



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Biociencias

Departamento de Genética y Microbiología

**EXPRESIÓN Y REGULACIÓN
DE LOS GENES *WDR3* Y *TBX15* EN CÁNCER**

TESIS DOCTORAL

Esteban Mariano Giménez

2012



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Biociencias

Departamento de Genética y Microbiología

**EXPRESIÓN Y REGULACIÓN
DE LOS GENES *WDR3* Y *TBX15* EN CÁNCER**

Memoria presentada por ESTEBAN MARIANO GIMÉNEZ en el marco de los estudios de doctorado en Genética para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Dra. Antonia Velázquez Henar

Directora de tesis

Esteban Mariano Giménez

ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
I- INTRODUCCIÓN.....	1
1-GENÉTICA DEL CÁNCER.....	3
2-REGIÓN 1p12 Y CÁNCER.....	6
3-LOS GENES <i>WDR3</i> Y <i>TBX15</i>.....	8
3.1-FAMILIA GÉNICA WDR.....	9
3.1.1-Proteínas WDR y cáncer.....	12
3.1.2-La función de <i>WDR3</i>	13
3.2-FAMILIA GÉNICA T-BOX.....	14
3.2.1-Proteínas T-box y cáncer.....	17
3.2.2-La función de <i>TBX15</i>	18
4- EPIGENÉTICA Y CÁNCER.....	20
4.1-METILACIÓN DEL DNA.....	21
4.2-MODIFICACIONES DE HISTONAS.....	26
4.3-POSICIONAMIENTO DE NUCLEOSOMAS.....	28
4.4-APROXIMACIONES AL ESTUDIO EPIGENÉTICO DEL CÁNCER....	29
4.4.1-Estudio de la metilación del DNA.....	30
4.4.2-Estudio de modificaciones de histonas.....	32
5-CÁNCER DE TIROIDES.....	33
5.1- GENÉTICA DEL CÁNCER DE TIROIDES.....	37
5.2-EPIGENÉTICA DEL CÁNCER DE TIROIDES.....	40
5.2.1-Metilación de genes específicos de la tiroides.....	40
5.2.2-Metilación de genes supresores de tumores.....	41
5.2.3-Metilación de otros genes.....	43
5.2.4-Modificaciones de histonas.....	43
II- OBJETIVOS.....	45
III- MATERIALES Y MÉTODOS.....	49

ÍNDICE

1-CÉLULAS.....	51
2-MUESTRAS DE PACIENTES Y CONTROLES.....	52
3-EXTRACCIÓN DE DNA.....	52
4-EXTRACCIÓN DE RNA.....	53
5-SÍNTESIS DE cDNA.....	53
6-EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	53
7- GENOTIPADO.....	53
7.1-SELECCIÓN DE SNPs.....	53
7.2-MÉTODO DE GENOTIPADO.....	53
8-PCR CUANTITATIVA (qPCR).....	54
9-WESTERN BLOT.....	55
10-SECUENCIACIÓN DEL DNA MODIFICADO CON BISULFITO (BISULFITE SEQUENCING).....	55
11-ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA METILACIÓN.....	57
11.1-FUNDAMENTOS DEL MÉTODO MassARRAY EpiTYPER.....	57
11.2-ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	58
11.3-MassARRAY EpiTYPER.....	59
12-ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	61
12.1-PLÁSMIDOS.....	61
12.2-CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS.....	61
12.3-TRANSFECCIÓN.....	64
12.4-ENSAYO DUAL DE LUCIFERASA.....	65
13-ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	65
IV-RESULTADOS.....	67
<u>A-ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS GENES <i>WDR3</i> Y <i>TBX15</i> CON EL CÁNCER DE TIROIDES.....</u>	69
<u>B-ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE LOS GENES <i>WDR3</i> Y <i>TBX15</i>.....</u>	72
1-EXPRESIÓN DE <i>WDR3</i>.....	72
1.1-EXPRESIÓN DE <i>WDR3</i> EN CÉLULAS DE TIROIDES.....	73

1.2-EXPRESIÓN DE <i>WDR3</i> EN TEJIDOS DE TIROIDES.....	76
1.3-EXPRESIÓN DE <i>WDR3</i> EN TEJIDOS DE COLON.....	78
2-REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>WDR3</i>.....	81
2.1-METILACIÓN DEL PROMOTOR DE <i>WDR3</i>	82
2.1.1-Metilación del promotor de <i>WDR3</i> en líneas celulares.....	82
2.1.2-Cuantificación de la metilación del promotor de <i>WDR3</i> en tejidos de tiroides.....	84
2.2-ANÁLISIS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE UNIÓN AL PROMOTOR DE <i>WDR3</i>	91
2.2.1-Elección de los factores de transcripción a estudiar. Bases de datos	91
2.2.2-Presencia de las proteínas CTCF y c-Myc en líneas celulares de tiroides.....	93
2.2.3-Construcciones plasmídicas.....	95
2.2.4-Análisis de la actividad promotora de la región 5' de <i>WDR3</i>	96
2.2.5-Efecto de c-Myc y CTCF en el promotor de <i>WDR3</i>	98
3- EXPRESIÓN DE <i>TBX15</i>.....	103
3.1-EXPRESIÓN DE <i>TBX15</i> EN CÉLULAS DE TIROIDES.....	103
3.2-EXPRESIÓN DE <i>TBX15</i> EN TEJIDOS DE TIROIDES.....	107
4- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>TBX15</i>.....	109
4.1- METILACIÓN DEL PROMOTOR DE <i>TBX15</i>	109
4.1.1-Metilación del promotor distal de <i>TBX15</i> en líneas celulares.....	109
4.1.2-Cuantificación de la metilación del promotor distal de <i>TBX15</i> en tejidos de tiroides.....	112
4.1.3-Cuantificación de la metilación del promotor distal de <i>TBX15</i> en tumores cerebrales.....	123
V-DISCUSIÓN.....	127
VI-CONCLUSIONES.....	137
VII-BIBLIOGRAFÍA.....	141

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones biológicas de las proteínas con repeticiones WD.....	11
Tabla 2. Genes humanos de la familia T-box.....	16
Tabla 3. Vías de señalización interrumpidas por la hipermetilación en las islas CpG de genes supresores de tumores.....	26
Tabla 4. Alteraciones genéticas en los carcinomas de tiroides derivados de células foliculares.....	38
Tabla 5. Secuencias de los cebadores para el análisis de la expresión de los genes <i>WDR3</i> y <i>TBX15</i> por qPCR.....	54
Tabla 6. Cebadores para el análisis de la metilación de las regiones promotoras de los genes <i>WDR3</i> y <i>TBX15</i> por <i>bisulfite sequencing</i>	56
Tabla 7. Cebadores para el análisis cuantitativo de la metilación de las regiones promotoras de los genes <i>WDR3</i> y <i>TBX15</i> por MassARRAY EpiTYPER.....	59
Tabla 8. Cebadores para amplificar los fragmentos del promotor de <i>WDR3</i> que serán clonados en el vector pGL4.....	62
Tabla 9. Características generales de la población estudiada.....	70
Tabla 10. Frecuencias alélicas y distribución de genotipos de los SNPs seleccionados de <i>TBX15</i> y su asociación con el cáncer de tiroides.....	71
Tabla 11. Análisis de los haplotipos del gen <i>TBX15</i> y su asociación con el cáncer de tiroides..	71
Tabla 12. Cuantificación de la expresión de <i>WDR3</i> a nivel de mRNA por PCR a tiempo real en líneas celulares de tiroides.....	73
Tabla 13. Expresión de <i>WDR3</i> a nivel de mRNA en tejidos normal y tumoral de tiroides.....	77
Tabla 14. Fragmentos de DNA de la región promotora del gen <i>WDR3</i> amplificados por PCR para el análisis de la metilación por <i>bisulfite sequencing</i>	83
Tabla 15. Cuantificación de la expresión de <i>TBX15</i> a nivel de mRNA por PCR a tiempo real en líneas celulares de tiroides.....	104
Tabla 16. Expresión de <i>TBX15</i> a nivel de mRNA en tejidos normal y tumoral de tiroides....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad de los cánceres más frecuentes a nivel mundial según el género.....	4
Figura 2. Esquema de la región cromosómica 1p12 en humanos y los genes identificados en esta región.....	7
Figura 3. Esquema de la ubicación de los SNPs rs 4658973 y rs2145418 en la región cromosómica 1p12.....	8
Figura 4. Esquema del gen <i>WDR3</i>	9
Figura 5. Esquema del gen <i>TBX15</i>	9
Figura 6. Estructura tridimensional de una proteína de la familia WD con 7 repeticiones del motivo WD.....	10
Figura 7. Estructura tridimensional de un homodímero de la familia T-box.....	15
Figura 8. Metilación del DNA en el carbono 5 de la citosina.....	22
Figura 9. Metilación de secuencias repetitivas en el genoma.....	24
Figura 10. Metilación de islas CpG en los promotores de los genes.....	25
Figura 11. Modificaciones post-traduccionales de las histonas.....	27
Figura 12. Posicionamiento de los nucleosomas en el TSS inhibe la transcripción génica.....	29
Figura 13. Glándula tiroides.....	33
Figura 14. Síntesis de hormonas tiroideas.....	34
Figura 15. Tipos de cáncer de tiroides. Frecuencia de los diferentes tipos de carcinoma de tiroides.....	35
Figura 16. Análisis de la metilación por escisión específica de bases y espectrometría de masas.....	58
Figura 17. Genoma del plásmido pGL4.26.....	62
Figura 18. Expresión relativa de <i>WDR3</i> analizada por qPCR en líneas celulares de cáncer de tiroides.....	74
Figura 19. <i>Western blot</i> de la proteína <i>WDR3</i> en líneas celulares de cáncer de tiroides.....	75
Figura 20. Cuantificación de la proteína <i>WDR3</i> en líneas celulares de cáncer de tiroides relativa a las células normales S11N.....	76
Figura 21. Expresión relativa de <i>WDR3</i> analizada por qPCR en las parejas de tejido normal/tumor de tiroides.....	78
Figura 22. Expresión de <i>WDR3</i> en tejidos de colon utilizando <i>Affymetrix Human Genome U219 Array Plate</i>	79

Figura 23. Niveles de expresión de <i>WDR3</i> en muestras de tejidos de colon analizados por qPCR.....	80
Figura 24. Isla CpG del promotor de <i>WDR3</i>	82
Figura 25. Metilación del promotor de <i>WDR3</i> en células humanas.....	83
Figura 26. Localización de las regiones en el promotor del gen <i>WDR3</i> definidas por el análisis <i>in silico</i> para ser estudiadas por MassARRAY EpiTYPER.....	85
Figura 27. Análisis <i>in silico</i> de las regiones <i>WDR3</i> -1 y <i>WDR3</i> -2.....	86
Figura 28. Análisis jerárquico de grupos y <i>heatmap</i> del promotor del gen <i>WDR3</i>	87
Figura 29. Variación interindividual de la metilación del promotor de <i>WDR3</i>	88
Figura 30. Niveles de metilación del promotor de <i>WDR3</i> en tejido de tiroides.....	89
Figura 31. Valores de metilación de las unidades CpG del promotor del gen <i>WDR3</i>	90
Figura 32. Factores de transcripción identificados por <i>ChIP-seq</i> en el promotor del gen <i>WDR3</i>	92
Figura 33. Región reguladora identificada en el promotor de <i>WDR3</i>	93
Figura 34. <i>Western blot</i> de las proteínas CTCF y c-Myc en líneas celulares de tiroides.....	94
Figura 35. Comparación de la expresión de <i>WDR3</i> a nivel de mRNA con la cuantificación de la señal de <i>western blot</i> de las proteínas CTCF y c-Myc en líneas celulares de tiroides.....	95
Figura 36. Esquema a escala de los fragmentos del promotor de <i>WDR3</i> en cada clon pGL4...	96
Figura 37. Actividad del promotor de <i>WDR3</i>	97
Figura 38. Actividad del promotor de <i>WDR3</i> en las co-transfecciones con los vectores de expresión de c-Myc y CTCF.....	99
Figura 39. Actividad del promotor de <i>WDR3</i> en las líneas celulares TPC-1 y HCT116.....	100
Figura 40. Análisis comparativo de la actividad del promotor de <i>WDR3</i> utilizando una serie de deleciones 5' y 3' del promotor de <i>WDR3</i> . Co-transfecciones con c-Myc.....	100
Figura 41. Análisis comparativo de la actividad del promotor de <i>WDR3</i> utilizando una serie de deleciones 5' y 3' del promotor de <i>WDR3</i> . Co-transfecciones con CTCF.....	101
Figura 42. Expresión relativa de <i>TBX15</i> analizada por qPCR en líneas celulares de cáncer de tiroides.....	105
Figura 43. <i>Western blot</i> de la proteína <i>TBX15</i> en líneas celulares de cáncer de tiroides.....	106
Figura 44. Cuantificación de la proteína <i>TBX15</i> en líneas celulares de cáncer de tiroides relativa a las células normales S11N.....	106
Figura 45. Ubicación de las islas CpG en la región 5' del gen <i>TBX15</i>	109
Figura 46. Isla CpG del promotor distal del gen <i>TBX15</i>	110

Figura 47. Metilación del promotor distal de <i>TBX15</i> en células humanas.....	111
Figura 48. Localización de la región TBX15-1 en el promotor distal de <i>TBX15</i> definida por el análisis <i>in silico</i> para ser estudiada por MassARRAY EpiTYPER.....	112
Figura 49. Análisis <i>in silico</i> de la región TBX15-1.....	113
Figura 50. Análisis jerárquico de grupos y <i>heatmap</i> del promotor del gen <i>TBX15</i> en muestras de tejido de tiroides.....	114
Figura 51. Variación interindividual de la metilación del promotor distal del gen <i>TBX15</i>	116
Figura 52. Niveles de metilación del promotor distal de <i>TBX15</i> en tejidos de tiroides.....	116
Figura 53. Valores de metilación de las unidades CpG del promotor de <i>TBX15</i>	117
Figura 54. Valores de metilación de las unidades CpG del promotor de <i>TBX15</i> en las parejas de tejido normal/tumor.....	118
Figura 55. Metilación del promotor de <i>TBX15</i> en pacientes con carcinoma papilar de tiroides.....	119
Figura 56. Metilación del promotor de <i>TBX15</i> en pacientes con carcinoma folicular de tiroides.....	120
Figura 57. Metilación del promotor de <i>TBX15</i> en 1 paciente con carcinoma anaplásico de tiroides.....	121
Figura 58. Metilación del promotor de <i>TBX15</i> en pacientes con adenoma folicular de tiroides.....	122
Figura 59. Metilación del promotor de <i>TBX15</i> en pacientes con carcinoma medular de tiroides.....	122
Figura 60. Análisis jerárquico de grupos y <i>heatmap</i> del promotor del gen <i>TBX15</i> en muestras de tejido cerebral.....	124
Figura 61. Metilación de los tejidos cerebrales en el promotor de <i>TBX15</i>	125
Figura 62. Valores de metilación de las unidades CpG del promotor distal de <i>TBX15</i> en tejidos cerebrales.....	126

I- INTRODUCCIÓN

1-GENÉTICA DEL CÁNCER

El cáncer es un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división celular. Estas células se dividen rápida y continuamente formando tumores, y pueden invadir los tejidos adyacentes del cuerpo o propagarse por metástasis a otros órganos, donde se establecen y desarrollan en nuevos tumores.

Actualmente es una de las principales causas de muerte a escala mundial, con una mortalidad anual de 7,6 millones de personas (aproximadamente el 13% del total de defunciones) y se prevé que este número siga aumentando en todo el mundo y supere los 13,1 millones en 2030. El 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol (Ferlay *et al.*, 2010).

Se estima que anualmente se diagnostican más de 12 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo y que en el año 2013 habrá casi 30 millones de personas mayores de 15 años afectadas por esta enfermedad (Ferlay *et al.*, 2010). En la **Figura 1** se muestran la incidencia y mortalidad por género de los 20 tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial, de acuerdo a los datos más recientes publicados por la Organización Mundial de la Salud.

Existen más de 100 tipos diferentes de cáncer, los cuales pueden clasificarse de acuerdo al tipo celular y tejido en el cual se originó el tumor. Esta clasificación comprende los siguientes tipos: carcinomas: son los cánceres derivados de células epiteliales, la mayoría de los cánceres más comunes; sarcomas: cánceres que se originan en los huesos, cartílagos, grasa, músculos, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén; leucemia: cáncer que comienza en la médula ósea y provoca un aumento incontrolado de células sanguíneas; mieloma y linfoma: cánceres que se originan en las células del sistema inmune; y cánceres del sistema nervioso central: cánceres que empiezan en los tejidos del cerebro y de la médula espinal.

