 41-46.
- Knudson A.G (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 820-823.
- Kodaira M., Izumi S., Takahashi N. y Nakamura N. (2004) No evidence of radiation effect on mutation rates at hypervariable minisatellite loci in the germ cells of atomic bomb survivors. *Radiat. Res.*, 162: 350-356.
- Kopnin B.P. (2000) Targets of oncogenes and tumor suppressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 65: 2-27.
- Kovvali G., Shiff S., Telang N., Das K., Kohgo Y., Narayan S. y Li H. (2003) Carcinogenesis: The more we seek to know the more we need to know- Challenges in the post genomic era. *J. Carcinog.*, 2: 1.
- Krassas G.E. y Pontikides N. (2005) Gonadal effect of radiation from <sup>131</sup>I in male patients with thyroid carcinoma. *Arch. Androl.*, 51: 171-175.
- Kroll T.G., Sarraf P., Pecciarini L., Chen C.J., Mueller E., Spiegelman B.M. y Fletcher J.A. (2000) *PAX8-PPAR $\gamma$ 1* fusion oncogen in human thyroid carcinoma. *Science*, 289: 1357-1360.
- La Vecchia C., Ron E., Franceschi S., Dal Maso L., Mark S.D., Chatenoud L., Braga C., Preston-Martin S., McTiernan A., Kolonel L. *et al.* (1999) A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer III. Oral contraceptives, menopausal replacement therapy and other female hormones. *Cancer Causes Control*, 10: 157-166.
- Lachance Y., Luu-The V., Labrie C., Simard J., Dumont M., de Launoit Y., Guerin S., Leblanc G. y Labrie F. (1990) Characterization of human 3

- beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 265: 20469-20475.
- Lacroix L., Lazar V., Michiels S., Ripoche H., Dessen P., Talbot M., Caillou B., Levillain J.P., Schlumberger M. y Bidaet J.M. (2005) Follicular thyroid tumors with the PAX8-PPAR $\gamma$ 1 rearrangement display characteristic genetic alterations. *Am. J. Pathol.*, 167: 223-231.
- Larsen P.R., Davies T.F., Schlumberger M.J. y Hay I.D. (2003) Thyroid. En: «Williams Textbook of Endocrinology». Eds. Larsen *et al.*, Saunders, pp. 331-490.
- Laudet V., Begue A., Henry-Duthoit C., Joubel A., Martin P., Stehelin D. y Saule S. (1991) Genomic organization of the human thyroid hormone receptor alpha (c-erbA-1) gene. *Nucleic Acids Res.*, 19: 1105-1112.
- Lee E., Oh E., Lee J., Sul D. y Lee J. (2004) Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicol. Sci.*, 81: 121-132.
- Lee J.E., Choi J.H., Lee J.H. y Lee M.G. (2005) Gene SNPs and mutations in clinical genetic testing: haplotype-based testing and analysis. *Mutat. Res.*, 573: 195-204.
- Lerch H., Schober O., Kuwert T. y Saur H.B. (1997) Survival of differentiated thyroid carcinoma studied in 500 patients. *J. Clin. Oncol.*, 15: 2067-2075.
- Lesueur F., Corbex M., McKay J.D., Lima J., Soares P., Griseri P., Burgess J., Ceccherini I., Landolfi S., Papotti M. *et al.* (2002) Specific haplotypes of the RET proto-oncogene are over-represented in patients with sporadic papillary thyroid carcinoma. *J. Med. Genet.*, 39: 260-265.
- Li D. y Roberts R. (2001) WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58: 2085-2097.
- Li L., Story M. y Legerski R.J. (2001) Cellular responses to ionizing radiation radiation damage. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 49: 1157-1162.
- Lillie E.O., Bernstein L. y Ursin G. (2003) The role of androgens and polymorphisms in the androgen receptor in the epidemiology of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 5: 164-173.

- Little J.B. (1993) Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 7: 337-352.
- Little J.B. (2000) Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21: 397-404.
- Little J.B. (2006) Cellular radiation effects and the bystander response. *Mutat. Res.*, 11: 113-118.
- Littlefield L.G., Travis L.B., Sayer A.M., Voelz G.M., Jensen R.H. y Boice Jr J.D. (1997) Cumulative genetic damage in hematopoietic stem cells in a patient with a 40-year exposure to alpha particles emitted by thorium dioxide. *Radiat. Res.*, 148: 135-144.
- Liu H., Nakagawa T., Kanematsu T., Uchida T y S. Tsuji (1999) Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *J. Neurochem.*, 72: 1781-1790.
- Livingston G.K., Foster A.E. y Elson H.R (1993) Effect of in vivo exposure to iodine-131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 40: 367-375.
- Loeb L.A. (1991) Mutator phenotype may be required for multistep carcinogenesis. *Cancer Res.*, 51: 3073-3079.
- Loeb L., Loeb K. y Anderson J.P. (2003) Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 776-781.
- Loktionov A. (2004) Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Lett.*, 208: 1-33.
- Lorimore S.A., Coates P.J. y Wright E. (2003) Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. *Oncogene*, 22: 7058-7069.
- Luke G.A., Riches A.C. y Bryant P.E. (1997) Genomic instability in haematopoietic cells of F1 generation mice of irradiated male parents. *Mutagenesis*, 12:147-152.
- Luning K.G., Frolen H. y Nilsson A. (1976) Genetic effects of <sup>239</sup>Pu salt injections in male mice. *Mutat. Res.*, 34: 539-542.
- Lundgren C.I., Hall P., Dickman P.W. y Zedenius J. (2006) Clinically significant prognostic factors for differentiated thyroid carcinoma. *Cancer*, 106: 524-531.

## **Bibliografía**

---

- Maciel R.M., Kimura E.T. y Cerutti J.M. (2005) Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular). *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 49: 691-700.
- Mack W.J., Preston-Martin S., Dal Maso L., Galanti M.R., Xiang M., Franceschi S., Hallquist A., Jin F., Kolonel L., La Vecchia C. *et al.* (2003) A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer: cigarette smoking and consumption of alcohol, coffee, and tea. *Cancer Causes Control*, 14: 773-785.
- Maluf S. (2004) Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clin. Chim. Acta.*, 347: 15-24.
- Marsh D., Mulligan L.M. y Eng C. (1997) RET proto-oncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. *Horm. Res.*, 47: 168-178.
- Marsh D. y Zori R. (2002) Genetic insights into familial cancers-update and recent discoveries. *Cancer Lett.*, 181: 125-164.
- Marsh D., Theodosopoulos G., Martin-Schulte K., Richardson A.L., Philips J., Roher H.D., Delbridge L. y Robinson B.G. (2003) Genome-wide copy number imbalances identified in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88: 1866-1872.
- Mazzaferri E.L. y Kloos R.T. (2001) Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86: 1447-1463.
- Mazzaferri E.L. (2002) Gonadal damage from <sup>131</sup>I therapy for thyroid cancer. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 57: 313-314.
- Mazzaferri E.L. y Massoll N. (2002) Management of papillary and follicular (differentiated) thyroid cancer: new paradigms using recombinants human thyrotropin. *Endocr. Relat. Cancer*, 9: 227-247.
- McBride M.W., McVie A.J., Burridge S.M., Brintnell B., Craig N., Wallace A.M., Wilson R.H., Varley J. y Sutcliffe R.G. (1999) Cloning, expression, and physical mapping of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene cluster (HSD3BP1-HSD3BP5) in human. *Genomics*, 61: 277-284.

- McConahey W.M., Hay I.D., Woolner L.B., van Heerden J.A. y Taylor W.F. (1986) Papillary thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. *Mayo Clin. Proc.*, 61: 978-996.
- Melillo R.M., Castellone M.D., Guarino V., De Falco V., Cirafici A.M., Salvatore G., Caiazzo F., Basolo F., Giannini R., Kruhoffer M. *et al.* (2005) The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J. Clin. Invest.*, 115: 1068-1081.
- Migliore L., Parrini M., Sbrana I., Biagini C., Battaglia A. y Loprieno N. (1991) Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effect. *Mutat. Res.*, 256: 13-20.
- Miki H., Oshimo K., Inoue H., Morimoto T. y Monden Y. (1990) Sex hormone receptors in human thyroid tissues. *Cancer*, 66: 1759-1762.
- Mitelman F., Mertens F. y Johansson B. (1997) A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat. Genet.*, 15: 417-474.
- Monteiro-Gil O., Oliveira N.G., Rodrigues A.S., Laires A., Ferreira T.C., Limbert E., Leonard A., Gerber G. y Rueff J. (2000) Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy. *Mutagenesis*, 15: 69-75.
- Morari E.C., Leite J.L., Granja F., Asumpção L. y Ward L.S. (2002) The null genotype of glutathione S-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 11: 1485-1488.
- Moreno J.C. (2001). Nuevos genes implicados en el hipotiroidismo congénito. *An. Esp. Pediatr.*, 54: 20-27.
- Moreno J.C., de Vijlder J., Vulsma T. y Ris-Stalpers C. (2003) Genetic basis of hypothyroidism: recent advances, gaps and strategies for future research. *Trends Endocrinol. Metab.*, 14: 318-326.

## **Bibliografía**

---

- Moretti F., Nanni S. y Pontecorvi A. (2000) Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 14: 517-39.
- Morgan W.F., Corcoran J., Hartmann A., Kaplan M.I., Limoli C.L. y Ponnaiya B. (1998) DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. *Mutat. Res.*, 404: 125-128.
- Morgan W.F. (2003a) Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation? *Oncogene*, 22: 7094-7099.
- Morgan W.F. (2003b) Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat. Res.*, 159: 567-580.
- Morgan W.F. y Sowa M.B. (2005) Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 14127-14128.
- Mori M., Naito M., Watanabe H., Takeichi N., Dohi K. e Ito A. (1990) Effects of sex difference, gonadectomy, and estrogen on N-methyl-N-nitrosourea induced rat thyroid tumors. *Cancer Res.*, 50: 7662-7667.
- Moysich K.B., Menezes R.J. y Michalek A.M. (2002) Chernobyl-related ionising radiation exposure and cancer risk: an epidemiological review. *Lancet Oncol.*, 3: 269-279.
- Mukherjee M., Vaish M., Mittal R.D. y Mittal B. (2002) Allelic variation of BAT-26 and BAT-40 poly-adenine repeat loci in North Indians. *Int. J. Mol. Med.*, 9: 91-94.
- Müller W.U., Dietl S., Wuttke K., Reiners C., Biko J., Demidchik E. y Streffer C. (2004) Micronucleus formation in lymphocytes of children from the vicinity of Chernobyl after <sup>131</sup>I therapy. *Radiat. Environ. Biophys.*, 43: 7-13.
- Nair S. y Pillai M.R. (2005) Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis.*, 11: 350-359.
- Nakamura T., Yana I., Kobayashi T., Shin E., Karakawa K., Fujita S., Miya A., Mori T., Nishisho I. y Takai S. (1992) p53 gene mutations associated with anaplastic transformation of human thyroid carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83: 1293-1298.