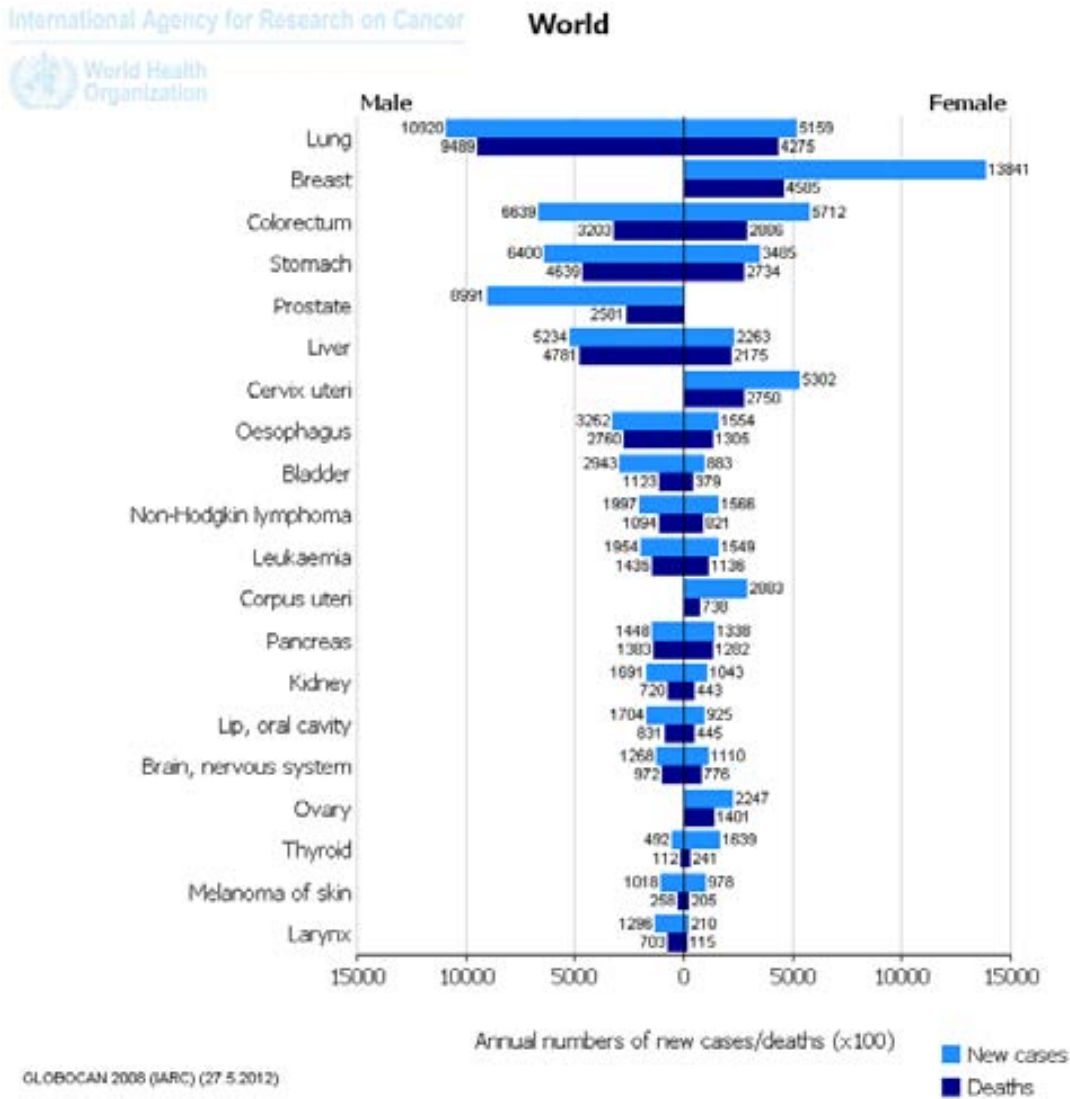


Figura 1. Incidencia y mortalidad de los cánceres más frecuentes a nivel mundial según el género (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, Organización Mundial de la Salud, <http://globocan.iarc.fr/>).

La transformación de una célula normal en tumoral es, generalmente, un proceso de varias etapas causado por mutaciones en varios genes. Con frecuencia estas mutaciones son de origen somático pero si una de estas mutaciones se hereda son necesarias menos mutaciones somáticas para que se desarrolle el tumor y la persona afectada puede tener entonces una predisposición a padecer cáncer.

Las mutaciones causantes del cáncer son el resultado de la interacción de factores genéticos del paciente y agentes mutagénicos externos como: los carcinógenos físicos (radiaciones ultravioleta e ionizantes); múltiples carcinógenos químicos (asbestos, componentes del humo de tabaco, aflatoxinas, arsénico) y carcinógenos biológicos

(virus, bacterias o parásitos). La mayoría de estos factores externos asociados con el cáncer causan mutaciones somáticas que estimulan la división celular o afectan de alguna manera la progresión del cáncer.

Así, el cáncer es fundamentalmente una enfermedad genética, pero mayormente no hereditaria. Las mutaciones de determinados genes que regulan la división y el crecimiento celular provocan el desarrollo de esta enfermedad. Estos genes pueden ser de dos tipos:

oncogenes: son genes mutados que promueven la división celular. Las mutaciones en estos genes provocan hiperactivación o su activación en un momento inadecuado. La función normal de estos genes, llamados protooncogenes, es la regulación del crecimiento celular. En general, las mutaciones en los protooncogenes son dominantes, ya que suele ser suficiente una mutación en una sola copia del gen para producir su efecto.

genes supresores de tumores: son los encargados de detener la división celular y de provocar la apoptosis. La inactivación de estos genes provoca que las células se dividan sin control. Los genes supresores de tumores mutados son recesivos porque ambos alelos deben estar mutados para que la inhibición de la división celular sea afectada.

Además de las mutaciones en protooncogenes y genes supresores de tumores, una mutación adquirida o heredada en los **genes de reparación del DNA** conlleva al acúmulo de mutaciones en el genoma a medida que se producen las divisiones celulares. Dependiendo del grado en que estas mutaciones afecten a oncogenes y genes supresores de tumores, aumentará la probabilidad de padecer neoplasias malignas.

Asimismo, la mayoría de los tumores contiene células con **aberraciones cromosómicas**. Algunos tipos de tumores se asocian con mutaciones cromosómicas específicas, sugiriendo que estas aberraciones podrían causar el cáncer. A pesar de esto, la mayoría de los tipos de cáncer no se asocian con tipos específicos de anomalías cromosómicas, siendo las mutaciones puntuales en protooncogenes y genes supresores de tumores los responsables de estos tipos de cáncer. Sin embargo, la inestabilidad de los cromosomas es una característica general de las células cancerosas, lo cual hace que se acumulen aberraciones cromosómicas que, a su vez, pueden afectar a genes

INTRODUCCIÓN

individuales contribuyendo al desarrollo del cáncer. Así, las mutaciones de los cromosomas parecen ser tanto una causa como un efecto del desarrollo tumoral.

Las aberraciones cromosómicas asociadas con determinados tipos de cáncer incluyen deleciones, inversiones y translocaciones. Las deleciones pueden producir cáncer debido a la eliminación o inactivación de genes supresores de tumores; las inversiones y translocaciones pueden inactivar genes supresores de tumores, fusionar genes produciendo proteínas que estimulan la división celular, o transferir genes a una nueva ubicación donde quedan bajo la influencia de diferentes secuencias reguladoras que alteran su expresión.

2-REGIÓN CROMOSÓMICA 1p12 Y CÁNCER

El cromosoma 1 es el más grande de los cromosomas humanos y contiene aproximadamente el 8% de toda la información genética humana. Más de 350 enfermedades humanas están asociadas con alteraciones en la secuencia de este cromosoma, incluyendo cánceres, trastornos neurológicos y del desarrollo y enfermedades hereditarias, para las cuales muchos de los correspondientes genes son desconocidos. Alteraciones del cromosoma 1, en particular deleciones en 1p o inserciones en 1q son algunas de las aberraciones cromosómicas más comunes en el cáncer humano (Gregory *et al.*, 2006).

La región 1p12 corresponde a una banda cromosómica de 2800 Kb cercana al centrómero, ubicada entre las posiciones 117 800 001 – 120 600 000 del cromosoma 1 humano (BAC Resource Consortium *et al.*, 2001). En esta región se han identificado 22 genes (**Figura 2**).

Diversas alteraciones en la región cromosómica 1p12 han sido asociadas con varios tipos de cáncer. Se han descrito diferentes aberraciones cromosómicas que incluyen esta región en carcinomas de mama, colon y pulmón (Mertens *et al.*, 1997), tumores cerebrales (Steilen-Gimbel *et al.*, 1999), melanomas malignos (Zhang *et al.*, 1999),

tumor de Wilms (Tamimi *et al.*, 2007), tumores gastrointestinales (Chen *et al.*, 2009) y mieloma múltiple (Walker *et al.*, 2010).

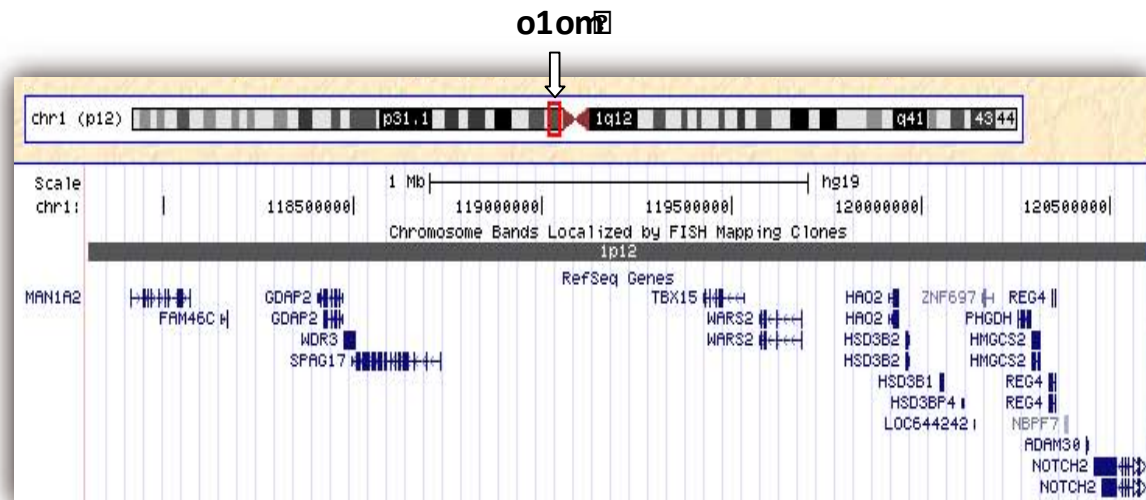


Figura 2. Esquema de la región cromosómica 1p12 en humanos y los genes identificados en esta región (<http://genome.ucsc.edu>).

Estudios de asociación llevados a cabo en nuestro laboratorio con el microsatélite BAT-40, sugieren que la región cromosómica 1p12-13 podría contener uno a más genes relacionados con la susceptibilidad al cáncer de tiroides (Baida *et al.*, 2005). Posteriormente, utilizando seis marcadores polimórficos de esta región, se identificaron dos marcadores de susceptibilidad al cáncer de tiroides situados en la región 1p12: los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) rs4658973 y rs2145418 (Baida *et al.*, 2008).

El SNP rs4658973 se encuentra en una región donde se encuentran dos genes solapados 3'-3', en concreto se sitúa en el intrón 48 del gen *SPAG17* que, a su vez, corresponde al intrón 24 del gen *WDR3* (**Figura 3**). La función del gen *SPAG17* (antígeno asociado a espermatozoides 17) está relacionada con el movimiento de los espermatozoides, mientras que el gen *WDR3* pertenece a la familia de genes con repeticiones WD, involucrada en procesos celulares como la síntesis y procesamiento del RNA, el control del ciclo celular y la apoptosis (Li y Roberts, 2001). Recientemente se ha descrito el papel de *WDR3* en la biogénesis del ribosoma, sugiriendo su implicación en cáncer (McMahon *et al.*, 2010).

INTRODUCCIÓN

El SNP rs2145418 se encuentra en una región vacía de genes, ubicado a 462 Kb del gen *WDR3* y a 460 Kb del gen *TBX15* (**Figura 3**). El gen *TBX15* pertenece a la familia de genes T-box que codifican para distintos factores de transcripción involucrados en procesos del desarrollo y en la tumorigénesis (Wilson y Conlon, 2002).

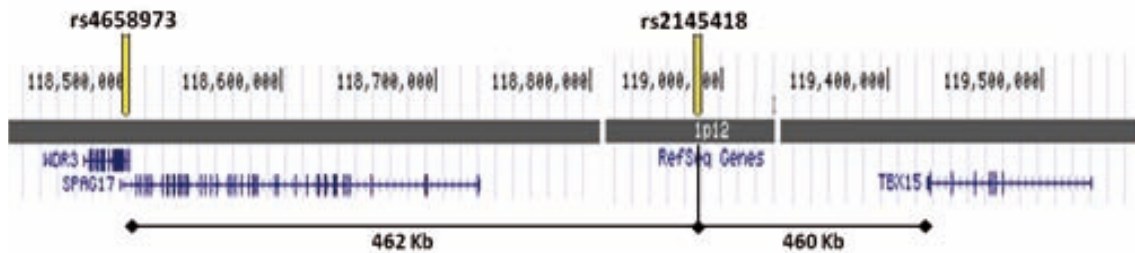


Figura 3. Esquema de la ubicación de los SNPs rs 4658973 y rs2145418 en la región cromosómica 1p12. Se muestran también las distancias relativas de estos dos SNPs con los genes *WDR3*, *SPAG17* y *TBX15* (modificado de <http://genome.ucsc.edu>).

A pesar de que se conoce muy poco acerca de la función de los genes *WDR3* y *TBX15*, las funciones asociadas a las familias génicas a las que pertenecen sugieren una implicación de estos genes en procesos celulares relacionados con el desarrollo embrionario, la transducción de señales y la proliferación celular. Ésto nos permite suponer que dichos genes podrían estar relacionados con el cáncer, lo que será el punto de partida de este trabajo de tesis, como se expone en el apartado de objetivos.

3-LOS GENES *WDR3* Y *TBX15*

En la región cromosómica 1p12 en humanos se han identificado los genes *WDR3* (*WD repeat domain 3*) (Claudio *et al.*, 1999) y *TBX15* (*T-box 15*) (Agulnik *et al.*, 1998).

El gen *WDR3* se encuentra ubicado en las coordenadas genómicas chr1: 118 472 372 – 118 503 049 (*NCBI Reference Sequence*), tiene una longitud de 30 678 bp y consta de 27 exones (**Figura 4**). Han sido identificados cuatro mRNAs para el gen *WDR3* (Hubbard *et al.*, 2009); sin embargo, solamente uno de ellos codifica para una proteína nuclear de 943 aminoácidos (Q9UNX4) que contiene 13 repeticiones del motivo WD

(The UniProt Consortium, 2012), por lo que WDR3 forma parte de la familia de proteínas WD.



Figura 4. Esquema del gen *WDR3*. Se indican los 27 exones y en rojo la región traducida.

El gen *TBX15* se ubica en las coordenadas genómicas chr1: 119 425 666 - 119 532 179 (*NCBI Reference Sequence*). Tiene una longitud de 106 514 bp y presenta 8 exones (**Figura 5**). Se han identificado cinco transcritos para este gen (Hubbard *et al.*, 2009) y dos isoformas de la proteína TBX15 producidas por *splicing* alternativo, las cuales difieren en su extremo N-terminal. La isoforma 1 (Q96SF7-1) contiene 602 aminoácidos y la isoforma 2 (Q96SF7-2) 496 aminoácidos (The UniProt Consortium, 2012).

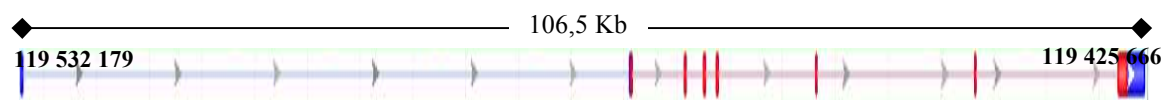


Figura 5. Esquema del gen *TBX15*. Se indican los 8 exones y en rojo la región traducida.

3.1-FAMILIA GÉNICA WDR

La familia de proteínas con motivos WD se define por la presencia de unidades repetidas de un dominio conservado de aproximadamente 40-60 aminoácidos que incluye el dipéptido triptófano-ácido aspártico (WD) en su extremo C-terminal. La mayoría de las proteínas contienen más de siete repeticiones de este dominio aunque la presencia de estas repeticiones es variable, por lo cual estas proteínas pueden presentar de 1 a 30 repeticiones WD. Hasta la fecha, se han registrado 278 proteínas humanas con el motivo WD en la base de datos UniProtKB (The UniProt Consortium, 2012), de las cuales más del 90% contienen al menos 4 repeticiones WD.

INTRODUCCIÓN

El motivo WD por sí mismo no posee ninguna actividad catalítica y no parece ser un dominio funcional. La conservación de esta secuencia, aparentemente, es debida a la formación de una estructura helicoidal que provee una extensiva exposición de tres superficies: arriba, abajo y en círculo (**Figura 6**), formando una plataforma estable para la interacción entre proteínas (Shen *et al.*, 2010; Cartier *et al.*, 2011; Cohen-Katsenelson *et al.*, 2011). Probablemente, las múltiples interacciones proteína-proteína que permite esta estructura helicoidal dan lugar a la diversidad funcional que caracteriza a las proteínas con repeticiones WD.

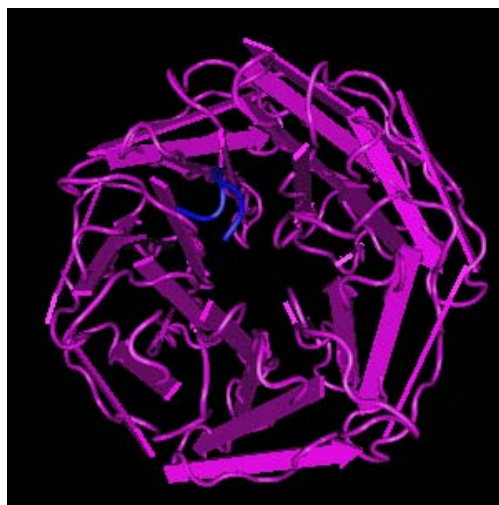


Figura 6. Estructura tridimensional de una proteína de la familia WD con 7 repeticiones del motivo WD (Migliori *et al.*, 2012).

En la **Tabla 1** se muestran distintas funciones celulares en las que intervienen las proteínas con dominios WD. La mayoría de estas proteínas son reguladoras de procesos como la transducción de señales, la síntesis y procesamiento del RNA, la compactación de la cromatina, el transporte de vesículas, el ensamblaje del citoesqueleto, el control del ciclo celular y la apoptosis (Li y Roberts, 2001).

La importancia de estas proteínas no sólo es debida a su papel crítico en muchas funciones biológicas esenciales, sino también a su asociación con varias enfermedades humanas.

Por ejemplo, mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *ERCC8* (*Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group*

Tabla 1. Funciones biológicas de las proteínas con repeticiones WD (Modificado de Li y Roberts, 2001).

Función	Ejemplos de proteínas con repeticiones WD
Transducción de señales	Proteína Gb, RACK1, STE4, LIS1, MSI1, PR55, PLAP, RbAp-48
Síntesis y procesamiento de RNA	Proteína de unión a TATA box (TBP), factores asociados a TATA box (TAFs), TUP1, factor estimulador de escisión del pre mRNA (CSTF1)
Ensamblaje de cromatina	Factor de ensamblaje-1 (CAF-1)
Transporte de vesículas	Promotor del recubrimiento del Golgi, proteínas COP
Ensamblaje de citoesqueleto	Proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), proteínas relacionadas a actina Arp2 y Arp3
Regulación del ciclo celular	Proteínas de control de la división celular (CDC4), CDC20, CDC40, p55 (CDC), proteína del punto de control del huso Mad2
Apoptosis	Factor activador de proteasa apoptótica (Apaf-1), proteínas de muerte celular
Función desconocida	WDR1, WDR4, WDR6, WDR10

8) causan el síndrome de Cockayne (OMIM 216400), una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por un desarrollo anormal y lento. *ERCC8* codifica una proteína con cinco repeticiones WD involucrada en la reparación del DNA por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción (Henning *et al.*, 1995).

Se ha demostrado también que una mutación o delección en el gen *PAFAH1B1* (*platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1*), es responsable de la lisencefalia (OMIM 607432), una malformación caracterizada por la ausencia de circunvoluciones en el cerebro. *PAFAH1B1* codifica la subunidad alfa no catalítica de la isoforma intracelular del factor activador de plaquetas, una proteína con siete repeticiones WD (Lo Nigro *et al.*, 1997).

También se han encontrado delecciones en el gen *TBLIX* en pacientes con albinismo ocular con pérdida neurosensorial auditiva (OMIM 300650) (Emes y Ponting, 2001); la proteína TBLX1 contiene ocho repeticiones WD. Por otra parte, mutaciones en el gen *AAAS*, causan el síndrome Triple A (OMIM 231550), una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente, caracterizada por insuficiencia adrenal, acalasia y alacrimia; este gen codifica una proteína con cuatro repeticiones WD (Handschug *et al.*, 2001). El gen *WDR62* (*WD repeat-containing protein 62*) es importante en el desarrollo de la corteza cerebral; se ha demostrado que mutaciones homocigotas o heterocigotas

INTRODUCCIÓN

compuestas en este gen causan microcefalia con o sin malformaciones corticales (OMIM 604317); la proteína WDR62 contiene 15 dominios WD (Nicholas *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010).

3.1.1-Proteínas WDR y cáncer

Diversos estudios han mostrado una expresión irregular de los genes que codifican proteínas de la familia WD en ciertos tipos de cáncer. La implicación de las proteínas con repeticiones WD en funciones tales como la división celular, el crecimiento celular y la apoptosis, evidencian su importante papel en la proliferación de las células. Sin embargo, el modo de acción de estas proteínas no siempre ha sido dilucidado.

Se ha indicado que PWP1, una proteína con cinco repeticiones WD, podría participar en el desarrollo del cáncer pancreático, ya que se han detectado niveles más altos de esta proteína en tejido de adenocarcinoma de páncreas en comparación con el tejido de páncreas normal. Estos niveles altos en adenocarcinoma de páncreas están relacionados con la sobre-expresión *PWPI* observada también en cáncer de páncreas (Honoré *et al.*, 2002).

En cáncer hepático se ha encontrado una sobre-expresión del gen *WDR16*. El incremento de la expresión de este gen promueve el crecimiento celular; además, la supresión de la expresión de *WDR16* está asociada con una disminución de la viabilidad celular, indicando su posible implicación en la proliferación del cáncer (Silva *et al.*, 2005). La proteína WDR16 contiene 11 repeticiones WD.

Por otra parte, se ha identificado una expresión elevada del gen *WDHD1* en cáncer de pulmón y carcinoma de células escamosas del esófago, comparada con el tejido normal adyacente de pulmón y esófago. En líneas celulares de cáncer de pulmón y esófago también se ha encontrado una sobre-expresión en la proteína WDHD1 y este incremento promueve el crecimiento celular. La supresión de *WDHD1* en células cancerosas retrasa la entrada y progresión en la fase S, lo que resulta en la muerte celular. Además se ha demostrado que la proteína WDHD1 es fosforilada y estabilizada por AKT1. Todos estos resultados indican que WDHD1 juega un papel significativo en el crecimiento y

supervivencia de las células de cáncer, como uno de los componentes de la vía de señalización PI3K/AKT (Sato *et al.*, 2009). La proteína WDHD1 contiene 7 repeticiones WD.

Otra de las proteínas WDR relacionada con cáncer es la proteína FBXW7 que contiene siete repeticiones WD. FBXW7 forma parte del complejo ubiquitina E3 ligasa y es la encargada del reconocimiento de varias oncoproteínas para su degradación en el proteosoma. Entre las proteínas reconocidas específicamente por FBXW7, se encuentran c-Myc, ciclina E, mTOR, Notch y c-Jun, entre otras. Todas ellas son proteínas oncogénicas que con frecuencia se encuentran sobre-expresadas en cánceres humanos y que juegan un papel esencial en las vías de señalización del crecimiento, división y diferenciación celular y apoptosis (Crusio *et al.*, 2010). Mutaciones en *FBXW7* se han encontrado en cáncer de ovario, cáncer de mama, adenoma de intestino, cáncer colorrectal, leucemia mieloide y linfomas (Akhoondi *et al.*, 2007).

3.1.2-La función de *WDR3*

Como se ha indicado anteriormente, la proteína WDR3 contiene 13 repeticiones WD. La función específica de la proteína WDR3 no ha sido totalmente esclarecida. Los estudios de asociación realizados en nuestro laboratorio utilizando varios SNPs en la región 1p12, sugieren que el gen *WDR3* podría ser un factor de riesgo al cáncer de tiroides; además, observamos que la expresión de este gen se encuentra alterada en líneas celulares de cáncer de tiroides (Akdi *et al.*, 2010).

Se ha descrito que la expresión de *WDR3* es inducida por el factor de transcripción c-Myc (Schlosser *et al.*, 2003) y también por el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) a través de la vía de señalización PI3K/mTOR (McMahon *et al.*, 2010).

Existen varias evidencias que indican la implicación de WDR3 en la biogénesis del ribosoma. Así, se ha identificado que la proteína WDR3 forma parte de un complejo ribonucleoproteico involucrado en el procesamiento del pre-rRNA de la subunidad pequeña del ribosoma (Turner *et al.*, 2009), aunque se desconoce cuál es su función en este complejo. Por otra parte, WDR3 es el homólogo funcional de la proteína DIP2 de

INTRODUCCIÓN

levadura, que forma parte del complejo ribonucleoproteico necesario para el procesamiento del pre-rRNA en la biogénesis del rRNA 18S (Dragon *et al.*, 2002). Más recientemente, McMahon *et al.* (2010) han demostrado también que la proteína WDR3 es necesaria para el procesamiento del rRNA 18S que forma parte de la subunidad pequeña 40 S del ribosoma. En este trabajo también se describe que WDR3 aumenta el crecimiento y la proliferación de células transformadas y que su supresión detiene el ciclo celular debido a la activación de p53.

Existen varias proteínas con repeticiones WD, incluyendo Bop1, WDR12 y WDR36, relacionadas con la síntesis de los ribosomas y la proliferación celular (Strezoska *et al.*, 2000, 2002; Hölzel *et al.*, 2005; Skarie y Link, 2008). Asimismo, alteraciones en los ribosomas se encuentran con frecuencia implicadas en los procesos cancerígenos (Ruggero y Pandolfi, 2003; Holland *et al.*, 2004). El mecanismo de acción de estas proteínas, incluyendo WDR3, no se conoce pero es lógico suponer que podrían actuar como soporte para otras proteínas a través de interacciones con sus múltiples dominios WD.

3.2-FAMILIA GÉNICA T-BOX

El gen *TBX15* forma parte de la familia de genes T-box, los cuales codifican una serie de factores de transcripción que regulan una gran variedad de procesos durante el desarrollo. Los miembros de esta familia están muy conservados y se expresan en el desarrollo de múltiples tipos de células en diversos organismos, como en moscas, gusanos, peces, ratones, perros y humanos (Wilson y Conlon, 2002). Por lo tanto, tienen una función crucial en la formación de tejidos y órganos, tanto en vertebrados como en invertebrados (Papaioannou, 2001).

La característica que define a esta familia de genes es una secuencia altamente conservada que codifica un dominio de unión al DNA de aproximadamente 200 aminoácidos, denominado T-box (**Figura 7**).

Está plenamente establecido que las proteínas T-box contienen, al menos, dos dominios estructurales y funcionales: un dominio de unión al DNA específico de secuencia (T-

box) y un dominio activador o represor transcripcional (Papaioannou, 2001). El dominio T-box se define como la región mínima de la proteína T-box necesaria y suficiente para su unión específica al DNA. Generalmente este dominio está codificado por al menos cinco exones dispersos sobre distancias relativamente grandes (Papaioannou, 2001; Wilson y Conlon, 2002). Las proteínas T-box actúan tanto de activadores como de represores de la transcripción y, en todos los casos estudiados, la actividad reguladora de la transcripción se localiza en el extremo C-terminal de la proteína (Wilson y Conlon, 2002).

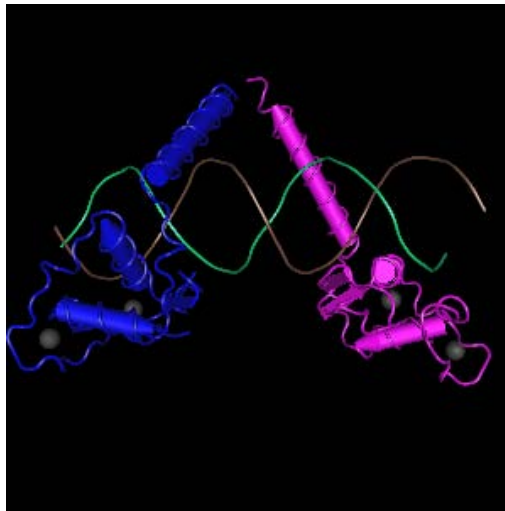


Figura 7. Estructura tridimensional de un homodímero de la familia T-box (Chen y Young, 2010).

En los genomas de mamíferos se conocen 18 miembros de la familia de genes T-box distribuidos en todo el genoma. En la **Tabla 2** se muestran la localización de estos genes en el genoma humano, lugar de expresión y el fenotipo de mutantes homocigotos. Mutaciones espontáneas e inducidas en los genes T-box han demostrado que, además de regular procesos del desarrollo, son los principales responsables de varios síndromes humanos (Naiche *et al.*, 2005).

Las enfermedades causadas por mutaciones en los genes T-box presentan graves anomalías del desarrollo (Packham y Brook, 2003). Entre ellas, los síndromes de DiGeorge (OMIM188400) y velocardiofacial (OMIM 192430) caracterizados por defectos cardíacos y faciales, hipoplasia del timo, paladar hendido e hipoparatiroidismo, son causados por microdeleciones en la banda cromosómica 22q11.2 que afectan al gen *TBX1* (Yagi *et al.*, 2003). El síndrome cubital-mamario (OMIM 181450), una

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Genes humanos de la familia T-box (Modificado de Naiche *et al.*, 2005 y de Wilson y Conlon, 2002).

Gen	Cromosoma humano	Expresión	Fenotipo de mutantes homocigotos en ratón
<i>T</i>	6	Línea primitiva, brote caudal y notocorda	Letal, defectos en el mesodermo posterior
<i>TBX1</i>	22	Corazón y arcos faríngeos	Letal, anormalidades cráneo facial, glandular, vascular y del corazón
<i>TBX2</i>	17	Extremidades y corazón	Letal, anormalidades en corazón y extremidades
<i>TBX3</i>	12	Extremidades y corazón	Letal, defectos en saco vitelino, extremidades y glándulas mamarias
<i>TBX4</i>	17	Alantoides y extremidades posteriores	Letal, defectos en el alantoides y extremidades posteriores
<i>TBX5</i>	12	Extremidades anteriores	Letal, graves malformaciones del corazón
<i>TBX6</i>	16	Línea primitiva y brote caudal	
<i>TBX10</i>	11		Labio leporino y paladar hendido
<i>Tbx13</i>	*		
<i>Tbx14</i>	*		
<i>TBX15</i>	1	Región cráneo facial y extremidades	Alteraciones viables cráneo faciales y en el patrón de pigmentación, malformaciones
<i>TBX18</i>	6	Corazón, somitas y extremidades	Letal, malformaciones de vértebras
<i>TBX19</i>	1	Glándula pituitaria	Deficiencia en ACTH, defectos de pigmentación
<i>TBX20</i>	7	Corazón, ojos, tubo neural y extremidades	Letal, anormalidades del corazón
<i>TBX21</i>	17	Células Th1, pulmón y bazo (adulto)	Hiperreactividad bronquial
<i>TBX22</i>	X	Feto	desconocido
<i>TBR1</i>	2	Corteza cerebral	Defectos corticales y del bulbo olfatorio
<i>EOMES</i>	3	Trofoblasto, línea primitiva temprana y corteza cerebral	Letal, defectos del mesodermo y trofoblasto

* Las secuencias de estos genes se han reportado en el genoma del ratón, pero no en el humano, los genes humanos son hipotéticos.

enfermedad que afecta el desarrollo de las extremidades, glándulas apócrinas, dientes y genitales, es causado por mutaciones en *TBX3* (Bamshad *et al.*, 1997). También se han identificado mutaciones en *TBX4* en familias con el síndrome de la rótula pequeña (OMIM 147891), caracterizado por anormalidades en las extremidades inferiores (Bongers *et al.*, 2004). Además, mutaciones en *TBX5* provocan el síndrome Holt-Oram (OMIM 142900), un trastorno que afecta el desarrollo del corazón y las extremidades superiores (Li *et al.*, 1997). Otras mutaciones en genes T-box asociadas a enfermedades

incluyen: mutaciones en *TBX15* en pacientes con complejas malformaciones esqueléticas y craneales que se corresponden con el síndrome de Cousin (OMIM 260660) (Lausch *et al.*, 2008); mutaciones en *TBX19* en pacientes con deficiencias en la hormona adrenocorticotropina (OMIM 201400) (Lamolet *et al.*, 2001); mutaciones en *TBX20* asociadas con defectos congénitos del corazón (OMIM 611363) (Kirk *et al.*, 2007) y mutaciones en *TBX22* como causantes del paladar hendido con anquiloglosia (OMIM 303400) (Braybrook *et al.*, 2001).

3.2.1-Proteínas T-box y cáncer

La mayor parte de la información disponible con respecto a los genes T-box procede, principalmente, de estudios de biología del desarrollo enfocados en los patrones de expresión espacial y temporal de estos genes durante el desarrollo y de sus funciones desde la especificación de las capas embrionarias hasta la determinación de las células durante la organogénesis. Este enfoque se debe a que mutaciones en varios de estos genes están asociadas con malformaciones del desarrollo. Sin embargo, en los últimos años, han surgido evidencias que indican una relación entre los genes T-box y la tumorigénesis, con efectos sobre la proliferación celular, invasión y metástasis.

El gen *T*, homólogo del gen *Brachyury* de ratón, muestra una expresión elevada en tumores de intestino delgado, estómago, riñón, vejiga, útero, ovario y testículo y en líneas celulares derivadas de carcinomas de pulmón, colon y próstata (Palena *et al.*, 2007). Además, la proteína T induce la transición epitelio-mesénquima en células tumorales, un paso importante en la progresión de los tumores primarios hacia la metástasis (Fernando *et al.*, 2010).

TBX1 es un potencial regulador negativo del desarrollo tumoral. *Tbx1* inhibe el crecimiento de células tumorales de la piel *in vitro* y reduce su tumorigenicidad, anulando su capacidad de crecer en ausencia de anclaje al sustrato. De la misma forma, *Tbx1* retrasa el crecimiento tumoral *in vivo* (Trempeus *et al.*, 2011).

El incremento de la expresión de los genes *TBX2* y *TBX3* se ha observado en varios tipos de cáncer. *TBX2* se sobre-expresa en cáncer de mama (Sinclair *et al.*, 2002),

INTRODUCCIÓN

melanoma (Vance *et al.*, 2005) y cáncer de páncreas (Duo *et al.*, 2009). Por otro lado, TBX3 está sobre-expresado en cáncer de mama (Yarosh *et al.*, 2008; Lomnytska *et al.*, 2006), cáncer de ovario (Lomnytska *et al.*, 2006), melanoma (Hoek *et al.*, 2004), en neoplasias endócrinas de páncreas con presencia de metástasis (Hansel *et al.*, 2004), en hepatoblastomas (Renard *et al.*, 2007) y en cáncer de cuello de útero con fenotipo metastásico (Lyng *et al.*, 2006). Se ha propuesto que ambos genes podrían contribuir a la tumorigénesis a través de la inhibición de la senescencia celular por supresión de p14^{ARF}, provocando la degradación de p53 vía MDM2 y resultando en una inmortalización de las células (Jacobs *et al.*, 2000; Brummelkamp *et al.*, 2002); o bien, por represión de la expresión de p21 (Prince *et al.*, 2004; Hoogaars *et al.*, 2008). Aunque TBX2 y TBX3 realizan la misma función en la supresión de la senescencia celular, se ha demostrado que presentan roles distintos en la oncogénesis. Mientras que TBX2 funciona como un potente factor que promueve la transformación y la proliferación celular, TBX3 contribuye a la formación del tumor y a la metástasis (Peres *et al.*, 2010), aumentando la invasividad mediante la represión del gen de la cadherina-E (Rodríguez *et al.*, 2008). En células de cáncer de mama TBX2 interacciona con EGR1 para reprimir genes supresores de tumores, llevando a la proliferación celular (Redmond *et al.*, 2010).

El gen *TBX5* es un gen supresor de tumores que en líneas celulares de cáncer de colon se inactiva por metilación del promotor. La inactivación por metilación también es frecuente en tejido de cáncer de colon primario. Además, la sobre-expresión de *TBX5* en líneas celulares induce la apoptosis e inhibe la proliferación celular y la metástasis (Yu *et al.*, 2010).

Recientemente, Kron *et al.* (2012) han demostrado que *TBX15* se encuentra diferencialmente metilado en cáncer de próstata. El análisis realizado demuestra que las muestras de cáncer presentan niveles de metilación significativamente más altos que las muestras benignas adyacentes al tumor y que el grado de metilación está fuertemente asociado con el estadio patológico de la enfermedad.