- Navarro J., Alcaraz M., Gómez A., Vicente V. y Canteras M. (2003) Actividad genotóxica de la terapia con I131 en pacientes tratados por carcinomas de tiroides. *Oncología*, 2004; 27: 28-36.
- Navarro S.A., Miller A.B. y Rohan T.E. (2005) Risk factors for thyroid cancer: a prospective cohort study. *Int. J. Cancer*, 116: 433-438.
- Neer E.J., Schmidt C.J., Nambudripad R. y Smith T.F. (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 371: 297-300.
- Negri E., Ron E., Franceschi S., Dal Maso L., Mark S.D., Preston-Martin S., McTiernan A., Kolonel L., Kleinerman R., Land C. *et al.* (1999a) A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. I. Methods. *Cancer Causes Control*, 10: 131-142.
- Negri E., Dal Maso L., Ron E., La Vecchia C., Mark S.D., Preston-Martin S., McTiernan A., Kolonel L., Yoshimoto Y., Jin F. *et al.* (1999b) A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer II. Menstrual and reproductive factors. *Cancer Causes Control*, 10: 143-155.
- Negri N., Ron E., Franceschi S., La Vecchia C., Preston-Martin S., Kolonel L., Kleinerman R.A., Mabuchi K., Jin F., Wingren G. *et al.* (2002) Risk factors for medullary thyroid carcinoma: a pooled analysis. *Cancer Causes Control*, 13: 365-372.
- Newton-Cheh C. y Hirschhorn J.N. (2005) Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat. Res.*, 573: 54-69.
- Ng K.C., Tan A.M., Chong Y.Y., Lau L.C. y Lou J. (1999) Congenital acute megakaryoblastic leukemia (M7) with chromosomal t(1;22)(p13;q13) translocation in a set of identical twins. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 21: 428-430.
- Nikiforov Y.E. (2002) RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr. Pathol.*, 13: 3-16.
- Nikiforova M.N., Biddinger P.W., Caudill C.M., Kroll T.G. y Nikiforov Y.E. (2002) PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am. J. Surg. Pathol.*, 26: 1016-1023.
- Nikiforova M.N., Lynch R.A., Biddinger P.W., Alexander E.K., Dorn II G.W., Tallin G., Kroll T.G. y Nikiforov Y.E. (2003) RAS point mutations and

## **Bibliografía**

---

- PAX8-PPAR $\gamma$  rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J. Clin. Endocrinol.*, 88: 2318-2326.
- Niwa O. (2003) Induced genomic instability in irradiated germ cells and in the offspring; reconciling discrepancies among the human and animal studies. *Oncogene*, 22: 7078-7086.
- Nix P., Nicolaidis A. y Coatesworth A.P. (2005) Thyroid cancer review 1: presentation and investigation of thyroid cancer. *Int. J. Clin. Pract.*, 59: 1340-1344.
- Nix P.A., Nicolaidis A. y Coatesworth A.P. (2006) Thyroid cancer review 3: management of medullary and undifferentiated thyroid cancer. *Int. J. Clin. Pract.*, 60: 80-84.
- Nomura A., Stemmermann G.N., Chyou P.H., Kato I., Pérez-Pérez G.I. y Blaser M.J. (1991) *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *New Engl. J. Med.*, 325: 1132-1136.
- Nomura T. (2003) Transgenerational carcinogenesis: induction and transmission of genetic alterations and mechanisms of carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 544: 425-432.
- Nowell P:C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194: 23-28.
- Ntais C., Polycarpou A. y Tsatsoulis A. (2003) Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes. *Eur. J. Endocrinol.*, 149: 469-477.
- Onda M., Li D., Suzuki S., Nakamura I., Takenoshita S., Brogren C.H., Stampanoni S. y N. Rampino (2002) Expansion of microsatellite in the thyroid hormone receptor-alpha1 gene linked to increased receptor expression and less aggressive thyroid cancer. *Clin. Cancer Res.*, 8: 2870-2874.
- Parker L., Pearce M.S., Dickinson H.O., Aitkin M. y Craft A.W. (1999) Stillbirths among offspring of male radiation workers at Sellafield nuclear reprocessing plant. *Lancet*, 354: 1407-1414.

- Parthasarathy K.L. y Crawford M.S. (2002) Treatment of thyroid carcinoma: Emphasis on high-dose  $^{131}\text{I}$  outpatient therapy. *J. Nucl. Med. Technol.*, 30: 165-171.
- Pharoah P.D., Dunning A.M., Ponder B.A. y Easton D.F. (2004) Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat. Rev. Cancer*, 4: 850-860.
- Pierotti M. (2001) Chromosomal rearrangements in thyroid carcinomas: a recombination or death dilemma. *Cancer Lett.*, 166: 1-7.
- Plappert U.G., Stocker B., Fender H. y Fliedner T.M. (1997) Changes in the repair capacity of blood cells as a biomarker for chronic low-dose exposure to ionizing radiation. *Environ. Mol. Mutagen.*, 30: 153-160.
- Popova L., Hadjidekova V., Hadjieva T., Agova S. y Vasilev I. (2005) Cytokinesis-block micronucleus test in patients undergoing radioiodine therapy for differentiated thyroid carcinoma. *Hell. J. Nucl. Med.*, 8: 54-57.
- Preston-Martin S., Franceschi S., Ron E. y Negri E. (2003) Thyroid cancer pooled analysis from 14 case-control studies: what have we learned? *Cancer Causes Control*, 14: 787-789.
- Rabes H.M., Demidchik E.P., Sidorow J.D., Lengfelder E., Beimfohr C., Hoelzel D. y Klugbauer S. (2000) Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin. Cancer Res.*, 6: 1093-1103.
- Raponi M., Upadhyaya M. y Baralle D. (2006) Functional splicing assay shows a pathogenic intronic mutation in neurofibromatosis type 1 (NF1) due to intronic sequence exonization. *Hum. Mutat.*, 27: 294-295.
- Rees G.S., Trikić M.Z., Winther J.F., Tawn E.J., Stovall M., Olsen J.H., Rechnitzer C., Schroder H., Guldborg P. y Boice J.D. Jr (2006) A pilot study examining germline minisatellite mutations in the offspring of Danish childhood and adolescent cancer survivors treated with radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.*, 82: 153-160.
- Rodenhiser D. y Mann M. (2006) Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*, 174: 341-348.

## **Bibliografía**

---

- Rodrigues-Serpa A., Catarino A. y Soares J (2003) Loss of heterozygosity in follicular and papillary thyroid carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 141: 26-31.
- Ron E., Kleinerman R.A., Boice J.D. Jr, Livolsi V.A., Flannery J.T. y Fraumeni J.F. Jr. (1987) A population-based case-control study of thyroid cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 79: 1-12.
- Roque L., Clode A., Belge G., Pinto A., Bartnitzke S., Santos J.R., Thode B., Bullerdiel J., Castedo S. y Soares J. (1998) Follicular thyroid carcinoma: Chromosome analysis of 19 cases. *Genes Chrom. Cancer*, 21: 250-255.
- Roque L., Nunes V.M., Ribeiro C., Martins C. y Soares J. (2001) Karyotypic characterization of papillary thyroid carcinomas. *Cancer*, 92: 2529-2537.
- Rossing M., Cushing K., Voigt L., Wicklund K. y Daling J. (2000) Risk of papillary thyroid cancer in women in relation to smoking and alcohol consumption. *Epidemiology*, 11: 49-54.
- Rudolph B., Harbott J. y Lampert F. (1988) Fragile sites and neuroblastoma: fragile site at 1p13.1 and other points on lymphocyte chromosomes from patients and family members. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 31: 83-94.
- Saad A.G., Kumar S., Ron E., Lubin J.H., Stanek J., Bove K.E. y Nikiforov Y.E. (2006) Proliferative activity of human thyroid cells in various age groups and its correlation with the risk of thyroid cancer after radiation exposure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2 (en prensa).
- Saatcioglu F., Deng T. y Karin M. (1993) A novel cis element mediating ligand-independent activation by c-ErbA: implications for hormonal regulation. *Cell*, 75: 1095-1105.
- Sakurai A., Bell G.I. y DeGroot L.J. (1992) Dinucleotide repeat polymorphism in the human thyroid hormone receptor alpha gene (THRA1) on chromosome 17. *Hum. Mol. Genet.*, 1: 553.
- Salomaa S., Holmberg K., Lindhom C., Mustonen R., Tekkel M., Veidebaum T. y Lambert B. (1998) Chromosomal instability in *in vivo* radiation exposed subjects. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74: 771-779.

- Samowitz W.S., Slattery M.L., Potter J.D. y Leppert M.F. (1999) BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. *Am. J. Pathol.*, 154: 1637-1641.
- Sankaranarayanan K. (1999) Ionizing radiation and genetic risks X. The potential "disease phenotypes" of radiation-induced genetic damage in humans: perspectives from human molecular biology and radiation genetics. *Mutat. Res.*, 429: 45-83.
- Sankaranarayanan K. y Wassom J.S. (2005) Ionizing radiation and genetic risks XIV. Potential research directions in the post-genome era based on knowledge of repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in mammalian somatic cells and the origin of deletions associated with human genomic disorders. *Mutat. Res.*, 578: 333-370.
- Santoro M., Carlomagno F., Hay I.D., Herrmann M.A., Grieco M., Melillo R., Pierotti M.A., Bongarzone I., Della Porta G., Berger N., *et al* (1992) *Ret* oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J. Clin. Invest.*, 89: 1517-1522.
- Santoro M., Grieco M., Melillo R.M., Fusco A. y Vecchio G. (1995) Molecular defects in thyroid carcinomas: role of the RET oncogene in thyroid neoplastic transformation. *Eur. J. Endocrinol.*, 133: 513-522.
- Santoro M., Melillo R.M., Carlomagno F., Vecchio G. y Fusco A. (2004a) Minireview. RET: normal and abnormal functions. *Endocrinology*, 145: 5448-5451.
- Santoro M., Carlomagno F., Melillo R.M. y Fusco A. (2004b) Dysfunction of the RET receptor in human cancer. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61: 2954-2964.
- Schlumberger M. y De Vathaire F. (1996) 131 iodine: medical use. Carcinogenic and genetic effects. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 57: 166-176.
- Segev D.L., Umbricht U. y Zeiger M.A. (2003) Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg. Oncol.*, 12: 69-90.
- Silva S.N., Gil O.M., Oliveira V.C., Cabral M.N., Azevedo A.P., Faber A., Manita I., Ferreira T.C., Limbert E., Pina J.E. *et al.* (2005) Association of polymorphisms in ERCC2 gene with non-familial thyroid cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14: 2407-2412.