3.2.2-La función de *TBX15*

La función de *TBX15* en vertebrados ha sido asociada al desarrollo del esqueleto de las extremidades, columna vertebral y cabeza (Singh *et al.*, 2005). En humanos, deleciones en el gen *TBX15* están asociadas con complejas malformaciones craneofaciales y esqueléticas con hipoplasia escapular y pélvica, un patrón dismórfico que se corresponde con el síndrome de Cousin (OMIM 260660) (Lausch *et al.*, 2008). Los alelos mutantes identificados producen una proteína *TBX15* que tiene intacto el dominio T-box pero carece de un extremo C-terminal normal y, en su lugar, presenta un tramo de 78 aminoácidos sin sentido que incluye cinco cisteínas. Las proteínas alteradas mantienen su capacidad de unión al DNA pero muestran afectada su estabilidad. La ausencia de los aminoácidos en el extremo C-terminal no afecta la estabilidad, sin embargo, la presencia de los 78 aminoácidos sin sentido dirige a la proteína *TBX15* al proteosoma para su degradación, reduciendo drásticamente los niveles celulares de *TBX15* (Lausch *et al.*, 2008).

Además de su papel en procesos del desarrollo, *TBX15* está implicado en la acumulación y distribución del tejido graso corporal. Así, se ha descrito que *TBX15* se sobre-expresa en el tejido adiposo visceral y esta sobre-expresión está relacionada negativamente con el sobrepeso y la distribución de la grasa corporal, sugiriendo que la disminución de la expresión de *TBX15* podría estar relacionada con la patogénesis de la obesidad (Gesta *et al.*, 2006). También se ha observado que la alta expresión de *TBX15* reduce la diferenciación de los adipocitos e impide la acumulación de triglicéridos, aparentemente, debido a la reducción de mitocondrias que conlleva a una disminución de la capacidad respiratoria de los preadipocitos. Por el contrario, niveles bajos de expresión de *TBX15*, como ocurre en tejido adiposo visceral de personas obesas, permite la función mitocondrial normal resultando en una expansión del tejido adiposo y un aumento de la acumulación de grasa (Gesta *et al.*, 2011).

Como se ha indicado anteriormente, las proteínas T-box actúan como factores de transcripción. Así, *TBX15* es un inhibidor de la transcripción que actúa conjuntamente con co-represores de la familia Groucho. Se ha observado además que *TBX15* puede formar homodímeros y heterodímeros con *TBX18*, uniéndose secuencias repetidas directas o palindrómicas de la secuencia consenso 5'-AGGTGTGA-3' (Farin *et al.*, 2007).

INTRODUCCIÓN

Por otra parte, se ha demostrado que la actividad transcripcional de *TBX15* depende del grado de metilación de una isla CpG localizada en la región distal del promotor de *TBX15*. Esta isla CpG se encuentra diferencialmente metilada en placentas patológicas (Chelbi *et al.*, 2011). Asimismo, como se indica en el apartado 3.2.1, Kron *et al.* (2012) han descrito una metilación diferencial de *TBX15* en cáncer de próstata.

4- EPIGENÉTICA Y CÁNCER

En un principio, el **cáncer** se ha definido como un conjunto de enfermedades provocadas por alteraciones genéticas progresivas, que incluyen mutaciones en genes supresores de tumores y oncogenes, y aberraciones cromosómicas (Hanahan y Weinberg, 2000). Sin embargo, actualmente resulta evidente que el cáncer es, además, una enfermedad provocada por cambios epigenéticos que contribuyen junto con las alteraciones genéticas al desarrollo y progresión de esta enfermedad (Esteller *et al.*, 2001; Jones y Baylin, 2002).

Tanto las alteraciones genéticas como las epigenéticas afectan la actividad de los genes. Las alteraciones genéticas dejan huellas permanentes en el genoma que pueden afectar a la función de la proteína cuando están localizadas en la región codificante del gen, o afectar a la expresión del gen cuando ocurren en regiones reguladoras. Por el contrario, las alteraciones epigenéticas no alteran la secuencia del gen y son reversibles. En cáncer, los cambios epigenéticos más relevantes ocurren en las regiones reguladoras de genes implicados en la tumorigénesis alterando su expresión (Ballestar y Esteller, 2008). Estos cambios ocurren dentro de un amplio contexto de alteraciones de la cromatina en las células neoplásicas, en comparación con las células normales de las cuales derivan, y comprenden alteraciones en los patrones de metilación del DNA y modificación de histonas.

La **epigenética** se define como el estudio de los cambios heredables en la expresión génica que se producen independientemente de los cambios en la secuencia de DNA. La mayor parte de estos cambios se establece durante la diferenciación celular y permanecen a lo largo de varios ciclos de división celular, permitiendo a las células generar una gran variedad de fenotipos diferentes a partir del mismo genotipo. La

transmisión de los patrones de expresión génica, mediada por modificaciones epigenéticas, incluye la metilación de la base citosina en el DNA, modificaciones post-traduccionales de las histonas y cambios en el posicionamiento de los nucleosomas. Así, el conjunto de estas modificaciones provee un mecanismo para la diversidad celular, regulando la información genética a la cual puede acceder la maquinaria de la célula.

Se ha podido constatar el papel fundamental que juegan los cambios epigenéticos en la regulación de muchos procesos celulares que incluyen: la expresión de genes y de microRNAs (miRNAs), interacciones DNA-proteína, supresión de la movilidad de elementos transponibles, diferenciación celular, embriogénesis, inactivación del cromosoma X e impronta genómica (Portela y Esteller, 2010). Por lo tanto, las alteraciones en los procesos epigenéticos pueden afectar a la actividad celular y desencadenar enfermedades como el cáncer.

En las células cancerígenas se han detectado profundos cambios en la metilación del DNA y en los patrones de modificación de histonas, resultando en una desregulación generalizada de los perfiles de expresión génica. Esos cambios epigenéticos junto con las alteraciones genéticas, tienen un papel importante en la iniciación y progresión del cáncer (Esteller, 2007a).

4.1-METILACIÓN DEL DNA

La metilación del DNA es una modificación covalente que no altera la secuencia nucleotídica, pero puede tener una gran influencia sobre la regulación de la expresión génica. Una de las marcas epigenéticas más estudiadas en eucariotas es la metilación de la citosina, la cual actúa como una modificación estable que es heredada y que afecta a la actividad génica y la biología celular.

Esta modificación epigenética consiste en la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina al carbono 5 del anillo pirimidínico de la citosina, convirtiéndola en 5-metilcitosina (**Figura 8**). Esta reacción es catalizada por enzimas DNA-metiltransferasas, las cuales presentan dos tipos de actividad de metilación. La primera es la **metilación de mantenimiento**, encargada de mantener el patrón de metilación tras

INTRODUCCIÓN

la replicación del genoma, agregando grupos metilo a la cadena recién sintetizada de DNA en posiciones opuestas a los sitios metilados de la cadena progenitora, garantizando que el patrón de metilación se herede después de la división celular. La segunda actividad es la **metilación de *novo***, que añade grupos metilo en posiciones totalmente nuevas del DNA. La metilación de *novo* ocurre principalmente durante el desarrollo embrionario pero también se ha observado que se produce de manera aberrante en la tumorigénesis, generando cambios en los patrones de metilación en regiones localizadas del genoma que afectan a la expresión génica.

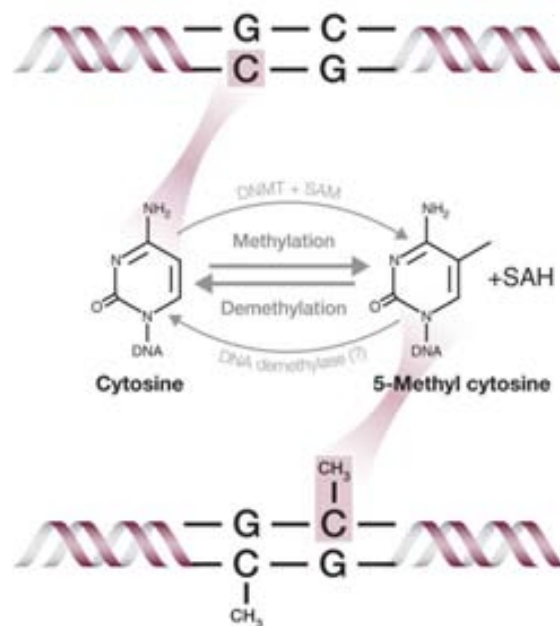


Figura 8. Metilación del DNA en el carbono 5 de la citosina formando 5-metilcitosina. Las DNA-metiltransferasas (DNMT) catalizan la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina (SAM), convirtiéndola en S-Adenosyl-L-homocysteine (SAH). Esta reacción es potencialmente reversible por la acción de DNA-desmetilasas (<http://www.caymanchem.com>).

Entre un 3 y 6% de todas las citosinas del DNA humano normal están metiladas (Esteller, 2005). Esta metilación del DNA ocurre casi exclusivamente en el dinucleótido CpG, el cual se distribuye de forma no uniforme en el genoma humano, sino que se encuentra en regiones llamadas islas CpG. Las **islas CpG** se definen como regiones de más de 200 bp con un contenido de G+C mayor o igual al 50% y un ratio de CpG observadas/esperadas $\geq 0,6$ (Gardiner-Garden y Frommer, 1987). Estas islas CpG se localizan principalmente en el extremo 5' de los genes, asociadas a aproximadamente el

60% de los promotores de genes humanos. La metilación de estas islas está asociada generalmente con el silenciamiento de los genes.

La inhibición de la expresión génica debida a metilación del DNA puede producirse por varios mecanismos. El DNA metilado puede promover la unión de proteínas con dominios de unión a metil-CpG y, a su vez, estas proteínas median la represión por su interacción con histonas desacetilasas (ver apartado 4.2). El DNA metilado también puede inhibir directamente la transcripción promoviendo e impidiendo el reclutamiento de proteínas de unión al DNA (Sharma *et al.*, 2010).

La metilación del DNA no solamente está relacionada con la regulación de la transcripción génica. Los elementos repetitivos que se encuentran dispersos en el genoma humano también se encuentran metilados en el dinucleótido CpG. La metilación del DNA en estas regiones del genoma permite silenciar el DNA no codificante y los elementos transponibles, siendo un mecanismo protector de la integridad cromosómica (Esteller, 2007a; Suzuki y Bird, 2008).

En las células normales, mientras que la mayor parte de los sitios CpG de su genoma están metilados, las islas CpG usualmente se encuentran no metiladas. Este estado de no-metilación se corresponde con la capacidad de los genes que contienen islas CpG de ser transcritos durante el desarrollo y la diferenciación de tejidos, aunque algunas de estas islas se metilan en tejidos específicos durante el desarrollo (Straussman *et al.*, 2009). En las células cancerígenas, el silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumores debido a la hipermetilación de las islas CpG en sus promotores es una característica frecuente del proceso tumorigénico (Herman y Baylin, 2003).

Como se ha mencionado anteriormente, los tumores humanos presentan cambios en los patrones de metilación. De forma general, estos tumores sufren una pérdida generalizada de la metilación del DNA pero, al mismo tiempo, adquieren patrones específicos de hipermetilación en las islas CpG de ciertos promotores (Jones y Baylin, 2002; Esteller, 2007a).

La **hipometilación** global del DNA contribuye a la tumorigénesis incrementando la inestabilidad genómica y activando proto-oncogenes. Ocurre en varias secuencias

INTRODUCCIÓN

genómicas, incluyendo elementos repetitivos, retrotransposones, promotores con pocos sitios CpG e intrones (**Figura 9**).

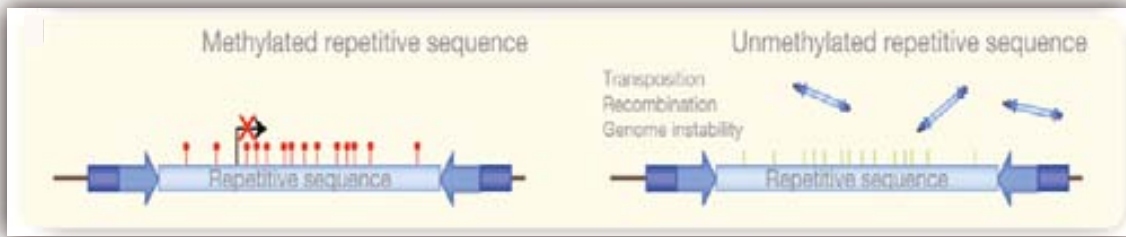


Figura 9. Las secuencias repetitivas del genoma se encuentran normalmente metiladas (izquierda). Estas secuencias se reactivan por hipometilación provocando inestabilidad cromosómica, translocaciones y disrupción de genes (derecha) (Portela y Esteller, 2010).

La hipometilación en secuencias repetitivas lleva a un incremento en la inestabilidad genómica, promoviendo los reordenamientos cromosómicos; además, cuando se produce en los retrotransposones, puede resultar en una reactivación y translocación de los mismos a otras regiones del genoma. Por ejemplo, las secuencias repetitivas LINE-1 se encuentran hipometiladas en cánceres de mama, pulmón e hígado, entre otros (Wilson *et al.*, 2007).

La hipometilación de promotores específicos puede activar la expresión de genes que promueven el crecimiento celular y también inducir la pérdida de la impronta genómica en algunos *loci*. Se ha observado hipometilación de los promotores de *R-Ras* y *MASPIN* en cáncer de estómago, *S100P* en cáncer de páncreas, *SNCG* en cánceres de mama y ovario y *MAGE* en melanomas, entre otros (Wilson *et al.*, 2007). Asimismo, la pérdida de la impronta genómica debida a la hipometilación de *IGF2* ha sido descrita en el tumor de Wilms y cánceres de mama, hígado, pulmón y colon (Rainier *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 2008). Todo ello indica que la hipometilación puede llevar a una expresión aberrante de oncogenes y regiones no codificantes a través de diversos mecanismos que contribuyen a la progresión y desarrollo del cáncer (Sharma *et al.*, 2010).

En contraste a la hipometilación generalizada, la **hipermetilación** del DNA es observada en islas CpG específicas, y contribuye a la tumorigénesis mediante el silenciamiento de genes supresores de tumores (**Figura 10**).



Figura 10. Las islas CpG en los promotores de los genes se encuentran normalmente no metiladas (izquierda), permitiendo la transcripción. La hipermetilación aberrante lleva al silenciamiento de los genes (derecha) (Portela y Esteller, 2010).

La inactivación de la transcripción causada por la hipermetilación del promotor ha sido observada en numerosos genes involucrados en procesos celulares cruciales para el desarrollo y progresión del cáncer, como son la reparación del DNA, el control del ciclo celular, la adhesión celular, la apoptosis y la angiogénesis. En cáncer, es frecuente la inactivación directa de genes supresores de tumores por hipermetilación del DNA, pero estos genes también pueden ser inactivados indirectamente por hipermetilación al afectar a la expresión de otros genes: el silenciamiento de factores de transcripción, inactivaría sus genes diana; y el silenciamiento de genes de reparación del DNA, permitiría el acúmulo de lesiones genéticas, llevando a la rápida progresión del cáncer (Esteller, 2007b; Sharma *et al.*, 2010). Además, los tumores humanos también se caracterizan por la inactivación global de miRNA causada por la hipermetilación de sus promotores y se ha observado que la inhibición de la expresión de miRNA, contribuye al desarrollo de la metástasis (Lujambio *et al.*, 2008). Algunos ejemplos de genes silenciados por hipermetilación en cáncer y las vías de señalización en las cuales están implicados se muestran en la **Tabla 3**.

Los perfiles de hipermetilación de las islas CpG son específicos del tipo de tumor (Esteller, 2007b) y se ha observado que estos perfiles se mantienen en líneas celulares humanas establecidas desde hace tiempo (Smiraglia *et al.*, 2001; Paz *et al.*, 2003). Sin embargo, todavía no se conoce por qué ciertas regiones se hipermetilan mientras otras permanecen no metiladas.

Tabla 3. Vías de señalización interrumpidas por la hipermetilación en las islas CpG de genes supresores de tumores (Esteller, 2007b).

Vía de señalización	Genes
Reparación del DNA	<i>MLH1, MGMT, WRN, BRCA1</i>
Respuesta a hormonas	Estrógeno, progesterona, andrógeno, prolactina y <i>TSHR</i>
Respuesta a vitaminas	<i>RARB2, CRBP1</i>
Señalización Ras	<i>RASSF1A, NORE1A</i>
Control del ciclo celular	<i>p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, RB</i>
Red de p53	<i>p14^{ARF}, TP73, HIC-1</i>
Adherencia e invasión celular	<i>Cadherinas E, H y FAT, EXT-1, SLIT2, EMP3</i>
Apoptosis	<i>TMS1, DAPK1, WIF-1, SFRP1</i>
Señalización Wnt	<i>APC, DKK-1, IGFBP-3</i>
Cascadas tirosina kinasa	<i>SOCS-1, SOCS-3 SYK</i>
Factores de transcripción	<i>GATA-4, GATA-5, ID4</i>
Genes homeobox	<i>PAX6, HOXA9</i>
Otras vías	<i>GSTP1, LKB1/STK11, THBS-14, COX-2, SRBC, RIZ1, TPEF/HPP1, SLC5A8, Lamin A/C</i>
MicroRNAs	<i>miR-127 (BCL6), miR-124a (CDK6)</i>

4.2-MODIFICACIONES DE HISTONAS

Los cambios observados en la metilación del DNA de las células cancerígenas están asociados con la presencia de un patrón aberrante de modificaciones de histonas. Las histonas son proteínas estructurales de la cromatina que tienen un papel fundamental en el empaquetamiento del DNA. Actualmente se conoce también la implicación de las histonas en la regulación génica.

Las modificaciones covalentes post-traduccionales de las histonas afectan a la expresión génica. Entre las modificaciones más importantes que sufren estas proteínas se incluyen la acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinización, entre otras (Bannister y Kouzarides, 2011) (**Figura 11**). Dichas modificaciones pueden afectar también a la reparación del DNA, replicación del DNA, *splicing* alternativo y a la condensación de los cromosomas (Kouzarides, 2007). Se ha propuesto que el conjunto de estas modificaciones se guarda como memoria epigenética dentro de la célula en forma de un

código de histonas que determina la estructura y actividad de las diferentes regiones del genoma (Jenuwein y Allis, 2001).

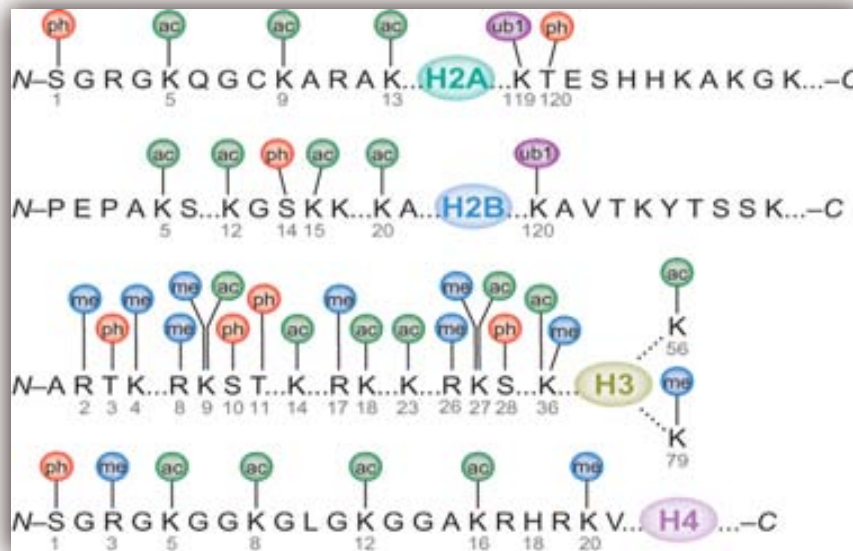


Figura 11. Todas las histonas pueden ser modificadas post-traduccionamente. En esta figura se indican las principales modificaciones: acetilación (ac), metilación (me), fosforilación (ph) y ubiquitinización (ub1). Los números indican la posición de cada aminoácido en la secuencia (Bhaumik *et al.*, 2007).

Las modificaciones de las histonas pueden ser activadoras o represoras dependiendo del residuo modificado y del tipo de modificación presente. Además, las histonas pueden ser modificadas en diferentes sitios simultáneamente (Wang *et al.*, 2008). Los distintos tipos celulares presentan patrones específicos de modificaciones de histonas y se ha propuesto que tienen un papel fundamental en la determinación de la identidad celular (Mikkelsen *et al.*, 2007). Estos patrones son regulados dinámicamente por enzimas que adicionan y remueven las modificaciones covalentes, constituyendo una red compleja de regulación de genes, esencial para los procesos fisiológicos de las células (Bernstein *et al.*, 2007).

Las enzimas modificadoras de histonas interactúan unas con otras, así como con la maquinaria de metilación del DNA, relacionando el estado de la cromatina con la transcripción. Estas interacciones aumentan la complejidad de la regulación epigenética de la expresión génica, determinando y manteniendo la identidad y función celular.

INTRODUCCIÓN

Las modificaciones de las histonas, junto con la metilación del DNA, tienen una función crucial en la organización de la arquitectura nuclear, la cual a su vez está involucrada en la regulación de la transcripción y otros procesos nucleares. Es evidente que las alteraciones globales de los patrones de modificación de histonas tienen el potencial de afectar la estructura y la integridad del genoma y alterar los patrones normales de expresión génica, los cuales, al igual que la metilación del DNA, serían factores causales en el cáncer (Esteller, 2007a).

La acetilación y desacetilación de histonas son procesos reversibles llevados a cabo por histonas acetiltransferasas (HAT) e histonas desacetilasas (HDAC). La alteración más destacada a nivel de las modificaciones de las histonas en las células de cáncer, es la desacetilación de la lisina 16 de la histona H4 (H4K16), la cual resulta en una represión génica (Fraga *et al.*, 2005). Además, se ha observado que los niveles de HAT y HDAC están alterados en varios tipos de cáncer (Bryan *et al.*, 2002; Halkidou *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). Otro cambio frecuente en las células de cáncer es la pérdida de grupos metilo en H3K4 y H4K20 o la metilación en H3K9 y H3K27, que se corresponde con la alteración de la expresión de histonas metiltransferasas e histonas desmetilasas (Chi *et al.*, 2010). La fosforilación de las histonas también parece ser relevante en el cáncer, al estar implicada en la respuesta a la reparación del daño en el DNA, la estabilidad cromosómica y la apoptosis (Portela y Esteller, 2010).

4.3-POSICIONAMIENTO DE NUCLEOSOMAS

Los nucleosomas regulan la expresión génica modulando el acceso de activadores y factores de transcripción a las secuencias reguladoras del DNA, al mismo tiempo que inhiben la elongación de los transcritos por las polimerasas (Jiang y Pugh, 2009).

A diferencia de las modificaciones químicas mencionadas en el apartado anterior, el posicionamiento o remodelación de los nucleosomas no implica alteraciones covalentes de las moléculas de histona.

El empaquetamiento del DNA en el nucleosoma parece afectar todas las etapas de la transcripción, regulando de esta manera la expresión génica. El posicionamiento exacto

de los nucleosomas alrededor del sitio de inicio de la transcripción (TSS, *Transcription Start Site*) influye en el comienzo de la transcripción (**Figura 12**). El silenciamiento de genes supresores de tumores en el cáncer, inducido por metilación del DNA, involucra distintos cambios en el posicionamiento de los nucleosomas resultando en una ocupación del TSS por el mismo nucleosoma. La reactivación de tales genes silenciados, utilizando inhibidores de DNA-metiltransferasas, es acompañada por una pérdida de los nucleosomas de la región promotora (Lin *et al.*, 2007).

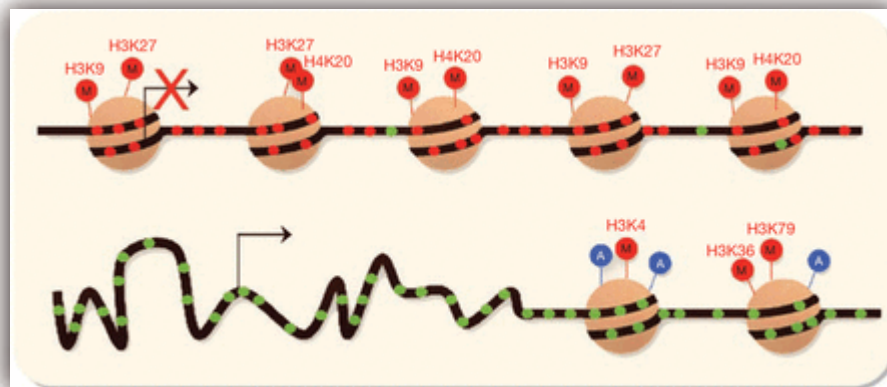


Figura 12. El posicionamiento de los nucleosomas en el TSS inhibe la transcripción génica (arriba). La pérdida de la ocupación en este sitio es necesaria para la activación de los genes (abajo). La flecha indica el TSS. (Portela y Esteller, 2010).

También los genes que codifican subunidades de los complejos remodeladores de la cromatina son diana de la hipermetilación en el cáncer inhibiendo de esta manera su expresión y alterando el proceso normal de remodelación de la cromatina.

De esta forma se considera que la interacción del posicionamiento de los nucleosomas con la metilación del DNA y la modificación de las histonas juegan un papel fundamental en el establecimiento de los patrones de expresión génica y la arquitectura de la cromatina.

4.4-APROXIMACIONES AL ESTUDIO EPIGENÉTICO DEL CÁNCER

Una gran variedad de metodologías han sido desarrolladas para evaluar los patrones de modificaciones epigenéticas en células normales y de cáncer. Estos métodos permiten

INTRODUCCIÓN

investigar tanto la metilación del DNA y modificaciones de histonas en genes específicos, como también los patrones globales de las modificaciones epigenéticas en todo el genoma.

4.4.1-Estudio de la metilación del DNA

Como se ha mencionado en el apartado 4.1, el estado de metilación del DNA en los sitios CpG puede afectar la estructura de la cromatina y la actividad transcripcional de los genes asociados. Además, se conoce que los cambios en la metilación del DNA están ligados a procesos normales del desarrollo y también a muchas enfermedades humanas incluyendo el cáncer (Reik *et al.*, 2001; Jones y Baylin, 2002). Para entender los mecanismos implicados en estos cambios en la metilación del DNA se han desarrollado diferentes métodos de análisis.

Los primeros estudios de la metilación del DNA en secuencias particulares se basaban en la utilización de enzimas de restricción que pueden distinguir los sitios de reconocimiento metilados de los no-metilados en los genes de interés. Esta técnica tiene el inconveniente de que las digestiones incompletas por las enzimas de restricción no permiten precisar el grado de metilación, además de que las regiones que pueden ser estudiadas son limitadas (Esteller, 2007a).

Por otra parte, la cantidad relativa de 5-metilcitosina en el DNA genómico puede ser analizada por hidrólisis química o enzimática, seguida del fraccionamiento y cuantificación de los productos de hidrólisis, utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o electroforesis capilar de alto rendimiento (HPCE). El inconveniente de estas técnicas es que requieren grandes cantidades de DNA (> 1 µg) y el acceso a sofisticados equipamientos (Fraga y Esteller, 2002).

Uno de los mayores avances en el estudio de la epigenética del cáncer fue el desarrollo de la secuenciación del DNA genómico tratado con bisulfito (***bisulfite sequencing***) (Frommer *et al.*, 1992; Clark *et al.*, 1994). Este método está basado en la capacidad que tiene el bisulfito sódico de desaminar los residuos citosina del DNA de cadena simple y convertirlos en uracilo, en condiciones donde la 5-metilcitosina no reacciona (Shapiro *et*

al., 1973; Wang *et al.*, 1980). La combinación del tratamiento con bisulfito y la secuenciación, determina el estado de metilación de cada citosina en el DNA genómico.

En general, la técnica *bisulfite sequencing* consiste en la desnaturalización del DNA seguida de la conversión con bisulfito sódico y la amplificación por PCR del fragmento de DNA a analizar. La posterior secuenciación de los productos de PCR dará información acerca del estado de metilación de las citosinas en el DNA de partida. Este método permite analizar los patrones de metilación de genes específicos utilizando cantidades de DNA genómico tan pequeñas como 200 pg y ha sido la técnica más utilizada para determinar y cuantificar el grado de metilación de una región del genoma a resolución de nucleótido. La principal desventaja de este método es el tiempo que conlleva realizarlo, ya que para obtener el perfil de metilación del DNA los productos de PCR deben ser clonados previamente a su secuenciación. Por lo tanto, dependiendo de la heterogeneidad de la metilación del DNA, deben secuenciarse un gran número de clones por cada amplicón de PCR (Coolen *et al.*, 2007).

Diferentes técnicas basadas en la conversión del DNA con bisulfito sódico han sido desarrolladas para analizar y/o cuantificar la metilación. La técnica más usada para investigar los perfiles de metilación de las islas CpG es la PCR específica de metilación (Herman *et al.*, 1996). En los alelos que presenten sitios CpG no metilados el tratamiento con bisulfito sódico hará que las cadenas de DNA dejen de ser complementarias, por lo tanto, el diseño de los cebadores es la parte más compleja y crítica de este procedimiento ya que debe ser dirigido a cada cadena. Este método es muy sensible, sin embargo, no permite cuantificar ni identificar la heterogeneidad celular referida a la metilación.

Otra de las técnicas que permiten el análisis cuantitativo de alta resolución de la metilación del DNA es MethyLight, que utiliza la tecnología de qPCR basada en fluorescencia y no requiere pasos posteriores a la amplificación (Eads *et al.*, 2000). Es un método altamente sensible pero tiene la desventaja de algunos falsos positivos y falsos negativos además de no poder realizar cuantificaciones absolutas. Asimismo, otro de los métodos basados en la PCR cuantitativa y que utiliza el tratamiento con bisulfito es la pirosecuenciación, un método de secuenciación del DNA en el cual la luz emitida, como resultado de una reacción enzimática cada vez que un nucleótido es incorporado a

INTRODUCCIÓN

la cadena de DNA, permite detectar las variaciones de secuencia debidas al tratamiento con bisulfito (Tost y Gut, 2007). Esta técnica tiene la capacidad de detectar cambios mínimos en la metilación del DNA.

Recientemente se ha desarrollado un nuevo método que permite el análisis de alta resolución de la metilación del DNA basado en el tratamiento con bisulfito sódico (Ehrich *et al.*, 2005). Este método combina la escisión de ácidos nucleicos específica de bases con el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight). El método se denomina **MassARRAY EpiTYPER** y es la tecnología utilizada en este trabajo de tesis para la cuantificación de la metilación del DNA (ver apartado 11 de Materiales y Métodos).

4.4.2-Estudio de modificaciones de histonas

El equivalente en el estudio de las modificaciones post-traduccionales de las histonas al tratamiento con bisulfito acoplado a la secuenciación de los estudios de metilación del DNA, es la espectrometría de masas, la cual es también la técnica más precisa para la identificación de estas modificaciones.

Diversas metodologías han sido aplicadas para la determinación del tipo y cantidad relativa de modificaciones de histonas que están presentes en un tipo particular de célula o tumor. Todas las histonas pueden ser aisladas por HPLC y las correspondientes fracciones eluidas analizadas por HPCE. Las modificaciones específicas de cada aminoácido pueden ser caracterizadas utilizando anticuerpos en *Western blots*, inmunotinciones o espectrometría de masas en tándem (Esteller, 2007a).

La relación de una secuencia particular del DNA con una modificación de histonas concreta se puede determinar mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando anticuerpos contra modificaciones específicas de histonas. El DNA inmunoprecipitado es analizado por PCR diseñando cebadores específicos para investigar la presencia de una secuencia de DNA candidata (Esteller, 2007a).

5-CÁNCER DE TIROIDES

El cáncer de tiroides es un proceso neoplásico de crecimiento localizado que afecta a la glándula tiroides (**Figura 13**). Representa la neoplasia endócrina maligna más frecuente, con una incidencia anual a nivel mundial del 1,7% (2,7% en mujeres y 0,7% en hombres) del total de cánceres diagnosticados. Se estima que la prevalencia para el año 2013 será 17,5 (27,1 en mujeres y 7,9 en hombres) cada 100 000 personas (Ferlay *et al.*, 2010).

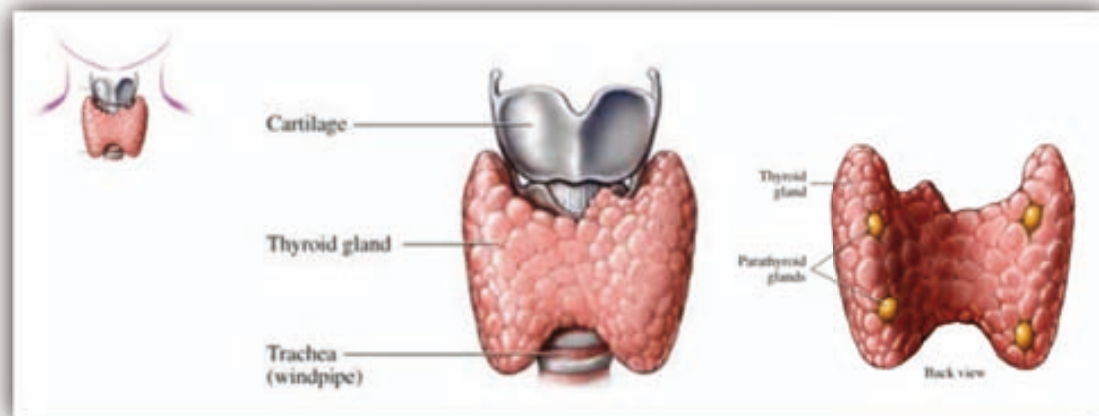


Figura 13. Glándula tiroides. Vista anterior (centro) y posterior (derecha) de la glándula tiroides, situada por debajo del cartilago tiroides (nuez de Adán) y sobre la tráquea. Está formada por dos lóbulos ubicados a ambos lados de la tráquea unidos por un istmo (modificado de <http://www.nucleusinc.com>).

La glándula tiroides es una glándula neuroendocrina que tiene un papel importante en la regulación del metabolismo y el balance de calcio en el cuerpo. Contiene dos tipos principales de células: las células foliculares y las células parafoliculares. Las células foliculares secretan hormonas que contienen iodo, llamadas triiodotironina (T3) y tiroxina (T4), las cuales controlan la frecuencia cardíaca, la temperatura corporal y la rapidez con la que los alimentos se transforman en energía, regulando el metabolismo de las personas. Desequilibrios en la concentración de estas hormonas en la sangre indican un mal funcionamiento de la glándula tiroides, por excesiva liberación de hormonas tiroideas (hipertiroidismo) o deficiencia (hipotiroidismo). La cantidad de hormona tiroidea segregada por la tiroides es regulada por la glándula pituitaria, en la base del cerebro, a través de la hormona estimulante de tiroides (TSH); esta glándula, a su vez, es controlada por el hipotálamo. Las células parafoliculares, también llamadas

INTRODUCCIÓN

células C, producen calcitonina, una hormona que trabaja junto con la hormona paratiroidea para regular los niveles de calcio en el cuerpo.

La principal función fisiológica de la glándula tiroides es la síntesis, almacenamiento y secreción de las hormonas tiroideas T3 y T4. Estos procesos involucran varias proteínas clave que son expresadas en las células foliculares de la glándula tiroides. El ingreso de yodo a las células foliculares desde la sangre, se produce a través del intercambiador sodio/yodo (NIS) en la membrana basal; luego es transportado a través de la membrana apical por la proteína SLC26A4, también llamada pendrina, hacia el lumen del foliculo. En el lumen el yodo es oxidado por TPO y unido covalentemente a los residuos tirosina de la tiroglobulina (TG). Nuevamente en la célula folicular las tirosinas iodadas son escindidas por proteólisis formando las hormonas T3 y T4, las cuales son liberadas al torrente sanguíneo (**Figura 14**). Todo este proceso es controlado por la vía de señalización del receptor de TSH (TSHR), que a su vez es regulado por mecanismos de retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

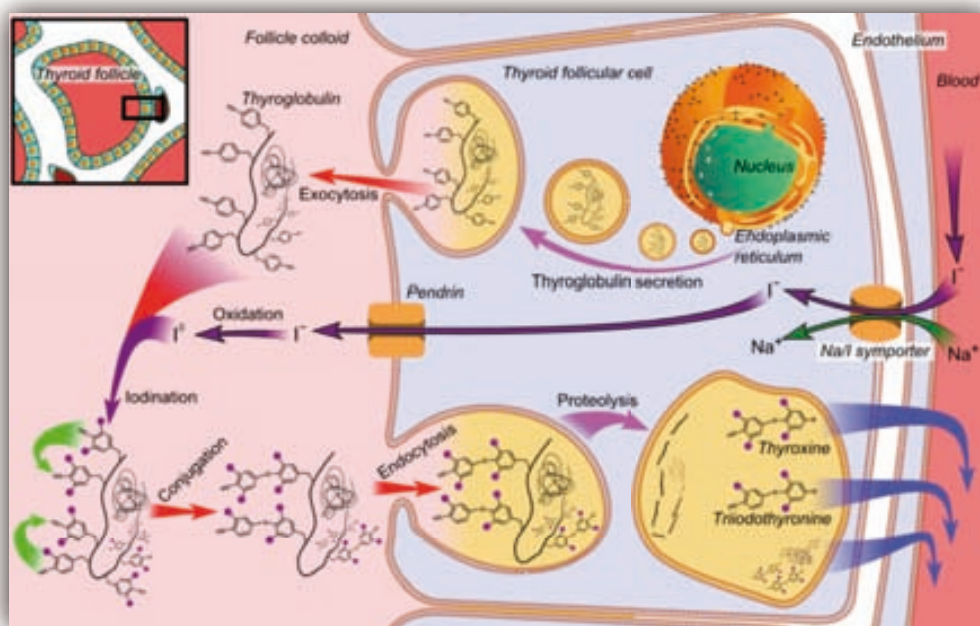


Figura 14. Síntesis de hormonas tiroideas. Esquema de la síntesis de las hormonas tiroideas vista en una célula folicular individual (Boron, 2003).