## **Bibliografía**

---

- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. y Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191.
- Singh N.P., Danner D.B., Tice R.R., Brant L. y Schneider E.L. (1990) DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 237: 123-130.
- Smedley D., Sidhar S., Birdsall S., Bennett D., Herlyn M., Cooper C. y Shipley J. (2000) Characterization of chromosome 1 abnormalities in malignant melanomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 28: 121-125.
- Smith T.F., Gaitatzes C., Saxena K. y Neer E.J. (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.*, 24: 181-185.
- Soares P., dos Santos N.R., Seruca R., Lothe R.A. y Sobrinho-Simões M. (1997) Benign and malignant thyroid lesions show instability at microsatellite loci. *Eur. J. Cancer*, 2: 293-296.
- Solé X., Guinó E., Valls J., Iniesta R. y Moreno V. (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 23 (en prensa).
- Son H.Y., Nishikawa A., Okazaki K., Kanki K., Yamagishi M., Imazawa T., Umemura T. y Hirose M. (2003) Prolonged effects of b-estradiol 3-benzoate on thyroid tumorigenesis in gonadectomized rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine. *Cancer Letters*, 190: 21-29.
- Spinola M., Pedotti P., Dragan T.A. y Taioli E. (2004) Meta-Analysis suggests association of L-*myc* *Eco*RI polymorphism with cancer prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 10: 4769-4775.
- Sporny S., Slowinska-Klencka D. y Ratynska M. (2005) Cyclin D1 expression in primary thyroid carcinomas. *Neuro. Endocrinol. Lett.*, 26: 815-818.
- Stankov K., Landi S., Gioia-Patricola L., Bonora E., Volante M., Papotti M. y Romeo G. (2006) GSTT1 and M1 polymorphisms in Hurthle thyroid cancer patients. *Cancer Lett.*, 19 (en prensa).
- Steinmuller T., Klupp J., Raves N., Ulrich F., Jonas S., Graf K.J. y Neuhays P. (2000) Prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Eur. J. Surg.*, 166: 29-33.

- Stoler D.L., Datta R.V., Charles M.A., Block A.W., Brenner B.M., Siczka E.M., Jr Hicks W.L., Loree T.R. y Anderson G.R. (2002) Genomic instability measurement in the diagnosis of thyroid neoplasms. *Head Neck*, 24: 290-295.
- Sturgis E.M., Zhao C., Zheng R. y Wei Q. (2005) Radiation response genotype and risk of differentiated thyroid cancer: a case-control analysis. *Laryngoscope*, 115: 938-945.
- Suh Y. y Cantor C. (2005) Single nucleotide polymorphisms (SNPs): detection, interpretation, and application. *Mutat. Res.*, 573: 1-2.
- Suh Y. y Vijg J. (2005) SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. *Mutat. Res.*, 573: 41-53.
- Szmunes W. (1978) Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog. Med. Virol.*, 24: 40-69.
- Takeichi N., Ito H., Haruta R., Matsuyama T., Dohi K. y Tahara E. (1991) Relation between estrogen receptor and malignancy of thyroid cancer. *Jpn J. Cancer Res.*, 82: 19-22.
- Tawn E.J., Whitehouse C.A., Winter J.F., Curwen G.B., Rees G.S., Stovall M., Olsen J.H., Guldberg P., Rechnitzer C. y Boice Jr J.D. (2005) Chromosome analysis in childhood cancer survivors and their offspring—no evidence for radiotherapy-induced persistent genomic instability. *Mutat. Res.*, 583: 198-206.
- Thiruvengadam A., Govindarajulu P. y Aruldas M.M. (2003) Modulatory effect of estradiol and testosterone on the development of N-nitrosodiisopropanolamine induced thyroid tumors in female rats. *Endocr. Res.*, 29: 43-51.
- Thomas E., Edridge W., Weddell A., McGill A. y McGarrigle H. (1993) The impact of cigarette smoking on the plasma concentrations of gonadotrophins, ovarian steroids and androgens and upon the metabolism of oestrogens in the human female. *Human Reprod.*, 8: 1187-1193.
- Thorne M.C. (2003) Background radiation: natural and man-made. *J. Radiol. Prot.*, 23: 29-42.

## **Bibliografía**

---

- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C. y Sasaki Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206-221.
- Tomatis L., Aitio A., Wilbourn J. y Shuker L. (1989) Human carcinogenesis so far identified. *Japanese J. Cancer Res.*, 80: 795-807.
- Tominaga H., Kodama S., Matsuda N., Suzuki K. y Watanabe M. (2004) Involvement of reactive oxygen especies (ROS) in the induction of genetic instability by radiation. *J. Radiat. Res.*, 45: 181-188.
- Tubiana M., Schlumberger M., Rougier P., Laplanche A., Benhamou E., Gardet P., Caillou B., Travagli J.P. y Parmentier C. (1985) Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer*, 55: 794-804.
- Tung W.S., Shevlin D.W., Kaleem Z., Tribune D.J., Wells S.A. y Goodfellow P.J. (1997) Allelotype of follicular thyroid carcinomas reveals genetic instability consistent with frequent nondisjunctional chromosomal loss. *Genes Chromosomes Cancer*, 19: 43-51.
- Vaish M., Mishra S.K., Mandhani A., Mittal R.D. y Mittal B. (2003) Assessment of microsatellite instability in bladder and thyroid malignancies. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 1: 255-265.
- Van der Voorn L. y Ploegh H.L. (1992) The WD-40 repeat. *FEBS Lett.*, 307: 131-134.
- Varkondi E., Gvory F., Nagy A., Kiss I., Ember I. y Kozma L. (2005) Oncogene amplification and overexpression of oncoproteins in thyroid papillary cancer. *In Vivo*, 19: 465-470.
- Vernole P., Tedeschi D., Caporossi D. y Nicoletti B. (1989) Fragile site 1p13.1 in neuroblastoma patients. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 40: 135-136.
- Vini L., Hyer S., Al-Saadi A., Pratt B. y Harmer C. (2002) Prognosis for fertility and ovarian function after treatment with radioiodine for thyroid cancer. *Postgrad. Med. J.*, 78: 92-93.
- Volante M., Caballo G.P. y Papotti M. (2004) Prognostic factors of clinical interest in poorly differentiated carcinomas of the thyroid. *Endocr. Pathol.*, 15: 313-317.

- Wallin G., Bronnegard M., Grimelius L., McGuire J. y Topping O. (1992) Expression of the thyroid hormone receptor, the oncogenes c-myc and H-ras, and the 90 kD heat shock protein in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue. *Thyroid*, 2: 307-313.
- Walsh R.M., Watkinson J.C. y Franklyn J. (1999) The management of the solitary thyroid nodule: a review. *Clin. Otolaryngol.*, 24: 388-397.
- Ward L.S., Brenta G., Medvedovic M. y Fagin J.A. (1998) Studies of allelic loss in thyroid tumors reveal major differences in chromosomal instability between papillary and follicular carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83: 525-530.
- Watanabe N., Kanegane H., Kinuya S., Shuke N., Yokoyama K., Kato H., Tomizawa G., Shimizu M., Funada H. y Seto H. (2004) The radiotoxicity of <sup>131</sup>I therapy of thyroid cancer: assessment by micronucleus assay of B lymphocytes. *J. Nucl. Med.*, 45: 608-611.
- Watson G.E., Lorimore S.A., Clutton S.M., Kadhim M.A. y Wright E.G. (1997) Genetic factors influencing alpha-particle-induced chromosomal instability. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71: 497-503.
- Whitehouse C.A. y Tawn E.J. (2001) No evidence for chromosomal instability in radiation workers with *in vivo* exposure to plutonium. *Radiat. Res.*, 156: 467-475.
- Wiench M., Wloch J., Wygoda Z., Gubala E., Oczko M., Pawlaczek A., Kula D., Lange D. y Jarzab B. (2004) RET polymorphisms in codons 769 and 836 are not associated with predisposition to medullary thyroid carcinoma. *Cancer Detect. Prev.*, 28: 231-236.
- Williams E.D. (1990) TSH and thyroid cancer. *Horm. Metab. Res.*, 23: 72-75.
- Wogan G.N., Hecht S.S., Felton J.S., Conney A.H. y Loeb L.A. (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 14: 473-486.
- Wohlk G.N., Soto C.E., Bravo A.M. y Becker C.P. (2005) G691S, L769L and S836S ret proto-oncogene polymorphisms are not associated with higher risk to sporadic medullary thyroid carcinoma in Chilean patients. *Rev. Med. Chil.*, 133: 397-402.