El crecimiento anormal de las células foliculares y parafoliculares dará lugar a diferentes tipos de nódulos tiroideos, los cuales presentan una prevalencia en la

población general de 4% a 7%. La mayoría de estos nódulos tiroideos son benignos, sin embargo, del 10% al 20% se desarrollará en un cáncer (Masuda *et al.*, 2011).

De acuerdo a su morfología y características clínicas y biológicas, el cáncer de tiroides se clasifica en cuatro tipos principales. Tres de ellos tienen su origen en las células foliculares: carcinoma papilar, carcinoma folicular y carcinoma anaplásico; el otro tipo de cáncer de tiroides se origina a partir de las células parafoliculares: carcinoma medular (Chan *et al.*, 2004). El carcinoma papilar de tiroides representa el 80% de los tumores malignos de tiroides; el carcinoma folicular es el segundo más frecuente, representando aproximadamente el 15% de los casos; el carcinoma anaplásico representa el 2% y es la forma más agresiva de cáncer de tiroides; el carcinoma medular de tiroides acontece en el 3% (**Figura 15**).

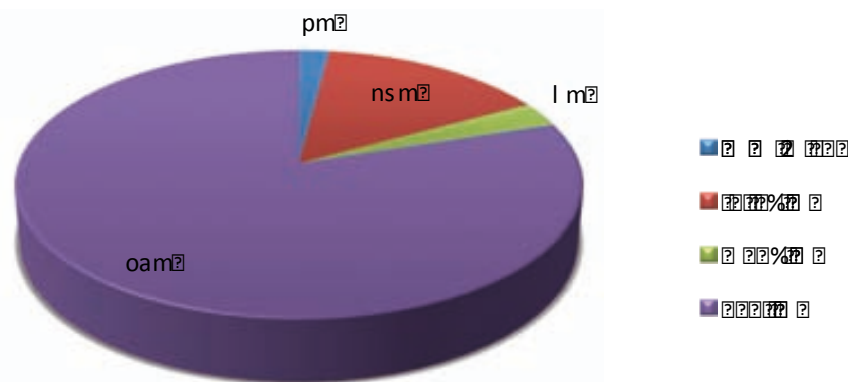


Figura 15. Tipos de cáncer de tiroides. Frecuencia de los diferentes tipos de carcinoma de tiroides (Adaptado de Giusti *et al.*, 2010).

El **carcinoma papilar de tiroides** (PTC) se caracteriza por una clara diferenciación de las células tumorales, las cuales muestran características distintivas tales como núcleos grandes, ovalados y de contornos irregulares. Es la forma más común de cáncer de tiroides y tiene un excelente pronóstico (> 90% de supervivencia), particularmente en pacientes menores a 45 años. La mayor parte de este tipo de tumores se manifiesta en adultos de 20 a 50 años, con una relación de géneros femenino:masculino de 3:1, sugiriendo la influencia de factores hormonales desconocidos. El único factor ambiental establecido relacionado con este tipo de cáncer de tiroides es la exposición a radiación ionizante y su incidencia es mayor en los países desarrollados. En algunos casos puede

INTRODUCCIÓN

extenderse e invadir los ganglios linfáticos locales, llegando a hacer metástasis en los tejidos blandos de pacientes con edad avanzada.

El **carcinoma folicular de tiroides** (FTC) es una neoplasia invasiva que carece de las características morfológicas nucleares del carcinoma papilar; además, es menos común y se produce en grupos de mayor edad. Su pronóstico es ligeramente peor ya que tiende a ser más agresivo. Los tumores foliculares se encuentran frecuentemente encapsulados, aunque tienden a producir metástasis en pulmones y huesos. También se diferencian del carcinoma papilar en que muestran una relación de géneros femenino:masculino más equilibrada (2:1). Este tipo de cáncer de tiroides se ha asociado con una deficiencia en la ingesta de yodo y es más frecuente en los países en desarrollo.

El **carcinoma anaplásico de tiroides** (ATC) es una neoplasia altamente maligna, compuesta por células indiferenciadas. Este tipo de cáncer ocurre principalmente en adultos mayores, solamente el 25% de los pacientes son menores de 60 años en el momento del diagnóstico. La distribución por géneros muestra una relación femenino:masculino de 1,5:1. Los pacientes presentan metástasis en pulmones, huesos y cerebro al momento del diagnóstico. Se trata de un cáncer altamente agresivo y letal, así, aunque representa menos del 2% de las neoplasias de tiroides diagnosticadas, más de la mitad de las muertes atribuidas al cáncer de tiroides resultan de este tipo de cáncer. La tasa de mortalidad es superior al 90%, con una esperanza de vida de 6 meses posteriores al diagnóstico. La mayor parte de los casos de carcinoma anaplásico muestran evidencias de un carcinoma diferenciado de tiroides previo.

El **carcinoma medular de tiroides** (MTC) se origina a partir de las células parafoliculares, involucradas en la secreción de calcitonina. Este tipo de cáncer tiene un mal pronóstico: la mitad de los pacientes desarrollan metástasis en los ganglios cervicales y del mediastino y un 20% muestran metástasis en pulmones, hígado y huesos al momento del diagnóstico.

Hasta ahora, el único factor ambiental de riesgo bien establecido para el desarrollo del cáncer de tiroides es la exposición a radiación ionizante. Como se ha mencionado anteriormente, es un factor de riesgo relacionado con un incremento de los carcinomas

papilares (Ron *et al.*, 1995). Este efecto se ha observado de forma más pronunciada en niños expuestos a la radiación después del accidente de Chernobyl (Leenhardt y Aurengo, 2000) y se espera un efecto similar en la población expuesta a la radiación provocada por el accidente de Fukushima (Niazi y Niazi, 2011). Otros factores propuestos relacionados con el cáncer de tiroides incluyen la ingesta de yodo (Knobel *et al.*, 2007), factores hormonales (Negri *et al.*, 1999) y el índice de masa corporal (Goodman *et al.*, 1992), pero el papel de estos factores todavía permanece incierto.

5.1-GENÉTICA DEL CÁNCER DE TIROIDES

La etiología multifactorial del cáncer de tiroides es el resultado de complejas interacciones de factores ambientales y genéticos. Se estima que un 25% del carcinoma medular de tiroides y un 5% de los carcinomas derivados de las células foliculares tienen un carácter hereditario o familiar (Nosé, 2011). La forma hereditaria del carcinoma medular de tiroides se presenta como parte de la neoplasia endócrina múltiple de tipo II (OMIM 171400) o como el síndrome del carcinoma medular de tiroides familiar (OMIM 155240) (Mears y Diaz-Cano, 2003). Por otra parte, la predisposición familiar de los carcinomas de tiroides derivados de células foliculares está asociada con algunos síndromes de herencia autosómica que presentan una alta frecuencia de nódulos y cáncer de tiroides. Entre estos síndromes se encuentran la poliposis adenomatosa familiar (OMIM 175100), el síndrome de Cowden (OMIM 158350), el complejo de Carney (OMIM 160980), el síndrome de Werner (OMIM 277700) y el síndrome de Pendred (OMIM 274600) (Nosé, 2010).

Las alteraciones genéticas más frecuentes de la carcinogénesis de la glándula tiroides están representadas, principalmente, por la activación de los protooncogenes *BRAF*, *RAS*, *RET* y *NTRK1* y el silenciamiento de los genes supresores de tumores *PTEN* y *TP53*. En la **Tabla 4** se muestra la prevalencia de las alteraciones genéticas más comunes en los carcinomas de tiroides derivados de células foliculares.

El gen *BRAF* codifica para una proteína kinasa serina/treonina que transduce señales reguladoras a través de la cascada RAS-RAF-MEK-ERK. Las mutaciones activadoras de *BRAF* promueven la activación aberrante de ERK resultando en alteraciones de la

INTRODUCCIÓN

expresión de genes involucrados en la división celular, apoptosis, diferenciación y migración celular (Wan *et al.*, 2004). Se han descrito mutaciones en este gen en PTC y ATC (Nikiforova *et al.*, 2003). Por otra parte, el gen *RAS* codifica para una proteína G. Las mutaciones activadoras de *RAS* comienzan la transducción de señales intracelulares a través de la liberación de GTP activando a BRAF y su cascada de señalización o por activación de la vía PI3K/AKT (Schubbert *et al.*, 2007). Mutaciones en *RAS* han sido observadas en todos los carcinomas de tiroides derivados de células foliculares (Lemoine *et al.*, 1989).

Tabla 4. Alteraciones genéticas en los carcinomas de tiroides derivados de células foliculares (Giusti *et al.*, 2010).

Genes	PTC	FTC	ATC
<i>BRAF</i>	45%	RARO	20%
<i>RAS</i>	10%–20%	40%–50%	50%–60%
<i>NTRK1</i>	<5%	—	—
<i>PI3K/AKT</i> y <i>PTEN</i>	—	7%	15%
<i>TP53</i>	RARO	RARO	60%–80%
<i>CTNNB1</i>	RARO	RARO	66%
<i>RET/PTC</i>	25%–30%	—	—
<i>PAX8/PPARγ</i>	—	35%	—

El gen *RET* codifica para un receptor de membrana con actividad tirosina kinasa y está involucrado en la activación de diferentes vías de señalización que inducen la proliferación celular. Mutaciones puntuales en este gen han sido reportadas en las formas esporádica y familiar del MTC. Además, se han observado reordenaciones en PTC que involucran la fusión de la porción 3' del gen *RET* y la porción 5' de genes heterólogos (Tallini *et al.*, 1998). Estas reordenaciones *RET/PTC* codifican para proteínas kinasas oncogénicas activadas de forma constitutiva. Asimismo, el gen *NTRK1* codifica un receptor transmembrana tirosina kinasa que se expresa exclusivamente en las neuronas, regulando el crecimiento y la supervivencia neuronal. Las reordenaciones cromosómicas de *NTRK1* dan lugar a proteínas oncogénicas con una expresión ectópica y una activación constitutiva análoga a las reordenaciones *RET/PTC*. Estas reordenaciones han sido descritas en PTC (Bongarzone *et al.*, 1998). Otra reordenación frecuente en carcinomas de tiroides es la que involucra los genes *PAX8* y *PPAR γ* . La oncoproteína de fusión resultante contribuye a la transformación maligna de

las células, afectando distintas vías de señalización. La reordenación *PAX8/PPAR γ* ha sido encontrada en FTC y en adenomas foliculares (Kroll *et al.*, 2000).

El gen *PTEN* codifica una proteína que puede inactivar la vía de señalización PI3K/AKT involucrada en la regulación del crecimiento, proliferación y supervivencia celular. Esta vía puede ser activada por la proteína RAS y la proteína de fusión RET/PTC a través de la pérdida de función de *PTEN* (Cantley y Neel, 1999). Mutaciones en este gen son responsables del síndrome de Cowden y han sido encontradas también en FTC y ATC (Hou *et al.*, 2007).

TP53 tiene un papel fundamental en el control del ciclo celular y la apoptosis. Las mutaciones en este gen representan las alteraciones genéticas más comunes de todos los tipos de cáncer humano. En los carcinomas de tiroides estas mutaciones están presentes principalmente en ATC (Ho *et al.*, 1996). En ATC también son frecuentes las mutaciones del gen *CTNBI*, el cual codifica la proteína β -catenina, un intermediario importante en la vía de señalización Wnt (Garcia-Rostan *et al.*, 2001).

Además de las alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores mencionadas anteriormente, se ha observado que existe un aumento de riesgo familiar de desarrollar cáncer de tiroides de 3,2 y 6,2 veces cuando alguno de los padres o un hermano, respectivamente, han tenido cáncer de tiroides y que este riesgo llega a valores de 11,2 veces entre hermanas (Hemminki *et al.*, 2005). Así, el riesgo familiar de cáncer de tiroides sugiere la existencia de un fondo genético hereditario que predispone al desarrollo de la enfermedad.

Diferentes regiones cromosómicas han sido asociadas con la susceptibilidad al cáncer de tiroides involucrando diversos genes: 9q22.33 (*FOXE1*) y 14q13.3 (*NKX2-1*) (Gudmundsson *et al.*, 2009); 8q24 (*AK023948*) (He *et al.*, 2009), 5q33 (*PremiR-146a*) (Jazdzewski *et al.*, 2009); 2q12-14 (*VDR*) (Penna-Martinez *et al.*, 2009); 19q13.2-13.3 (*XRCCI*) (Ho *et al.*, 2009); 12q24 (*P2X7R*) (Dardano *et al.*, 2009); 12p13.1-p12 (*CDKN1B*) (Landa *et al.*, 2010).

En nuestro laboratorio, se han encontrado evidencias de susceptibilidad al cáncer de tiroides en la región 1p12, identificando dos loci independientes como posibles

INTRODUCCIÓN

responsables del riesgo al cáncer de tiroides en esta región (Baida *et al.*, 2008; Akdi *et al.*, 2010). También en la región 8q24 se ha encontrado una asociación de dos polimorfismos del gen *TG* con el riesgo al cáncer de tiroides diferenciado (Akdi *et al.*, 2011). Además, se ha observado una asociación positiva del gen de reparación *XRCC1* con el cáncer de tiroides diferenciado (García-Quispes *et al.*, 2011).

5.2-EPIGENÉTICA DEL CÁNCER DE TIROIDES

La metilación del DNA y la modificación de las histonas son dos eventos epigenéticos estrechamente relacionados que ocurren de una manera coordinada en la regulación de la expresión génica. Como se ha indicado anteriormente, las alteraciones en estos mecanismos epigenéticos llevan a una desregulación de genes que tienen un rol crítico en la tumorigénesis en humanos, incluyendo el cáncer de tiroides.

En el caso del cáncer de tiroides existe evidencia de la importancia de la metilación afectando a la expresión de diversos tipos de genes que incluyen genes específicos de la glándula tiroides, genes supresores de tumores y genes de reparación del DNA, entre otros.

5.2.1-Metilación de genes específicos de la tiroides

Aunque los mecanismos moleculares que subyacen al silenciamiento de los genes específicos de la glándula tiroides en el cáncer de tiroides son inciertos, posiblemente la metilación aberrante de estos genes sea un mecanismo importante.

Muchos de estos genes específicos están metilados en sus regiones promotoras en tumores de tiroides, incluyendo *NIS* (Venkataraman *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 2004), *TSHR* (Xing *et al.*, 2003b) y *SLC26A4* (Xing *et al.*, 2003a). Además, se ha observado que esta metilación aberrante está asociada con el silenciamiento de su expresión en líneas celulares de tumores de tiroides y que la expresión puede revertirse con el tratamiento con agentes desmetilantes (Venkataraman *et al.*, 1999; Xing *et al.*, 2003b).

Asimismo, se ha demostrado que la modulación de la actividad del promotor de *TSHR* por metilación es un mecanismo para el silenciamiento de este gen en células derivadas de PTC, a través de la vía BRAF/MEK/MAPK activada por la mutación BRAF^{V600E} (Liu *et al.*, 2007). También se ha observado que la metilación y silenciamiento del gen supresor de tumores *SLC5A8* está asociada con la mutación del gen *BRAF* en PTC y con la invasión extratiroidal, la multifocalidad y los estadios tumorales avanzados del PTC (Porra *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006). El gen *SLC5A8* codifica para un transportador de iodo que se expresa en la membrana apical de las células foliculares de tiroides y también en otros tejidos.

Por otra parte, el gen *TRβ* muestra una disminución de la expresión en cáncer de tiroides asociada a la hipermetilación. Se sugiere que *TRβ* podría actuar como un gen supresor de tumores, cuya inactivación por metilación sería relevante en la tumorigénesis del cáncer de tiroides diferenciado, particularmente, del FTC (Joseph *et al.*, 2007).

5.2.2-Metilación de genes supresores de tumores

La inactivación de genes supresores de tumores es un evento clave en la tumorigénesis de la glándula tiroides. Esta pérdida de función es mediada por procesos irreversibles tales como la delección génica o las mutaciones. Los genes supresores de tumores también pueden ser inactivados por procesos epigenéticos. Se ha observado frecuentemente la metilación aberrante de algunos genes supresores de tumores en cáncer de tiroides y también en adenomas foliculares benignos de tiroides, sugiriendo una implicación temprana de este evento epigenético en la tumorigénesis de la tiroides.

Como se ha mencionado anteriormente, la inactivación del gen *PTEN* causa el síndrome de Cowden, el cual está asociado con el desarrollo de adenomas foliculares y FTC. Se ha encontrado que el promotor de este gen se encuentra hipermetilado en adenomas foliculares de tiroides, PTC y FTC (Alvarez-Nuñez *et al.*, 2006). De igual manera, varios genes de la familia RAS se encuentran silenciados debido a la hipermetilación de sus promotores en adenomas de tiroides y también en PTC, FTC, ATC y MTC (Schagdarsurengin *et al.*, 2002; 2009).

INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que *RAP1GAP* actúa como supresor de tumores en células de tiroides y con frecuencia es silenciado por mecanismos epigenéticos en las formas más agresivas de cáncer de tiroides. El gen *RAP1GAP* presenta una expresión disminuida en tumores de tiroides debido a la pérdida de la heterocigosidad, la metilación del promotor y a cambios en la estructura de la cromatina. La restauración de la expresión de *RAP1GAP* por liberación del bloqueo epigenético *in vitro*, inhibe la migración, la invasión y la progresión celular de células en cultivo (Zuo *et al.*, 2010).