## **Bibliografía**

---

- Wreesmann V.B., Ghossein R.A., Patel S.G., Harris C.P., Schnaser E.A., Shaha A.R., Tuttle R.M., Shah J.P., Rao P.H. y Singh B. (2002) Genome-wide appraisal of thyroid cancer progression. *Am. J. Pathol.*, 161: 1549-1556.
- Wright E.G. y Coates P.J. (2006) Untargeted effects of ionizing radiation: Implications for radiation pathology. *Mutat. Res.*, 11: 119-132.
- Wuttke K., Streffer C., Muller W.U., Reiners C., Biko J. y Demidchik E. (1996) Micronuclei in lymphocytes of children from the vicinity of Chernobyl before and after  $^{131}\text{I}$  therapy for thyroid cancer. *Int. J. Radiat. Biol.*, 69: 259-268.
- Xu X., Quiros R.M., Gattuso P., Ain K.B. y Prinz A. (2003) High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res.*, 63: 4561-4567.
- Yancik R. (2005) Population aging and cancer: a cross-national concern. *Cancer J.*, 11: 437-441.
- Yokozaki H. (2000) Distribution of germline BAT-40 poly-adenine tract microsatellite variants in the Japanese. *Int. J. Mol. Med.*, 6: 445-448.
- Young L.S. y Rickinson A.B. (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer*, 4: 757-768.
- Zalacaín M., Sierrasesúmaga L. y Patiño A. (2005) El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist. Sanit. Navar.*, 28: 153-298.
- Zanzonico P.B. (1997) Radiation dose to patients and relatives incident to  $^{131}\text{I}$  therapy. *Thyroid*, 7: 199-204.
- Zhang J., Glatfelter A., Taetle R. y Trent J.M. (1999) Frequent alterations of evolutionarily conserved regions of chromosome 1 in human malignant melanoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 111: 119-123.
- Zhang Z., Jones B.H., Tang W., Moss S.B., Wei Z., Ho C., Pollack M., Horowitz E., Bennett J., Baker M.E. y Strauss J.F. (2005) Dissecting the Axoneme Interactome: The mammalian orthologue of Chlamydomonas PF6 interacts with sperm-associated antigen 6, the mammalian orthologue of Chlamydomonas PF16\*. *Mol. Cell. Proteomics*. 4: 914-923.
- Zhou X.P., Hoang J.M., Cottu P., Thomas G. y Hamelin R. (1997) Allelic profiles of mononucleotide repeat microsatellites in control individuals

and in colorectal tumors with and without replication errors. *Oncogene*, 15: 1713-1718.

Zhu Z., Gandhi M., Nikiforova M.N., Fischer A.H. y Nikiforov Y.E. (2003) Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am. J. Clin. Pathol.*, 120: 71-77.

Zhu Q.X., Bian J.C., Shen Q., Jiang F., Tang H.W., Zhang H.W. y Wu Y. (2004) Genetic polymorphisms in X-ray repair cross-complementing gene 1 and susceptibility to papillary thyroid carcinoma. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 25: 702-705.

Zitzelsberger H., Lehmann L., Hieber L., Weier H.G., Janish C., Negele J.F., Spelsberg F., Lengfelder E., Demidchik E.P., Salassidis K., Kellerer A.M., Werner M. y Bauchinger M. (1999) Cytogenetic changes in radiation-induced tumors of the thyroid. *Cancer Res.*, 59: 135-140.

### **Páginas web**

<http://arbl.cvmbs.colostate.edu>

<http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/biostat/schaid.cfm>

[http //source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch](http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch)

<http://www.endocrinodiabetes.com.ar/tiroides.htm>

<http://www.seep.es>

**ANEXO 1**



# 1. EXPOSICIÓN LABORAL

## 1.1. OCUPACIÓN ACTUAL

1.1.1. ¿Trabaja ahora?

Si	1
No	2

1.1.2. ¿En qué? (empresa)

-----  
 -----  
 -----  
 -----

1.1.3. ¿Hace cuantos años?

-----

1.1.4. Donde trabaja, considera que hay algún tipo de contaminación como:

Tiempo/años

Sin contaminación	0 0	-----
Ruido	0 1	-----
Disolventes u otros prod. Químicos	0 2	-----
Metales	0 3	-----
Pinturas	0 4	-----
Tintes	0 5	-----
Asbesto	0 6	-----
Radiaciones (Rayos X, etc.)	0 7	-----
Polvo (.....)	0 8	-----
Pesticidas	0 9	-----
Derivados del carbón	1 0	-----
Derivados del petróleo	1 1	-----
Otros (.....)	1 2	-----
NS/NC	1 3	-----

--	--

## 1.2. OCUPACIÓN PREVIA

1.2.1. ¿Ha realizado algún otro trabajo antes?

Si	1
No	2

1.2.2. ¿En qué? (empresa)

Fecha

-----  
 -----  
 -----

Alguno de los anteriores suponía exposición a:

Tiempo/años

Sin exposición	0 0	-----
Ruido	0 1	-----
Disolventes u otros prod. químicos	0 2	-----
Metales	0 3	-----
Pinturas	0 4	-----
Tintes	0 5	-----
Asbesto	0 6	-----
Radiaciones (Rayos X, etc.)	0 7	-----
Polvo (.....)	0 8	-----
Pesticidas	0 9	-----
Derivados del carbón	1 0	-----
Derivados del petróleo	1 1	-----
Otros (.....)	1 2	-----
NS/NC	1 3	-----


## 2. TIEMPO LIBRE

En su tiempo libre ¿realiza alguna de las siguientes actividades?

Jardinería u horticultura	<input type="checkbox"/>
Bricolage	<input type="checkbox"/>
Carpintería	<input type="checkbox"/>
Mecánica de automóviles/motos	<input type="checkbox"/>
Maquetas y modelismo	<input type="checkbox"/>
Otros (.....)	<input type="checkbox"/>
Ninguna	<input type="checkbox"/>

**En caso de respuesta afirmativa, dar detalles de posible exposición a disolventes, pinturas, colas u otras sustancias tóxicas**

.....

.....

.....

.....

.....

## 4. HÁBITOS

### 4.1. TABACO (5cigarrillos = 1 puro = 1 pipa)

No fumador	<input type="checkbox"/>
Fumador	<input type="checkbox"/>
Ex-fumador	<input type="checkbox"/>
Fumador pasivo	<input type="checkbox"/>

**Si es fumador:**

¿Cuántos años hace que fuma? ..... Años

¿Cuántos cigarrillos fuma diariamente? ..... cig/día

Marca que consume ..... mg nicotina

Nivel de nicotina/cigarrillo: ..... mg alquitrán

**Si es ex-fumador (más de un año):**

¿Cuántos años hace que lo dejó? ..... años

¿Cuántos cigarrillos fumaba diariamente? ..... cig/día

¿Durante cuántos años fumó? ..... años

#### 4. HÁBITOS

##### 4.2. CONSUMO DE ALCOHOL

4.2.1. ¿Consume algún tipo de alcohol durante las comidas o en su tiempo libre?

Si  1  
 No  2

*gr*

Vino	Vasos semanales	_____	_____
Cerveza	Botellas chicas semanales	_____	_____
Licores	Copas semanales	_____	_____
¿Otras bebidas? .....	Vasos semanales	_____	_____

gramos totales: \_\_\_\_\_

4.2.2. ¿Ha tenido alguna vez problemas de alcoholismo?

No  0  
 Sí  1  
 NS/NC  9

##### 4.3. TÉ O CAFÉ

¿Consume té o café ?

Si  1  
 No  2


Indique el número de tazas al día:

Té \_\_\_\_\_ t/día  
 Café \_\_\_\_\_ t/día


—

**5. HISTORIA MÉDICA**

**5.1. ANTECEDENTES FAMILIARES**

¿Existe algún miembro de su familia que presente o haya presentado cáncer?  
Indica el tipo de cáncer y parentesco

.....  
 .....  
 .....

**5.2. ANTECEDENTES PERSONALES**

5.2.1. ¿Tiene o ha tenido algún problema de salud relacionado con:

	No		Tiempo/años
Corazón, arterias, venas (circulatorios)		0	.....
Riñón (renales)		1	.....
Pulmón (respiratorios)		2	.....
Nervios, cerebral (neurológicos)		3	.....
Digestivos		4	.....
Piel (dérmicos)		5	.....
Infecciosos (hepatitis, mononucleosis, SIDA, meningitis)		6	.....
Cáncer		7	.....
NS/NC		8	.....
		9	.....

Especificar enfermedades y edad de padecimiento

.....  
 .....  
 .....

5.2.2. ¿Toma algún medicamento habitualmente?

	No		Tiempo años
Insulina/Tratam. Diabetes		0 0	.....
Antibióticos		0 1	.....
Tranquilizantes y psicofármacos		0 2	.....
Diuréticos		0 3	.....
Antiácidos		0 4	.....
Antihistaminicos		0 5	.....
Vitaminas y minerales		0 6	.....
Analgésicos, antipiréticos		0 7	.....
Anticonceptivos/hormonas		0 8	.....
Otros(.....)		0 9	.....
NS/NC		1 0	.....
		1 1	.....

5.2.3. ¿Se ha sometido alguna vez a terapia de rayos X (incluso en la niñez)?

No	0
Sí	1
NS/NC	9

5.2.4. ¿Ha recibido alguna transfusión de sangre en el último año

No	0
Sí	1
NS/NC	9



**ANEXO 2**



# Thyroid Cancer Susceptibility and THRA1 and BAT-40 Repeats Polymorphisms

Aida Baida,<sup>1</sup> Susan M. Farrington,<sup>2</sup> Pere Galofré,<sup>3</sup> Ricard Marcos,<sup>1</sup> and Antonia Velázquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grup de Mutagènesi, Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; <sup>2</sup>University of Edinburgh Department of Oncology and Medical Research Council Human Genetics Unit, Edinburgh, United Kingdom; and <sup>3</sup>Servei de Medicina Nuclear, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain

## Abstract

Although genetic and environmental factors have been identified in the etiology of thyroid cancer, the specific genetic implications in sporadic thyroid tumors are poorly understood but, as in other common cancers, low-penetrance susceptibility genes are believed to be crucial in the tumorigenesis processes. Here, we have carried out a case-control study to investigate whether there is an association between THRA1 CA repeat or BAT-40 A repeat polymorphisms and thyroid cancer risk. The THRA1 repeat resides in the *thyroid hormone receptor- $\alpha$ 1* gene, which is associated with thyroid cancer and whose expression depends on the THRA1 repeat size. We also analyzed the BAT-40 repeat that maps to chromosome 1, a region known to be involved in thyroid cancer. This repeat is located in the *3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase* gene that is associated with prostate cancer susceptibility. The THRA1 repeat was genotyped in 212 thyroid cancer patients and 141 controls of a Spanish population. From these individuals, 207 patients and 138

controls were also analyzed for the BAT-40 marker. No significant difference in the THRA1 allele distribution between patients and controls was found, although short alleles (<128 bp) might have some protective effect on thyroid cancer risk of carriers (odds ratio, 0.50; 95% confidence interval, 0.22-1.13;  $P = 0.094$ ). By contrast, the BAT-40 allele distribution in patients was significantly different with respect to control ( $P = 0.035$ ). Essentially, the difference were found in the genotypes involving the 111- to 115-bp allele range, which seem to be associated with a protective effect on thyroid cancer susceptibility in the studied population (odds ratio, 0.18; 95% confidence interval, 0.01-0.57;  $P = 0.02$ ). Therefore, our results indicate that the BAT-40 containing region and to a less extent the *thyroid hormone receptor- $\alpha$ 1* gene are related to thyroid cancer susceptibility. To our knowledge, this is the first study reporting the identification of genetic factors for thyroid cancer susceptibility. (Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14(3):638-42)

## Introduction

The majority of cancers occur in the sporadic form, and it is currently accepted that both genetic and environmental factors are implicated in its origin (1). In addition, low-penetrance genes or rather polymorphisms in such genes could be of great significance to understand the tumorigenic processes of these common cancers (2). By contrast, familial cancers are less frequent in the population and are associated with rare high-penetrance genes (2). Therefore, at present there is an emerging interest to find gene variants and thereby to find associations between genetic polymorphisms and cancer risk factors (3).