Otros genes supresores de tumores son los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas *CDKN2A* y *CDKN1B*. Estos genes se encuentran comúnmente silenciados en cáncer de tiroides. Se ha observado la hipermetilación del promotor de *CDKN2A* en carcinomas primarios de tiroides (Elisei *et al.*, 1998). De la misma forma, factores de crecimiento de fibroblastos y sus receptores están implicados en la progresión de neoplasias endócrinas, incluyendo el cáncer de tiroides. Entre ellos, *FGFR2* se comporta como un gen supresor de tumores y se ha observado su inhibición epigenética en cáncer de tiroides (Kondo *et al.*, 2007).

Por otra parte, el inhibidor de metaloproteinasas TIMP3, inhibe el crecimiento, la angiogénesis, la invasividad y la metástasis de varios tipos de cáncer. El gen *TIMP3* presenta hipermetilación en muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de tiroides (Hoque *et al.*, 2005). Se ha observado una estrecha asociación de la metilación de *TIMP3* con la invasión extratiroidal, metástasis en los ganglios linfáticos y la multifocalidad del tumor en PTC (Hu *et al.*, 2006). Asimismo, el gen promotor de apoptosis *DAPK1* se encuentra frecuentemente metilado y silenciado en cánceres humanos incluyendo el PTC, y su metilación está asociada con la multifocalidad de los tumores (Hoque *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006). Otro gen que se encuentra metilado en PTC y en otros tipos de cáncer es *RARB2*, que codifica el receptor de ácido retinoico β 2 y se expresa en la mayoría de los tejidos jugando un papel central en la regulación del crecimiento de células epiteliales y su tumorigénesis (Hu *et al.*, 2006).

Varios estudios han mostrado una asociación de la mutación BRAF^{V600E} con la progresión y agresividad del PTC (Nikiforova *et al.*, 2003; Xing, 2005). Además, se ha observado que la mutación BRAF^{V600E} está asociada con la metilación de los genes supresores de tumores *TIMP3*, *SLC5A8* y *DAPK1*, sugiriendo que la metilación podría

ser un paso importante en la tumorigénesis y agresividad del carcinoma papilar de tiroides promovida por estas mutaciones (Porra *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006).

Por otro lado, *SERPINB5* es un posible gen supresor de tumores que codifica para la proteína maspin, la cual está involucrada en la transducción de señales y en la respuesta al estrés celular (Teoh *et al.*, 2010). Se ha observado que la desmetilación del promotor del gen *SERPINB5* está correlacionada con el aumento de la expresión de maspin en ATC (Ogasawara *et al.*, 2004).

5.2.3-Metilación de genes de reparación

Los genes de reparación del DNA protegen la integridad del genoma en las células normales por diversos mecanismos. La metilación aberrante y, por consiguiente, el silenciamiento de los genes de reparación del DNA pueden suponer un riesgo para las células a presentar inestabilidad genética.

Los genes de reparación *hMLH1*, *PCNA* y *OGG1* están metilados en tumores de carcinoma papilar de tiroides y se ha encontrado que esta metilación está asociada con la metástasis en los ganglios linfáticos, sugiriendo la importancia de esta alteración epigenética en el desarrollo de la metástasis y progresión del PTC (Guan *et al.*, 2008). Así, se ha propuesto que estos genes de reparación pueden ser buenos marcadores moleculares para el pronóstico de la metástasis en los ganglios linfáticos. También se ha observado que la metilación de *hMLH1* está estrechamente asociada con la mutación $BRAF^{V600E}$ en PTC (Guan *et al.*, 2008).

5.2.4-Modificaciones de histonas

Existen pocos estudios que investigan el papel de las modificaciones de las histonas en la tumorigénesis de la glándula tiroides. Greenberg *et al.* (2001) han observado una inhibición del crecimiento de células de carcinoma de tiroides mediada por inhibidores de histona desacetilasas, promoviendo la apoptosis e induciendo la detención del ciclo celular. Más recientemente, se ha demostrado que la inhibición de histona desacetilasas en células de cáncer de tiroides anaplásico también induce la expresión de Cadherina E,

INTRODUCCIÓN

resultando en una disminución de la invasión y migración celular (Catalano *et al.*, 2012).

Otros estudios han mostrado que las modificaciones de histonas, particularmente la acetilación/desacetilación, está involucrada en la regulación de genes específicos de tiroides implicados en la tumorigénesis. En líneas celulares de cáncer de tiroides se ha evaluado el efecto de inhibidores de histona desacetilasas sobre la expresión de *NIS*, *TPO* y *TG*, observando la re-expresión de estos genes y un incremento de la recaptación de iodo y acetilación de histonas (Kitazono *et al.*, 2001; Furuya *et al.*, 2004).

II- OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de tesis es **estudiar la implicación de los genes *WDR3* y *TBX15* en el cáncer**. Este objetivo surge a raíz de estudios de susceptibilidad al cáncer de tiroides llevados a cabo en nuestro laboratorio, que indicaron que la región cromosómica 1p12 podría contener genes relacionados con esta enfermedad. Las funciones asociadas a las familias génicas a las cuales pertenecen *WDR3* y *TBX15*, que se encuentran en la mencionada región cromosómica, nos llevan a suponer que estos genes podrían estar implicados en el cáncer de tiroides. Los resultados encontrados en el transcurso de esta tesis, nos indujeron a analizar la implicación de *WDR3* y *TBX15* en otros tipos de cáncer. Es por ello que nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la asociación de los genes *WDR3* y *TBX15* con el cáncer de tiroides.
- Analizar la expresión de *WDR3* y *TBX15* en líneas celulares y tejidos de tiroides.
- Analizar la expresión de *WDR3* en tejidos de colon.
- Analizar el estado de metilación de las regiones promotoras de *WDR3* y *TBX15* en líneas celulares y tejidos de tiroides.
- Analizar el estado de metilación de la región promotora de *TBX15* en tumores cerebrales.
- Estudiar la regulación de la expresión de *WDR3* debida a la unión de factores de transcripción.

III- MATERIALES Y MÉTODOS

1-CÉLULAS

Las células utilizadas en este trabajo de tesis son las siguientes:

S11N y **S63N**: células de cultivos primarios de tiroides normal.

Nthy-ori 3-1: línea celular derivada de tejido normal de tiroides transfectada con un plásmido codificante para el gen T de SV40.

TPC-1 y **B-CPAP**: líneas celulares de carcinoma de tiroides de tipo papilar.

ML-1, **WRO** y **CGTH-W-1**: líneas celulares de carcinoma de tiroides de tipo folicular.

FRO, **8305C**, **8505C** y **CAL-62**: líneas celulares de carcinoma de tiroides de tipo anaplásico.

HeLa: línea celular de carcinoma de cuello de útero.

U2OS: línea celular de osteosarcoma.

HCT116: línea celular de carcinoma colorrectal.

R001-m, **R014-m**, **R017-m**, **R026-m**, **R029-m**, **R032-m**, **R034-m**, **R052-m** y **R060-m**: líneas celulares de glioma de alto grado.

R006-m, **R008-m** y **R016-m**: líneas celulares de meduloblastoma.

Las células S11N y S63N fueron suministradas por el Dr. Ludwig Hieber del *German Research Center for Environmental Health* (Neuherberg, Alemania). TPC-1 y CAL-62 fueron provistas por los Dres. R. Melillo y M. Santoro de la *Università Degli Studi Di Napoli* (Nápoles, Italia). Las líneas celulares FRO y WRO fueron provistas por el Dr. R. Ciampi de la *Università Di Pisa* (Pisa, Italia). La línea celular HeLa fue suministrada por CNIO (Madrid, España). La línea celular HCT116 fue provista por el Dr. M.A. Peinado del *Institut de Medicina Predictiva i Personalitzada del Càncer* (Badalona, España) y la línea celular U2OS fue provista por el Dr. M.A. Pujana del *Institut Català d'Oncologia (l'Hospitalet de Llobregat, España)*. ML-1, B-CPAP, CGTH-W-1, 8305C y 8505C fueron adquiridas de DSMZ (Braunschweig, Alemania) y Nthy-ori 3-1 de Sigma-Aldrich. Las líneas celulares de glioma de alto grado y de meduloblastoma pertenecen al *Queensland Children's Tumour Bank* (Brisbane, Australia) y al *Royal Children's Hospital* (Melbourne, Australia).

Las líneas TPC-1, ML-1, CAL-62, HeLa y U2OS fueron crecidas y mantenidas en medio de cultivo DMEM (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino

MATERIALES Y MÉTODOS

(Gibco®) y 2,5 µg/ml de Plasmocin™ (InvivoGen); FRO y WRO en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco®), 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma), 1% de piruvato de sodio (Sigma) y 2,5 µg/ml de Plasmocin™ (InvivoGen); las líneas celulares B-CPAP, CGTH-W-1, 8305C y 8505C, en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco®) y 2,5 µg/ml de Plasmocin™ (InvivoGen); la línea celular HCT116 en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 15% de suero fetal bovino (Gibco®), 1% de piruvato de sodio (Sigma), 1% de L-Glutamina y 2,5 µg/ml de Plasmocin™ (InvivoGen). Las células fueron colocadas en frascos de cultivo e incubadas a 37°C y 5% de CO₂.

2-MUESTRAS DE PACIENTES Y CONTROLES

Para los análisis de susceptibilidad se obtuvieron 402 muestras de sangre periférica de individuos con cáncer de tiroides del *Hospital Universitari Vall d'Hebron* de Barcelona y del *Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta*. Las muestras de los individuos controles (sangre periférica o saliva) fueron obtenidas de 479 personas sin patologías de tiroides que gentilmente colaboraron con el estudio.

Para los estudios de expresión y regulación se analizaron 25 muestras de tejido normal de tiroides y 35 muestras de tejido tumoral de pacientes con diagnóstico de cáncer de tiroides del *Banc de Tumors de Catalunya*; 99 muestras de tumores de colon, 101 muestras de tejido normal de colon de pacientes con cáncer y 53 muestras de mucosa de colon de individuos sanos, provenientes del *Institut Català d'Oncologia*; 11 muestras de tumores cerebrales pediátricos y 2 muestras de tejido cerebral no tumoral procedentes del *Queensland Children's Tumour Bank* y del *Royal Children's Hospital*, Australia.

3-EXTRACCIÓN DE DNA

Las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 50°C con un *buffer* de extracción de DNA (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8; 25 mM EDTA; 0,5% SDS) conteniendo 100 µg/ml de proteinasa K. El DNA se extrajo utilizando el método estándar de fenol:cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989) con variaciones mínimas dependiendo del tipo de muestra y se precipitó en etanol absoluto con 10% de acetato de sodio (3 M; pH 5,2). El *pellet* de DNA se lavó con etanol 70% y se resuspendió en *buffer* TE 1X. La extracción a partir de muestras de saliva se realizó con el kit *Oragen*

DNA Self-Collection (DNA Genotek Inc.). El DNA se cuantificó en espectrofotómetro *NanoDrop* (Thermo Scientific) y se guardó a -20°C .

4-EXTRACCIÓN DE RNA

El RNA fue extraído utilizando *TRIzol® Reagent* (Invitrogen) de acuerdo al método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). El RNA fue tratado con DNAsa I (Ambion). La cuantificación fue realizada en espectrofotómetro *NanoDrop* (Thermo Scientific) y se guardó a -80°C .

5-SÍNTESIS DE cDNA

El cDNA total se obtuvo a partir de 1 μg de RNA utilizando el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche), utilizando *random hexamer primers*. Posteriormente, se cuantificaron las muestras en el espectrofotómetro *Nanodrop* (Thermo Scientific) y se guardaron a -20°C .

6-EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

A cada *pellet* celular obtenido por centrifugación se le agregó 200 μl de *buffer* de lisis RIPA 1 X (Upstate Cell Signaling Solutions) y la endonucleasa *Benzonase®* (Novagen) (1:500) para degradar todas las formas de DNA y RNA. Se utilizó el cóctel inhibidor de proteasas *Complete Mini, EDTA-free* (Roche) y el cóctel inhibidor de fosfatasa *phosSTOP* (Roche). La cuantificación de proteínas fue realizada por el método Bradford (Bradford, 1976) en el lector de placas *Sunrise-Basic* (TECAN).

7- GENOTIPADO

7.1-SELECCIÓN DE SNPs

Los SNPs seleccionados para su genotipado en las muestras de controles y pacientes de cáncer de tiroides fueron identificados a través de la búsqueda en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). El criterio de selección utilizado fue la frecuencia del alelo minoritario ($> 0,2$). Además, para el gen *WDR3* nos basamos en los datos de estudios de asociación previos llevados a cabo en nuestro laboratorio.

7.2-MÉTODO DE GENOTIPADO

MATERIALES Y MÉTODOS

El genotipado de los SNPs se realizó en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen) mediante la tecnología MALDI-TOF, utilizando la estrategia iPLEX Gol del sistema MassARRAY™ (Sequenom). El 10% de las muestras fueron doblemente genotipadas para asegurar la fiabilidad del genotipado.

8-PCR CUANTITATIVA (qPCR)

La cuantificación de la expresión de *WDR3* y *TBX15* a nivel de transcripción se realizó a partir de la amplificación del cDNA total utilizando como referencia la expresión del gen constitutivo *RPL27* (*Ribosomal Protein L27*). Los cebadores para analizar la expresión de los genes *WDR3* y *TBX15* fueron diseñados con el *software* Primer Designer (Sci-Ed Software) y el gen *RPL27* fue amplificado con los cebadores descritos por De Jonge *et al.* (2007) (**Tabla 5**).

Tabla 5. Secuencias de los cebadores para el análisis de la expresión de los genes *WDR3* y *TBX15* por qPCR.

Gen		Cebadores (5'-3')	Amplicón
<i>WDR3</i>	F	TCGATCCGAATCTTCAGTCT	209 bp
	R	GCCATCACACAAGCATTGTT	
<i>TBX15</i>	F	TCAACTTTCCTGAGACTGTG	156 bp
	R	AGAATGCATATGTCTCCATG	
<i>RPL27</i>	F	ATCGCCAAGAGATCAAAGATAA	123 bp
	R	TCTGAAGACATCCTTATTGACG	

La PCR cuantitativa de las líneas celulares y tejidos de tiroides se realizó mediante la tecnología *LightCycler*® 480 System (Roche), utilizando el *LightCycler*®480 SYBR Green I Master (Roche). Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. La mezcla de reacción para la qPCR fue: *LightCycler*® 480 SYBR Green I Master 1x, cebadores 0,5 µM cada uno, cDNA de líneas celulares 50 ng o cDNA de tejidos 100 ng y H₂O hasta un volumen final de 20 µl por pocillo. Los parámetros programados en el *LightCycler*® 480 fueron: 1 ciclo de pre-incubación (95°C durante 5 min), 45 ciclos de cuantificación de la amplificación (95°C durante 10 s, 55°C durante 30 s, 72°C durante 30s), 1 ciclo de curvas de disociación (95°C durante 5s, 65°C durante 1 min y aumento continuo 0,11°C por segundo hasta 97°C) y 1 ciclo de enfriamiento (40°C).

La PCR cuantitativa de las muestras de tejido de colon se realizó mediante la tecnología *BioMark™ System* (Fluidigm), utilizando la matriz *96.96 Dynamic Array™ IFCs*. Este análisis fue llevado a cabo en el *Institut Català d'Oncologia*.

9-WESTERN BLOT

Los *western blots* se realizaron a partir de 30 µg de proteína, la cual fue desnaturalizada a 95 °C durante 5 min en presencia de β-mercaptoetanol. A continuación las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 7 % y transferidas a una membrana de nitrocelulosa *Trans-Blot® Transfer Medium* (BIO-RAD) por *electroblotting* durante 60 min a 20 V, utilizando una unidad de transferencia *Trans-Blot® SD Semi-dry Transfer Cell* (BIO-RAD). Las membranas fueron teñidas con el colorante rojo punzó para verificar la transferencia. Para evitar uniones no específicas, las membranas fueron bloqueadas en solución de TBS con 1 % de Tween 20 y 5 % de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario (1:2000) y sodiazida 1:1000 durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-WDR3 (A301-553A, Bethyl Laboratories, Inc.), anti-TBX15 (ab104672, Abcam), anti-c-Myc (ab32, Abcam) o anti-CTCF (sc-15914, Santa Cruz Biotechnology), dependiendo del análisis. Como control se utilizó el anticuerpo anti-vinculina (ab18058, Abcam) en todos los análisis. La detección se realizó con los anticuerpos secundarios anti-conejo (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology) y anti-ratón (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology) conjugadas con peroxidasa (1:3000) durante 1 hora a temperatura ambiente y utilizando solución de revelado *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific). La lectura se realizó en GeneGnome© y se utilizó para el análisis el programa Gene Tools que valora la intensidad de las bandas reveladas en la membrana, asignándoles un valor numérico. De esta manera pueden compararse los valores de intensidad de las bandas obtenidas.

10-SECUENCIACIÓN DEL DNA MODIFICADO CON BISULFITO (*BISULFITE SEQUENCING*)

El análisis de la metilación de las regiones promotoras de los genes *WDR3* y *TBX15* en las líneas celulares se realizó por secuenciación del DNA modificado con bisulfito sódico (*bisulfite sequencing*). Los cebadores fueron diseñados con el *software* MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) (Li y Dahiya, 2002). Estos

MATERIALES Y MÉTODOS

cebadores se unen específicamente a secuencias modificadas por bisulfito, independientemente de su estado de metilación. Para el gen *WDR3* se amplificaron las regiones wA1, wA2, wB1 y wB2 y para el gen *TBX15* las regiones t1, t2 y t3. Las secuencias de los cebadores para amplificar estas regiones, el tamaño de las regiones amplificadas y los sitios CpG que comprenden se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Cebadores para el análisis de la metilación de las regiones promotoras de los genes *WDR3* y *TBX15* por *bisulfite sequencing*.