Thyroid cancer is the most frequent endocrine cancer with geographic variation in its manifestation (4). Both familial and sporadic forms of this type of cancer exist and, as other types of cancer, the sporadic form is the most common type of thyroid cancer (5). The role of environmental factors in the etiology of thyroid cancer is well recognized (6, 7); moreover, genetic factors involved in the tumorigenic pathway have been characterized (7, 8). Thyroid tumors range from benign to malignant manifestations and relevant genetic alterations identified in the different progression stages, include *ras* mutations in follicular tumors (9), *RET* gene rearrangements and *BRAF* mutations in papillary (10-12), *p53* mutations in anaplastic carcinoma (13), and *RET* point mutations in

medullary tumors (14). Although the association between these mutations and thyroid tumorigenesis is well accepted, the specific genetic pathways of such processes remain to be established (15).

One factor related with thyroid cancer is the expression of thyroid hormone receptors (16, 17). Thus, a correlation between increased expression of the *thyroid hormone receptor- $\alpha$ 1* gene (*NR1A1a* gene) and less aggressive thyroid cancers has been recently reported (17). Moreover, these authors also showed that the size of the THRA1 microsatellite, which resides in a noncoding region of exon 9 of the *NR1A1a* gene (18), correlates with the level of expression of this gene. In addition, several chromosome regions have been implicated in thyroid cancer, including both chromosome 1 arms (19-25). However, the putative genes relevant to thyroid carcinogenesis that reside in these chromosome regions have not yet been identified. The *3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase* gene (*HSD3B1* gene) maps on 1p13.1 and it has been reported to be involved in prostate cancer (26); therefore, the study of this gene on thyroid cancer risk would be of general interest, either to explore the possible implication of the *HSD3B1* gene on thyroid tumorigenesis, or to use it as a marker of other genetic risk factors involved in thyroid cancer development. The *HSD3B1* gene contains the commonly used intronic polymorphism BAT-40 (27, 28), which has been used in population-based studies.

The role of genetic variants in determining individual susceptibility to cancer is an increasingly prominent research area. Association studies to identify genetic risk factors to cancer are just emerging (29-32). Related to thyroid cancer risk, few studies have been reported, mostly referring to environmental factors (33-37). Consequently, although specific genotypes associated with thyroid cancer risk have not yet been described; as in other common cancers, the importance of genetic variants to the risk of sporadic thyroid cancer might be

Received 6/9/04; revised 9/8/04; accepted 10/28/04.

**Grant support:** Spanish Ministry of Science and Technology project PM 1999-0067, Generalitat de Catalunya grant (SGR-00197-2002), and Universitat Autònoma de Barcelona predoctoral fellowship (A. Baida).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

**Requests for reprints:** Antonia Velázquez, Universitat Autònoma de Barcelona, Genètica i de Microbiologia, Barcelona, Spain 08193. Phone: 34-93-5813111; Fax: 34-93-5812387. E-mail: antonia.velazquez@uab.es

Copyright © 2005 American Association for Cancer Research.

expected. Here we have done a case-control study to investigate whether there is an association between the THRA1 repeat polymorphisms and thyroid cancer risk. In addition, we extended the analysis to the BAT-40 microsatellite marker to find possible associations of the *HSD3B1* gene or its chromosome 1 containing region with thyroid cancer susceptibility.

## Materials and Methods

**Patient Groups and DNA Isolation.** Control and patient groups in this study were unrelated subjects from Spain. Blood samples were collected from 141 healthy individuals (67 women and 74 men), mean age of  $37.7 \pm 10.8$  years and 212 thyroid cancer patients (157 women, 55 men), mean age of  $44.4 \pm 14.6$  years. The cancer patients were from the Nuclear Medicine Service of the Hospital Vall d'Hebron (Barcelona, Spain). Tumors of these patients were classified as papillary ( $n = 161$ ) and follicular carcinomas (36), or Hürthle cell carcinomas (2). This information was not available for 13 individuals at the time of the study and they were considered as unclassified.

DNA was isolated from blood samples using a standard phenol-chloroform method and dissolved in 30 to 100  $\mu$ L of TE [10 mmol/L Tris, 0.2 mmol/L EDTA (pH 7.5)].

**Genotype Analysis.** THRA1 and BAT-40 genotypes from both control and patient individuals were analyzed by separate PCR reactions. The primers used to amplify the THRA1 sequence were 5'-CTTAAGCAGTGGGGAACCTG-3' and 5'-ATAGCATTGCCTTCCCATGT-3' (38). Thus, the PCR product of 128 bp was considered to contain 18 CA repeats according to the sequence of the *NR1A1a* gene (Genbank accession no. X55068). The amplified products were labeled using 2.4  $\mu$ Ci of [ $\alpha^{33}$ -P]dCTP (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) and 2.5 units of Taq polymerase were used in the PCR reaction. The BAT-40 primers were 5'-AATAACTTCCTACACCACAAC-3' (4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein-labeled) and 5'-GTAGAGCAAGACCACCTT-3' (39), which amplify a 126-bp product containing the standard 40 A repeat, according to the sequence of the *HSD3B1* gene (Genbank accession no. M38180). To amplify this sequence, 0.75 unit of Taq polymerase was used.

THRA1 and BAT-40 PCR reactions were done in a final volume of 30  $\mu$ L using 100 ng of DNA in 1 $\times$  PCR buffer [10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 50 mmol/L KCl, 0.01% gelatin], 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L of each deoxynucleotide triphosphates, and 0.1  $\mu$ mol/L of each primer. Amplifications were done using a PT-100 thermocycler (MJ Research, Waltham, MA) as follows: for BAT-40, 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 55°C for 45 seconds, and 72°C for 1 minute, with an initial denaturing step of 95°C for 5 minutes and a final extension step of 72°C for 5 minutes. For THRA1: 30 cycles of 94°C for 40 seconds, 54°C for 40 seconds, and 72°C for 40 seconds, with a denaturing step of 94°C for 3 minutes and a final extension step of 72°C for 5 minutes.

BAT-40 PCR products were analyzed using Applied Biosystems Automated Genetic Analysers (ABI310 or the ABI3100) with Genescan software. THRA1 PCR products were analyzed on 6% denaturing polyacrilamide gels (2.5 hours at 100 W) and visualized by autoradiography. The 30- to 330-bp ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) labeled with [ $\gamma^{33}$ -P]dATP (Amersham Biosciences) was used as molecular weight marker.

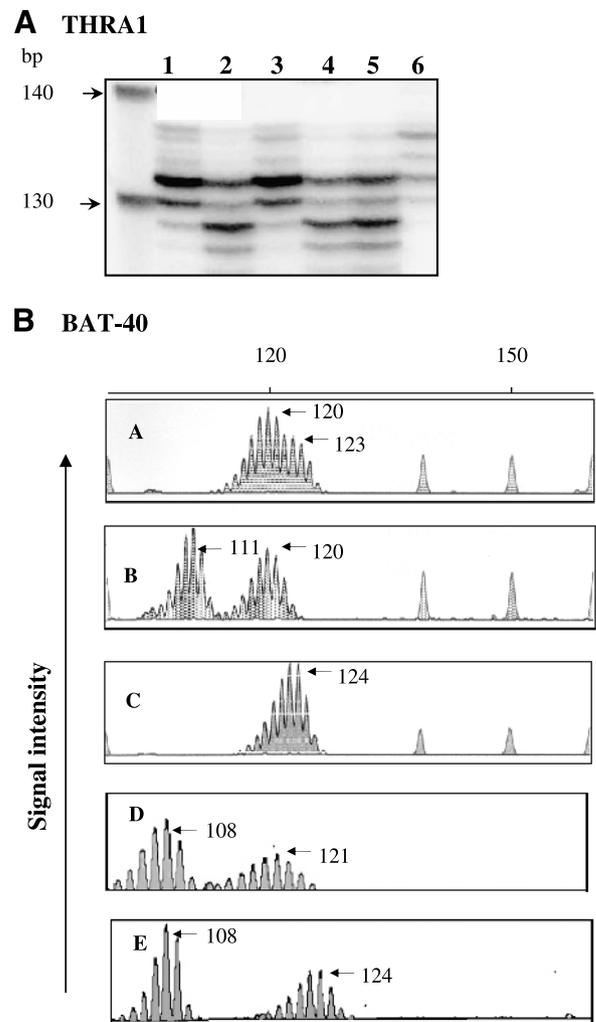
**Statistical Analysis.** Allele distributions of control and cancer patient groups were compared using the Mann Whitney test and the  $\chi^2$  test on the Minitab (v. 13) statistical package, with a 5% of level significance. Allele ranges were analyzed separately using the Fisher's exact test. Odds ratios of the genotype sets of patients with respect to the control were

calculated at 95% confidence intervals. The last two analyses were done by using the SPSS version 11.5 statistical software (SPSS, Inc., Chicago, IL).

## Results and Discussion

### THRA1 Repeat Polymorphisms and Thyroid Cancer Risk.

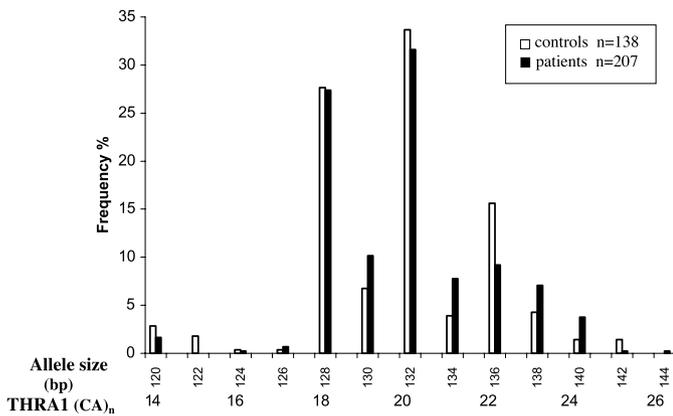
The THRA1 poly(CA)<sub>n</sub> microsatellite, located in the *NR1A1a* gene, was examined in 141 healthy unrelated individuals and in 212 thyroid cancer individuals, who originated from the same geographic area. The pattern of PCR products of the THRA1 microsatellite obtained by autoradiography detection is shown in Fig. 1A. The genotype frequencies in control and patient cohorts are summarized in Table 1, and thereby the level of heterozygosity in control and patient groups was estimated as 70.9% and 71.2%, respectively. The previously reported characteristics of the THRA1 microsatellite also indicate a 78% of heterozygosity for this microsatellite (40), which is in concordance with our results. In addition, we have



**Figure 1.** Representative allelic patterns of THRA1 and BAT-40 PCR products. **A.** Detection by autoradiography of the THRA1 CA repeat. Individuals 1 and 3 are homozygous (132/132 bp) whereas individuals 2, 4, 5, and 6 are heterozygous (132/128 bp for individuals 2, 4, and 5 and 136/132 bp for individual 6). **B.** Electropherograms of the BAT-40 A repeat. Homozygous (C) and heterozygous (A, B, D, and E) genotypes are shown. Allele size is indicated in each case.

**Table 1. Genotypes of *THRA1* and *BAT-40* loci**

<i>THRA1</i> genotype (bp)	Control (n = 141), no. cases (%)	Patient (n = 212), no. cases (%)	<i>BAT-40</i> genotype (bp)	Control (n = 138), no. cases (%)	Patient (n = 207), no. cases (%)
<b>Homozygotes</b>			<b>Homozygotes</b>		
128/128	10 (7.1)	16 (7.5)	119/119	7 (5.2)	11 (5.3)
130/130	4 (2.8)	9 (4.2)	120/120	15 (10.9)	21 (10.1)
132/132	16 (11.3)	23 (10.8)	121/121	5 (3.6)	9 (4.3)
134/134	2 (1.4)	6 (2.8)	122/122	6 (4.3)	9 (4.3)
136/136	7 (5)	3 (1.4)	123/123	32 (23.1)	51 (24.6)
138/138	1 (0.7)	3 (1.4)	124/124	17 (12.3)	35 (16.9)
140/140	0 (0)	1 (0.5)	125/125	1 (0.7)	1 (0.5)
<b>Heterozygotes</b>			<b>Heterozygotes</b>		
120/126	1 (0.7)	0 (0)	96/119	0 (0)	1 (0.5)
120/128	2 (1.4)	3 (1.4)	101/119	1 (0.7)	0 (0)
120/130	0 (0)	1 (0.5)	102/120	0 (0)	1 (0.5)
120/132	5 (3.5)	2 (0.9)	103/108	0 (0)	1 (0.5)
120/134	0 (0)	1 (0.5)	104/120	0 (0)	1 (0.5)
122/128	2 (1.4)	0 (0)	104/123	0 (0)	1 (0.5)
122/132	2 (1.4)	0 (0)	105/125	1 (0.7)	1 (0.5)
122/136	1 (0.7)	0 (0)	106/120	1 (0.7)	0 (0)
124/128	0 (0)	1 (0.5)	107/120	0 (0)	1 (0.5)
124/132	1 (0.7)	0 (0)	108/121	0 (0)	1 (0.5)
126/128	0 (0)	1 (0.5)	108/124	0 (0)	1 (0.5)
126/132	0 (0)	1 (0.5)	110/124	0 (0)	1 (0.5)
126/134	0 (0)	1 (0.5)	111/120	1 (0.7)	0 (0)
128/130	6 (4.3)	6 (2.8)	111/123	2 (1.4)	0 (0)
128/132	29 (20.6)	50 (23.6)	111/124	1 (0.7)	0 (0)
128/134	3 (2.1)	4 (1.9)	114/120	1 (0.7)	0 (0)
128/136	7 (5)	11 (5.2)	114/124	0 (0)	1 (0.5)
128/138	4 (2.8)	7 (3.3)	115/118	1 (0.7)	0 (0)
128/140	3 (2.1)	1 (0.5)	115/119	1 (0.7)	0 (0)
128/142	2 (1.4)	0 (0)	116/123	0 (0)	1 (0.5)
130/132	3 (2.1)	8 (3.8)	119/121	1 (0.7)	0 (0)
130/134	0 (0)	3 (1.4)	119/122	2 (1.4)	5 (2.4)
130/136	0 (0)	3 (1.4)	119/123	0 (0)	3 (1.6)
130/138	2 (1.4)	5 (2.4)	119/124	1 (0.7)	0 (0)
130/140	0 (0)	1 (0.5)	119/125	0 (0)	1 (0.5)
132/134	1 (0.7)	1 (0.5)	120/122	28 (20.3)	29 (14)
132/136	19 (13.5)	14 (6.6)	120/123	4 (3.3)	0 (0)
132/138	2 (1.4)	3 (1.4)	120/124	5 (4.1)	7 (3.7)
132/140	1 (0.7)	9 (4.2)	120/125	1 (0.7)	4 (2.1)
134/136	1 (0.7)	2 (0.9)	120/126	0 (0)	3 (1.6)
134/138	1 (0.7)	5 (2.4)	120/127	1 (0.7)	1 (0.5)
134/140	0 (0)	2 (0.9)	120/130	0 (0)	1 (0.5)
134/142	1 (0.7)	0 (0)	121/123	1 (0.7)	1 (0.5)
136/138	1 (0.7)	2 (0.9)	122/129	0 (0)	1 (0.5)
136/140	0 (0)	1 (0.5)	124/126	0 (0)	1 (0.5)
136/142	1 (0.7)	0 (0)	124/130	1 (0.7)	1 (0.5)
138/142	0 (0)	1 (0.5)			
138/144	0 (0)	1 (0.5)			



**Figure 2.** *THRA1* CA repeat allele distribution in control and thyroid cancer subjects. According to the Genbank sequence (accession no. X55068), the standard 18 CA repeat corresponds to the 128-bp PCR product.

found that the *THRA1* allelic variants range from 14 to 26 CA repeats (Fig. 2), and a similar allele range has also been reported in a group of thyroid cancer patients and cell lines (17). Both control and patient groups showed two most common alleles corresponding to PCR products of 132 bp (average frequency, 37.7%) and 128 bp (average frequency, 27.7%) with 20 and 18 CA repeats, respectively. When comparing the allele frequencies between patients and control, no significant differences were observed ( $P = 0.577$ , Mann-Whitney test). However, because the *THRA1* repeat length has been directly related to the expression of the *NRI1a* gene and because such expression has also been suggested to affect cellular differentiation in thyroid cancers (17), we have looked at the genotypes involving alleles at each end of the *THRA1* CA repeat range (i.e., carriers of one or two alleles shorter than the 128-bp modal allele, or longer than the 132-bp modal allele). The results are presented in Table 2. Whereas carriers of the >132-bp alleles showed no association with thyroid cancer risk, carriers of at least one allele <128 bp could have some protective effect in thyroid cancer risk (odds ratio, 0.50; 95% confidence interval, 0.22-1.13), although the probability is on the border line and not

**Table 2. THRA1 genotypes involving alleles at each end of the repeat range**

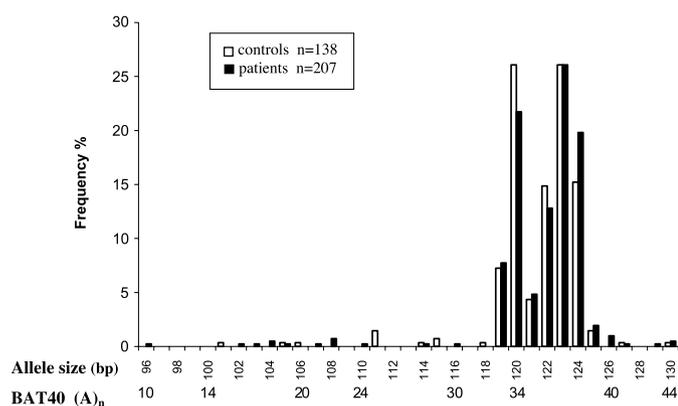
Allele (bp)	Control	Patients	Odds ratio (95% confidence interval)	P
<128	14	11	0.50 (0.21-1.13)	0.09
>132	60	91	1.04 (0.68-1.61)	0.88

NOTE: One and two carriers are considered in each range.

statistically significant ( $P = 0.09$ ). Authors of a recent study analyzing 30 thyroid tumors for *NR1A1a* expression postulate that lower than average expression of these gene is associated with shorter than average THRA1 microsatellite (<18 CA repeats) and with aggressive thyroid tumors (17). This assumption apparently disagrees with our results comparing normal and thyroid cancer cohorts for THRA1 variants. However, based on the known implication of the *NR1A1a* gene in gene regulation affecting different pathways important for cell differentiation (41-43), we propose that short THRA1 repeats and thereby a decreased expression of *NR1A1a* could provide a protective effect to thyroid cancer risk. On the other hand, a reduced presence of thyroid hormone receptor- $\alpha 1$  would possibly lead to cell invasion, as previously suggested by Onda et al. (17). Because papillary and follicular thyroid carcinoma are genetically and clinically different, a possible association of the type of thyroid cancer with genotypes involving short or long THRA1 alleles was investigated and no significant differences were observed (Fisher's exact test).

**BAT-40 Genetic Marker and Thyroid Cancer Risk.** Studies done to determine the utility of the BAT-40 poly(A)<sub>n</sub> microsatellite in microsatellite instability studies have highlighted the polymorphic nature of this microsatellite (44-48). This characteristic of the BAT-40 repeat has been exploited in the present study to analyze whether there is an association between the BAT-40 containing region of the chromosome 1 with thyroid cancer susceptibility. Herein, low-penetrance genes involved in thyroid cancer risk could be identified.

The study was done with the control and patient subjects used in the THRA1 analysis. Specifically, 138 control and 207 patient individuals were genotyped for BAT-40 allele variants. Representative electropherograms of BAT-40 PCR products are shown in Fig. 1B. Each allele is displayed as a single peak complex, and to determine the allele size, we followed the same criteria used by others and us previously (45, 47). Thus,



**Figure 3.** BAT-40 A repeat allele distribution in control and thyroid cancer subjects. According to the Genbank sequence (accession no. M38180), the standard 40 A repeat corresponds to the 126-bp PCR product.

**Table 3. BAT-40 genotypes involving different allele range**

Allele range (bp)	Control	Patients	Odds ratio (95% confidence interval)	P
<111	3	10	2.28 (0.62-8.45)	0.22
111-115	7	1	0.18 (0.01-0.75)	0.02
116-120	72	91	0.72 (0.47-1.10)	0.14
121-125	109	165	1.04 (0.61-1.78)	0.87
>125	2	7	2.38 (0.49-11.16)	0.28

NOTE: One and two carriers are considered in each range.

the predominant peak in each peak complex was considered as the allele size, given that the rest of the peaks are due to DNA polymerase slippage.

The BAT-40 genotype frequencies of control and patient subjects are presented in Table 1. Both groups showed a similar heterozygosity, 39.9% and 33.8% for controls and patients, respectively. Different levels of BAT-40 heterozygosity have been reported in different populations, ranging from 14.6% in a Japanese population (46) to 72% in American studies (44). The average heterozygosity found in the Spanish population of the present study was 36.8%, which also differs of the 59.7% of heterozygosity observed in a Scottish group (47).

In Fig. 3, the BAT-40 allele frequencies in control and patient groups are compared. A bimodal distribution of BAT-40 allele variants was found in both groups, with 120 and 123 bp as modal alleles. Previous studies also describe a bimodal distribution for BAT-40 alleles in different analyzed groups (44, 45, 47). In our study, differences in the BAT-40 allele between control and patient individuals were not statistically significant ( $P = 0.074$ , Mann Whitney test), but a wider allele range was observed in the patient cohort than in the control (96-130 and 110-130 bp, respectively; Fig. 3). Hence, the data was analyzed further and when the allele distributions were grouped in sets of equal intervals differing in 5 bp, significant differences between control and patient groups were observed ( $P = 0.035$ , likelihood ratio). Moreover, the 111- to 115-bp allele range was identified to be the cause for the differences ( $P = 0.008$ , Fisher's exact test). BAT-40 genotypes of patient and control cohorts also reflect the difference in the allele distributions (see Table 1). Thus, genotypes involving alleles in the 111 to 115 bp range are present in seven individuals of the control group (5.1%), but only one patient (0.05%), and the odds ratio indicate that these genotypes have a protective effect to thyroid cancer susceptibility in the studied population (odds ratio, 0.18; 95% confidence interval, 0.01-0.57;  $P = 0.02$ ; Table 3), although showed no association with the type of thyroid cancer, papillary or follicular (Fisher's exact test). Moreover, genotypes involving alleles at both boundaries of the BAT-40 variant distributions (i.e., <111 and >125 bp), were found to be >2-fold more frequent in patient group than in the control group (4.8% and 2.1%, for genotypes with <111-bp alleles; 3.9% and 1.5%, for genotypes with >125-bp alleles; respectively). However, no association of either genotype group with thyroid cancer susceptibility was observed (see Table 3). The power of this analysis could be reduced by the low frequency of short allele carriers found in our population and the sample size of the group studied. In addition, taking into account that it has been reported that mutations at mononucleotide repeats take place with a bias to expansion (49, 50), it is unlikely that the higher frequency of the <111-bp alleles found in the patient group with respect to the control would have taken place by chance. Therefore, based on the present results, the hypothesis that short BAT-40 alleles would comprise a genetic marker for thyroid cancer risk can not be discarded; however, more extensive analyses are needed to validate this assumption, including haplotype analysis of the BAT-40 containing region. At the clinical level,

analysis of the clinopathologic characteristics of individuals bearing <111-bp alleles, or >125-bp alleles, or individuals with <111-bp alleles together with individuals of >125-bp alleles, showed no differences with respect to sex, age of cancer diagnosis, and type thyroid cancer.

The *HSD3B1* gene containing the BAT-40 microsatellite has been suggested to be related to prostate cancer susceptibility; thus, several gene variants have been described to be associated with risk of this type of cancer (26), but not the BAT-40 polymorphism. Because the BAT-40 A repeat resides in the intron 2 of the *HSD3B1* gene, and no evidences of biological consequences of BAT-40 polymorphisms exist, any direct implication of BAT-40 alleles in cancer susceptibility is unlikely. However, our findings indicate that the BAT-40 region of chromosome 1 contains gene/s related to thyroid cancer susceptibility, which would suggest that genetic variants of these genes could have either a protective or a risk effect on thyroid cancer. Further studies are needed to identify these important genes for sporadic thyroid cancer.

## Acknowledgments

We thank the subject that participated in this study; the members of the Nuclear Medicine Department, Hospital Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) for providing patient blood samples; Sara Gutierrez and Alba Hernández for support in collecting and DNA isolation of samples; and Peter Teague (Medical Research Council Human Genetic Unit, Edinburgh) for his assistance on the statistical analysis.

## References

- Ponder BA. Cancer genetics. *Nature* 2001;411:336–41.
- Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet* 2003;33:238–44.
- Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:843–54.
- Farid NR, Shi Y, Zou M. Molecular basis of thyroid cancer. *Endocr Rev* 1994;15:202–32.
- Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003;361:501–11.
- Kazakov VS, Demidchik EP, Astakhova LN. Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 1992;359:421.
- Farid NR. Molecular pathogenesis of thyroid cancer: the significance of oncogenes, tumor suppressor genes, and genomic instability. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996;104:1–12.
- Hunt JL. Molecular mutations in thyroid carcinogenesis. *Am J Clin Pathol* 2002;118:S116–27.
- Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, et al. High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* 1989;4:159–64.
- Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected *in vivo* in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990;60:557–63.
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:1454–7.
- Namba H, Nakashima M, Hayashi T, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4393–7.
- Ito T, Seyama T, Mizuno T, et al. Genetic alterations in thyroid tumor progression: association with p53 gene mutations. *Jpn J Cancer Res* 1993;84:526–31.
- Giuffrida D, Gharib H. Current diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. *Ann Oncol* 1998;9:695–701.
- Vecchio G, Santoro M. Oncogenes and thyroid cancer. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:113–6.
- Wallin G, Bronnegard M, Grimelius L, McGuire J, Topping O. Expression of the thyroid hormone receptor, the oncogenes *c-myc* and *H-ras*, and the 90 kD heat shock protein in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue. *Thyroid* 1992;2:307–13.
- Onda M, Li D, Suzuki S, et al. Expansion of microsatellite in the thyroid hormone receptor- $\alpha$ 1 gene linked to increased receptor expression and less aggressive thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:2870–4.
- Laudet V, Begue A, Henry-Dutoit C, et al. Genomic organization of the human thyroid hormone receptor  $\alpha$  (*c-erbA-1*) gene. *Nucleic Acids Res* 1991;19:1105–12.
- Tung WS, Shevlin DW, Kaleem Z, Tribune DJ, Wells SA Jr, Goodfellow PJ. Allelotyping of follicular thyroid carcinomas reveals genetic instability consistent with frequent nondisjunctional chromosomal loss. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;19:43–51.
- Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Ito K, Emi M. Allelotyping of anaplastic thyroid carcinoma: frequent allelic losses on 1q, 9p, 11, 17, 19p, and 22q. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:244–51.
- Kleer CG, Bryant BR, Giordano TJ, Sobel M, Merino MJ. Genetic changes in chromosomes 1p and 17p in thyroid cancer progression. *Endocr Pathol* 2000;11:137–43.
- Kjellman P, Lagercrantz S, Hoog A, Wallin G, Larsson C, Zedenius J. Gain of 1q and loss of 9q21.3-q32 are associated with a less favorable prognosis in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:43–9.
- Roque L, Nunes VM, Ribeiro C, Martins C, Soares J. Karyotypic characterization of papillary thyroid carcinomas. *Cancer* 2001;92:2529–38.
- Stoler DL, Datta RV, Charles MA, et al. Genomic instability measurement in the diagnosis of thyroid neoplasms. *Head Neck* 2002;24:290–5.
- Wreesmann VB, Ghossein RA, Patel SG, et al. Genome-wide appraisal of thyroid cancer progression. *Am J Pathol* 2002;161:1549–56.
- Chang BL, Zheng SL, Hawkins GA, et al. Joint effect of HSD3B1 and HSD3B2 genes is associated with hereditary and sporadic prostate cancer susceptibility. *Cancer Res* 2002;62:1784–9.
- Lachance Y, Luu-The V, Labrie C, et al. Characterization of human 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 1990;265:20469–75.
- McBride MW, McVie AJ, Burridge SM, et al. Cloning, expression, and physical mapping of the 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene cluster (HSD3BP1-HSD3BP5) in human. *Genomics* 1999;1:277–84.
- Gonzalez CA, Sala N, Capella G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* 2002;100:249–60.
- Kiyohara C, Otsu A, Shirakawa T, Fukuda S, Hopkin JM. Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: a review. *Lung Cancer* 2002;37:241–56.
- Lillie EO, Bernstein L, Ursin G. The role of androgens and polymorphisms in the androgen receptor in the epidemiology of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003;5:164–73.
- Ntais C, Polycarpou A, Tsatsoulis A. Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes. *Eur J Endocrinol* 2003;149:469–77.
- Farahati J, Demidchik EP, Biko J, Reimers C. Inverse association between age at the time of radiation exposure and extent of disease in cases of radiation-induced childhood thyroid carcinoma in Belarus. *Cancer* 2000;88:1470–6.
- Frentzel-Beyme R, Helmert U. Association between malignant tumors of the thyroid gland and exposure to environmental protective and risk factors. *Rev Environ Health* 2000;15:337–58.
- Moysich KB, Menezes RJ, Michalek AM. Chernobyl-related ionising radiation exposure and cancer risk: an epidemiological review. *Lancet Oncol* 2002;3:269–79.
- Hernandez A, Cespedes W, Xamena N, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms in thyroid cancer patients. *Cancer Lett* 2003;190:37–44.
- Matakidou A, Hamel N, Polpat S, et al. Risk of non-medullary thyroid cancer influenced by polymorphic variation in the thyroglobulin gene. *Carcinogenesis* 2004;25:369–73.
- Onda M, Nakamura I, Suzuki S, et al. Microsatellite instability in thyroid cancer: hot spots, clinicopathological implications, and prognostic significance. *Clin Cancer Res* 2001;7:3444–9.
- Liu B, Farrington SM, et al. Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nat Med* 1995;1:348–52.
- Sakurai A, Bell GI, DeGroot LJ. Dinucleotide repeat polymorphism in the human thyroid hormone receptor  $\alpha$  gene (THRA1) on chromosome 17. *Hum Mol Genet* 1992;1:553.
- Saatcioglu F, Deng T, Karin M. A novel cis element mediating ligand-independent activation by c-ErbA: implications for hormonal regulation. *Cell* 1993;75:1095–105.
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 1996;10:1167–77.
- Dellovade TL, Chan J, Vennstrom B, Forrest D, Pfaff DW. The two thyroid hormone receptor genes have opposite effects on estrogen-stimulated sex behaviors. *Nat Neurosci* 2000;3:472–5.
- Zhou XP, Hoang JM, Cottu P, Thomas G, Hamelin R. Allelic profiles of mononucleotide repeat microsatellites in control individuals and in colorectal tumors with and without replication errors. *Oncogene* 1997;15:1713–8.
- Samowitz WS, Slattery ML, Potter JD, Leppert MF. BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. *Am J Pathol* 1999;154:1637–41.
- Yokozaki H. Distribution of germline BAT-40 poly-adenine tract microsatellite variants in the Japanese. *Int J Mol Med* 2000;6:445–8.
- Bacon A, Dunlop MG, Farrington SM. Hypermutability at a poly(A/T) tract in the human germline. *Nucleic Acids Res* 2000;29:4405–13.
- Mukherjee M, Vaish M, Mittal RD, Mittal B. Allelic variation of BAT-26 and BAT-40 poly-adenine repeat loci in North Indians. *Int J Mol Med* 2002;9:91–4.
- Farrall M, Weeks DE. Mutational mechanisms for generating microsatellite allele-frequency distributions: an analysis of 4,558 markers. *Am J Hum Genet* 1998;62:1260–2.
- Ellegren H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat Genet* 2000;24:400–2.

## **ANEXO 3**

**TABLAS DE RESULTADOS DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS SNPs  
DE LA REGIÓN 1p12-13**

(Se muestran en negrita los valores de odds ratio con  $p < 0,05$ )

**rs2145418**

rs2145418	rs1241	Controles (n=135) n (%)	Pacientes (n=195) n (%)	Odds Ratio IC 95%
TT	TT	32 (23,7)	21 (10,8)	1,00 (Ref.)
TT	CT	50 (37)	22 (11,3)	0,67 (0,30-1,51)
TT	CC	5 (3,7)	1 (0,5)	0,22 (0,02-2,40)
TG	TT	15 (11,1)	39 (20)	<b>3,62 (1,50-8,71)</b>
TG	CT	18 (13,3)	34 (17,4)	<b>2,71 (1,13-6,46)</b>
TG	CC	2 (1,5)	11 (5,6)	<b>7,41 (1,35-40,6)</b>
GG	TT	5 (3,7)	28 (14,3)	<b>9,14 (2,78-30,0)</b>
GG	CT	7 (5,2)	34 (17,4)	<b>8,03 (2,78-23,2)</b>
GG	CC	1 (0,7)	5 (2,6)	8,02 (0,78-82,5)

**p de interacción= 0,62**

rs2145418	rs7515409	Controles (n=133) n (%)	Pacientes (n=182) n (%)	Odds Ratio IC 95%
TT	TT	29 (21,8)	11 (6,0)	1,00 (Ref.)
TT	CT	43 (32,3)	22 (12,1)	1,60 (0,63-4,05)
TT	CC	15 (11,3)	7 (3,8)	1,68 (0,48-5,84)
TG	TT	7 (5,3)	22 (12,1)	<b>12,5 (3,8-41,05)</b>
TG	CT	23 (17,3)	34 (18,7)	<b>3,79 (1,48-9,71)</b>
TG	CC	3 (2,2)	22 (12,1)	<b>18,4 (4,33-78,6)</b>
GG	TT	1 (0,8)	17 (9,3)	<b>67,4 (7,1-642,03)</b>
GG	CT	11 (8,3)	37 (20,3)	<b>11,6 (3,98-33,70)</b>
GG	CC	1 (0,8)	10 (5,5)	<b>40,2 (3,87-416,8)</b>

**p de interacción= 0,07**

rs2145418	rs3765945	Controles (n=136) n (%)	Pacientes (n=154) n (%)	Odds Ratio IC 95%
TT	TT	38 (27,9)	20 (12,9)	1,00 (Ref.)
TT	CT	40 (29,4)	18 (11,7)	1,16 (0,50-2,71)
TT	CC	10 (7,4)	6 (3,9)	1,11 (0,31-3,93)
TG	TT	10 (7,4)	26 (16,9)	<b>5,10 (1,89-13,5)</b>
TG	CT	25 (18,4)	49 (31,8)	<b>4,21 (1,92-9,20)</b>
TG	CC	0 (0)	8 (5,2)	-----
GG	TT	7 (5,1)	24 (15,6)	<b>6,71 (2,26-19,9)</b>
GG	CT	6 (4,4)	41 (26,6)	<b>17,70 (5,8-53,4)</b>
GG	CC	0 (0)	2 (1,3)	-----

**p de interacción= 0,27**

rs2145418	rs4659200	Controles (n=136) n (%)	Pacientes (n=194) n (%)	Odds Ratio IC 95%
TT	CC	36 (26,5)	17 (8,8)	1,00 (Ref.)
TT	TC	39 (28,7)	21 (10,8)	0,81 (0,34-1,95)
TT	TT	13 (9,6)	6 (3,1)	0,96 (0,28-3,27)
TG	CC	13 (9,6)	42 (21,6)	<b>5,11 (2,05-12,7)</b>
TG	TC	12 (8,8)	31 (16)	<b>5,80 (2,22-15,2)</b>
TG	TT	10 (7,4)	10 (5,1)	1,12 (0,35-3,61)
GG	CC	5 (3,7)	22 (11,3)	<b>7,09 (2,09-24,1)</b>
GG	TC	6 (4,4)	35 (18)	<b>12,32 (4,01-37,9)</b>
GG	TT	2 (1,5)	10 (5,1)	<b>14,45 (2,39-87,6)</b>

p de interacción= 0,19

### rs4658973

Rs4658973	Rs1241	Controles (n=125) n (%)	Pacientes (n=183) n (%)	Odds Ratio IC 95%
TT	TT	16 (12,8)	60 (32,8)	1,00 (Ref.)
TT	CT	24 (19,2)	47 (25,7)	0,57 (0,26-1,25)
TT	CC	1 (0,8)	7 (3,8)	1,36 (0,15-12,4)
GT	TT	22 (17,6)	24 (13,1)	<b>0,30 (0,12-0,71)</b>
GT	CT	33 (26,4)	33 (18)	<b>0,25 (0,12-0,56)</b>
GT	CC	4 (3,2)	6 (3,3)	0,69 (0,15-3,23)
GG	TT	10 (8)	2 (1,1)	<b>0,06 (0,01-0,34)</b>
GG	CT	14 (11,2)	1 (0,5)	<b>0,02 (0,00-0,17)</b>
GG	TT	1 (0,8)	3 (1,6)	0,85 (0,08-9,17)

p de interacción= 0,46

Rs4658973	Rs7515409	Controles (n=170) n (%)	Pacientes (n=208) n (%)	Odds Ratio IC 95%
TT	TT	8 (4,7)	25 (12)	1,00 (Ref.)
TT	CT	29 (17,1)	63 (30,3)	0,70 (0,27-1,79)
TT	CC	23 (13,5)	34 (16,3)	0,48 (0,18-1,29)
GT	TT	27 (15,9)	34 (16,3)	0,46 (0,17-1,23)
GT	CT	57 (33,5)	38 (18,3)	<b>0,22 (0,09-0,55)</b>
GT	CC	8 (4,7)	8 (3,8)	0,34 (0,09-1,25)
GG	TT	18 (10,6)	3 (1,4)	<b>0,06 (0,01-0,27)</b>
GG	CT	19 (11,2)	3 (1,4)	<b>0,05 (0,01-0,22)</b>
GG	CC	1 (0,6)	0 (0)	-----

p de interacción= 0,76

Rs4658973	Rs3765945	Controles (n=125) n (%)	Pacientes (n=183) n (%)	Odds Ratio IC 95%
TT	TT	18 (14,4)	48 (26,2)	1,00 (Ref.)
TT	CT	20 (16)	57 (31,1)	1,11 (0,50-2,49)
TT	CC	3 (2,4)	9 (4,9)	0,66 (0,15-2,88)
GT	TT	25 (20)	17 (9,3)	<b>0,18 (0,07-0,44)</b>
GT	CT	32 (25,6)	41 (22,4)	0,56 (0,26-1,22)
GT	CC	2 (1,6)	5 (2,7)	0,76 (0,13-4,55)
GG	TT	7 (5,6)	2 (1,1)	<b>0,11 (0,02-0,63)</b>
GG	CT	17 (13,6)	4 (2,2)	<b>0,09 (0,03-0,34)</b>
GG	CC	1 (0,8)	0 (0)	-----

**p de interacción= 0,26**

Rs4658973	Rs4659200	Controles (n=125) n (%)	Pacientes (n=183) n (%)	Odds Ratio IC 95%
TT	CC	15 (12)	56 (30,6)	1,00 (Ref.)
TT	TC	18 (14,4)	46 (25,1)	0,90 (0,39-2,08)
TT	TT	8 (6,4)	12 (6,6)	0,44 (0,14-1,36)
GT	CC	22 (17,6)	21 (11,5)	<b>0,31 (0,13-0,75)</b>
GT	TC	26 (20,8)	34 (18,6)	<b>0,37 (0,16-0,82)</b>
GT	TT	11 (8,8)	8 (4,4)	<b>0,25 (0,08-0,80)</b>
GG	CC	12 (9,6)	1 (0,5)	<b>0,03 (0,00-0,28)</b>
GG	TC	9 (7,2)	2 (1,1)	<b>0,07 (0,01-0,40)</b>
GG	TT	4 (3,2)	3 (1,6)	0,20 (0,04-1,05)

**p de interacción= 0,42**