Gen	Región	Cebadores 5'-3'	Amplición	Sitios CpG
<i>WDR3</i>	wA1	F GGTTATAGTATTATTGTTTTAGTGTT R AATTCTATCACTTCTCTTAAAAAAC	150 bp	11
	wA2	F TTTAGTTTGTAATTTTGATTAGGGT R CTCCAATCTCCTAAAACCTTAACTC	238 bp	24
	wB1	F TTAGAAGGTAAAGGGAATTTTTGG R CTAAATCCCCCAACCCTAAC	248 bp	17
	wB2	F GGTTGGGGGAATTTAGGTAATTA R TAACAACAAACCTACCACACATTC	218 bp	14
<i>TBX15</i>	t1	F TGAAATGGGATAGTATAATTGATTTG R CCATAAACTTTTATTTTTAAAAATATAA	231 bp	15
	t2	F TTTAGTTTGTTTTTTATAAATTTATTTG R AACAAAATTTCCCTCACCTCTTAAAC	288 bp	25
	t3	F TTTTATAAAGGGAGTTTTGTGTGGT R TAAAACAACTCCTCCCTCATACTC	250 bp	19

El DNA extraído de las líneas celulares fue modificado con bisulfito sódico para diferenciar las citosinas metiladas de las no metiladas, utilizando el kit comercial *EZ DNA Methylation-Startup™Kit* (Zymo Research). Como se ha mencionado en el apartado 4.4.1 de la Introducción, esta modificación del DNA está basada en la diferente sensibilidad de la citosina y la 5-metilcitosina a la desaminación por bisulfito en condiciones ácidas. En este proceso la citosina no metilada se convierte en uracilo, mientras que la 5-metilcitosina no reacciona, permaneciendo como citosina. Seguidamente se verificó la modificación del DNA realizando una amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos de DNA modificado provistos como control de la modificación por el kit comercial. Una vez verificada la modificación del DNA, se amplificaron las regiones anteriormente mencionadas. Las condiciones utilizadas fueron: 1 ciclo de desnaturalización (95°C durante 10 min), 40 ciclos de amplificación

(95°C durante 35 s, temperatura de apareamiento de cebadores durante 30 s y 72°C durante 1 min) y 1 ciclo de extensión final (72°C durante 10 min). La temperatura de apareamiento para los cebadores de las cuatro regiones del gen *WDR3* es 49°C, para el gen *TBX15* la temperatura de apareamiento de los cebadores de la región t1 es 55°C, de la región t2 es 53°C y de la región t3 es 59°C. Los productos de la amplificación por PCR fueron comprobados en gel de agarosa, purificados y secuenciados en el servicio de secuenciación de MacroGen Inc. (Amsterdam). El análisis de las secuencias se realizó identificando cada uno de los sitios CpG de las distintas regiones en las diferentes líneas celulares y verificando en los electroferogramas los picos correspondientes. En las secuencias obtenidas las citosinas no metiladas aparecen como timinas y las 5-metilcitosinas como citosinas. La semicuantificación del grado de metilación se realizó a partir de los dinucleótidos CpG que muestran doble pico en el electroferograma de acuerdo al método descrito por Jiang *et al.* (2010), aplicando la fórmula:

$$\% \text{Metilación} = 100 \times C \div (C + T)$$

A partir del porcentaje de metilación obtenido se establecieron los rangos: 0%, 25%, 50%, 75% y 100%.

11-ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA METILACIÓN

11.1-FUNDAMENTOS DEL MÉTODO MassARRAY EpiTYPER

La tecnología MassARRAY EpiTYPER combina la escisión de ácidos nucleicos específica de bases con el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF (**Figura 16**). Este método comienza con el tratamiento del DNA genómico con bisulfito sódico, seguido de una amplificación por PCR en la cual se ha introducido una diana del promotor de la polimerasa T7. Posteriormente, este promotor se utiliza para realizar una transcripción *in vitro* a RNA sobre la cadena reversa incorporando dCMP. El RNA obtenido se trata con RNasa A (específica de pirimidinas) la cual corta la secuencia diana específicamente en la base U ya que durante la transcripción ha incorporado dCMP en el RNA transcripto. Los productos de escisión que contienen uno o más sitios CpG se denominan unidades analíticas CpG. Estos fragmentos difieren en tamaño y en masa debido a su composición nucleotídica, generando un patrón de señales distintivo para el DNA metilado y no metilado que es analizado y cuantificado con el sistema MassARRAY. Las diferencias en el perfil de metilación del DNA analizado resultarán en cambios en la secuencia de nucleótidos después del tratamiento con bisulfito, los

MATERIALES Y MÉTODOS

cuales a su vez darán diferentes masas en los fragmentos. La abundancia de cada fragmento (nivel de señal/ruido en el espectro) es indicativa de la cantidad de metilación del DNA en la secuencia analizada.

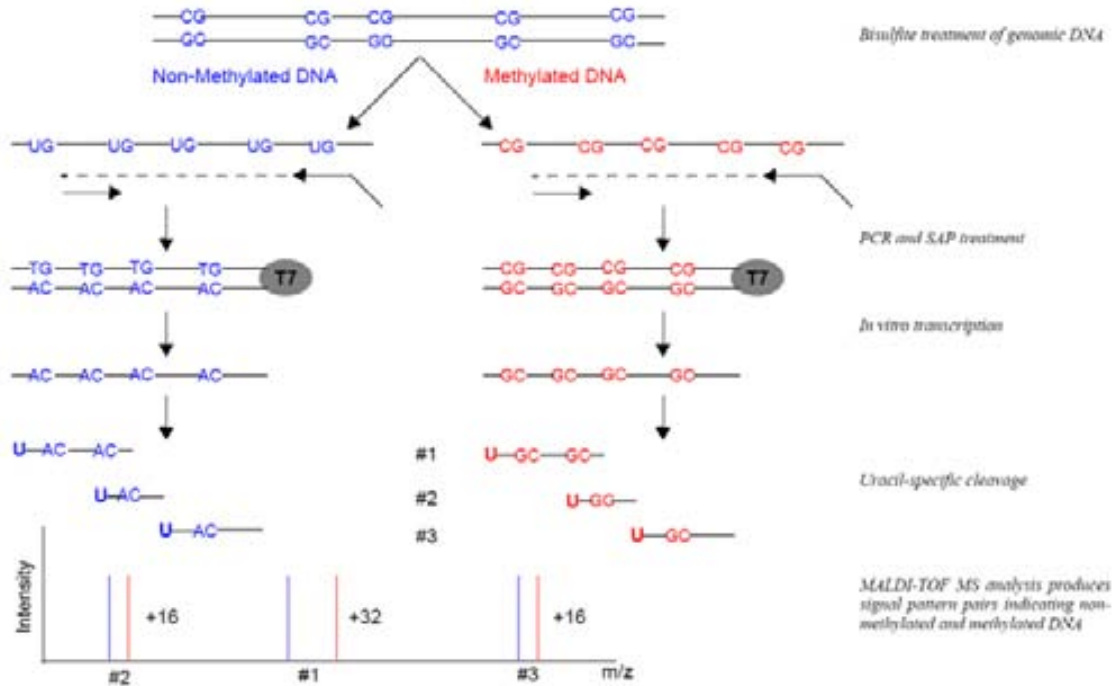


Figura 16. Análisis de la metilación por escisión específica de bases y espectrometría de masas. El DNA genómico es tratado con bisulfito y amplificado por PCR utilizando cebadores que incluyen la secuencia promotora T7. El tratamiento con SAP neutraliza los nucleótidos no incorporados. El producto de PCR es transcrito y escindido específicamente en U con RNasa A. Los fragmentos resultantes son analizados espectrometría de masas para calcular su nivel de metilación (<http://www.sequenom.com>).

11.2-ANÁLISIS *IN SILICO*

Este ensayo de predicción es necesario para definir las secuencias que serán analizadas mediante la tecnología MassARRAY EpiTYPER para la cuantificación de la metilación de los sitios CpG que contienen. Se trata de una simulación del ensayo MassARRAY EpiTYPER que consiste en una digestión *in silico* en C o en T de una secuencia diana, acoplada con el análisis *in silico* de espectrometría de masas. Este análisis es utilizado para filtrar los sitios CpG que no sean informativos por alguna de las siguientes razones: (i) el peso molecular del fragmento está fuera del rango de masas analizable (en el *software* Sequenom EpiTYPER, el intervalo por defecto es 1500-7000 Da); (ii) dentro

de un mismo fragmento se encuentran múltiples sitios CpG, resultando en una menor resolución; (iii) el peso molecular de un fragmento coincide con el de otro fragmento con la misma composición de nucleótidos, provocando una superposición en el espectro de masas. El análisis *in silico* de las regiones promotoras de los genes *WDR3* y *TBX15*, en las cadenas directa (+) y complementaria (-) se realizó utilizando el paquete de datos MassArray (Thompson *et al.*, 2009) para el *software* estadístico R.

11.3-MassARRAY EpiTYPER

El análisis cuantitativo de la metilación de las regiones promotoras de los genes *WDR3* y *TBX15* se realizó mediante la tecnología MassARRAY EpiTYPER (Sequenom, Inc.). Los cebadores utilizados se diseñaron con el *software* SEQUENOM® EpiDesigner BETA (www.epidesigner.com). Los cebadores reversos tienen incorporada la secuencia del promotor de la polimerasa T7 [5'-CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCT-3'] y los cebadores directos una secuencia de 10 nucleótidos para equilibrar la PCR [AGGAAGAGAG]. Estos cebadores son independientes del estado de metilación del DNA. Para el gen *WDR3* se amplificaron las regiones WDR3-1 y WDR3-2 y para el gen *TBX15* la región TBX15-1. Los cebadores utilizados, el tamaño de las regiones amplificadas y los sitios CpG que comprenden se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Cebadores para el análisis cuantitativo de la metilación de las regiones promotoras de los genes *WDR3* y *TBX15* por MassARRAY EpiTYPER.

Región	Cebadores (5'-3')	Amplicón	Sitios CpG
WDR3-1	F aggaagagagGAGTAAATAAGGAGGAGTTAGTTTTGG	453 bp	24
	R cagtaatcagactcactataggagaaggctCCCTAATCAAATA CAAACAAAA		
WDR3-2	F aggaagagagTTTAGAAGGTAAAGGGAATTTTTGG	333 bp	23
	R cagtaatcagactcactataggagaaggctATCAAACAACTCTAC TCAACACCC		
TBX15-1	F aggaagagagGTAGGTTTTGTTTTGGGATTGG	349 bp	26
	R cagtaatcagactcactataggagaaggctAAACAAAATTCCTC ACCTCTAAA		

Paso 1: Modificación con bisulfito

Un total de 500 ng de DNA genómico se trató con bisulfito sódico utilizando *MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulfite Modification Kit* (Human Genetic Signatures), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Paso 2: Amplificación por PCR

La reacción de PCR se realizó en placas de 96 pocillos, con un volumen final en cada uno de 15 µl conteniendo 20 ng de DNA modificado con bisulfito, 1 X *FastStart PCR Master* (Roche) y 0,4 µM de cada cebador. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización (95°C durante 10 min), 5 ciclos de amplificación (95°C durante 10 s, temperatura de apareamiento de cebadores 1 durante 30 s y 72°C durante 2 min); 35 ciclos adicionales de amplificación (95°C durante 10 s, temperatura de apareamiento de cebadores 2 durante 30 s, y 72°C durante 1 min 30s) y 1 ciclo de extensión final (72°C durante 7 min). Para la región WDR3-1, la temperatura de apareamiento de cebadores 1 fue 54°C y la temperatura de apareamiento de cebadores 2, 58°C. Para las regiones WDR3-2 y TBX15-1 las temperaturas de apareamiento de cebadores 1 y 2 fueron 58°C y 62°C, respectivamente. Para reducir la variabilidad de la cuantificación de la metilación debida a la PCR (Coolen *et al.*, 2007) se realizaron dos réplicas de amplificación para cada una de las muestras. La amplificación fue comprobada en gel de agarosa 1% utilizando la tinción GelRed™ (Biotium).

Paso 3: Desfosforilación

Se agregaron 2 µl de la enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) cada 5 µl del producto de amplificación para desfosforilar los dNTPs no incorporados en la PCR. Las placas se incubaron a 37°C durante 20 min, seguidos de 5 min a 85°C.

Paso 4: Transcripción *in vitro* y escisión con RNasa A

Se prepara una mezcla de transcripción/RNasa A para una placa de 384 pocillos considerando un volumen final de 5 µl por pocillo. La mezcla contiene 0,64X de buffer de polimerasa T7; 3,14 mM de DTT; 22 unidades de polimerasa T7 y 0,09 mg/ml de RNasa A. En una nueva placa se colocan 2 µl de las muestras PCR/SAP y se agregan 5 µl de la mezcla transcripción/RNasa A, se centrifuga la placa 1 min y se incuba a 37°C durante 3 h.

Paso 5: Acondicionamiento de muestras para el análisis

Se agregan 20 µl de ddH₂O a cada pocillo de la placa de 384 y 6 mg de resina de limpieza *Clean Resin*. Se deja en rotación 10 min y se centrifuga 5 min a 3200 x g.

Paso 6: Transferencia y análisis

Utilizando el nanodispensador MassARRAY® Nanodispenser se transfieren 10 μ l de los productos de reacción al *bioarray* SpectroCHIP®. El espectro de las reacciones de escisión es captado por el sistema MassARRAY® y los resultados son analizados con el *software* EpiTYPER.

12-ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

12.1-PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados para este estudio fueron los siguientes:

- pGL4.26**: vector reportero de luciferasa *luc2*
- pRL-SV40**: vector reportero de luciferasa *hRluc*
- pMX-c-Myc**: vector de expresión de c-Myc
- pMX-Ø**: vector vacío
- pCi-CTCF**: vector de expresión de CTCF
- pCi-Ø**: vector vacío

Los vectores pGL4.26 y pRL-SV40 fueron adquiridos de Promega (Madison, Estados Unidos). Los vectores pMX-c-Myc (Takahashi *et al.*, 2007) y pMX-Ø (Takahashi y Yamanaka, 2006) fueron adquiridos de Addgene (<http://www.addgene.org>). Los vectores pCi-CTCF y pCi-Ø (Farrar *et al.*, 2010) fueron provistos gentilmente por la Dra. Elena Klenova de la *University of Essex* (Essex, Reino Unido).

12.2-CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS

Diferentes construcciones plasmídicas fueron obtenidas por la clonación de diferentes fragmentos de DNA de la región promotora del gen *WDR3* en el vector pGL4.26[*luc2*/minP/Hygro] (Promega) (**Figura 17**). El vector pGL4.26 contiene una región de clonaje múltiple para la inserción de elementos de interés delante de un promotor mínimo unido al gen reportero luciferasa *luc2* (*Photinus pyralis*). *luc2* es una secuencia derivada sintéticamente del gen *luciferasa* que tiene un codón optimizado para una expresión más eficiente en células de mamíferos. El vector contiene un gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli* y un marcador para resistencia a higromicina.

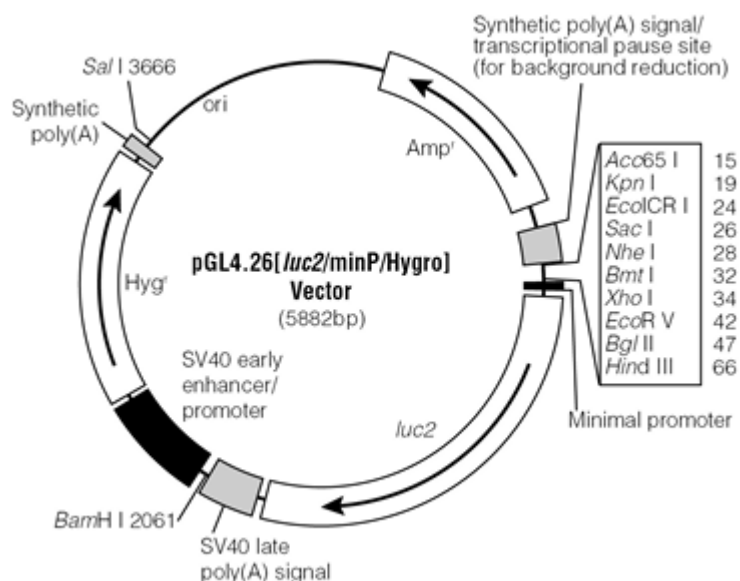


Figura 17. Genoma del plásmido pGL4.26[luc2/minP/Hygro] (Promega).

Los fragmentos de la región 5' del gen *WDR3* a clonar fueron obtenidos por PCR a partir del DNA genómico de la línea celular TPC-1. El diseño de los cebadores se realizó incorporando dianas para la digestión con enzimas de restricción para generar los extremos a unir en el vector pGL4. Los cebadores directos contienen la diana para la enzima *KpnI* y los reversos para la enzima *BglIII*. Los diferentes fragmentos fueron incorporados entre los sitios *KpnI* y *BglIII* o *KpnI* y *SacI* del vector dependiendo del fragmento a clonar, delante del gen reportero luciferasa *luc2*. En la **Tabla 8** se indican los cebadores utilizados, así como los amplicones generados.

Tabla 8. Cebadores para amplificar los fragmentos del promotor de *WDR3* que serán clonados en el vector pGL4. En gris se indican los sitios diana de las enzimas de restricción.

Fragmento	Cebadores (5'-3')	Amplicón
1828	F GGATAGGTACCATACATACCCACTCAAAT R TAAACAGATCTCCATACAACCTTGCACTGTTC	1847 bp
1461	F AACTCGGTACCAAACACTTCTATGCAGCTCA R TAAACAGATCTCCATACAACCTTGCACTGTTC	1483 bp
855	F CCCTCGGTACCTCAGTCCCTCCTCTCACAG R TAAACAGATCTCCATACAACCTTGCACTGTTC	877 bp
456	F TTATCGGTACCTCCGATTTTGCAGATTCT R TAAACAGATCTCCATACAACCTTGCACTGTTC	477 bp
993	F GGATAGGTACCATACATACCCACTCAAAT	1008 bp

	R	CAGAGATCTGTGAGAGGAGGGACTGAG	
1404	F	GGATAGGTACCATACATACCCACTCAAAT	
	R	GCTGAAGATCTGAACGCCTCAGCCAGAATCT	1423 bp

Paso 1: Amplificación

La mezcla de reacción contiene *buffer II* 1X; MgCl₂ 2 mM; dNTPs 0,4 mM; cebadores 0,4 μM cada uno y 2,5 U/μl de *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase* (Applied Biosystems) en un volumen final de 25 μl. Las condiciones utilizadas fueron: 1 ciclo de desnaturalización (95°C durante 5 min), 40 ciclos de amplificación (95°C durante 45 s, temperatura de apareamiento de cebadores durante 45 s y 72°C durante 1 min 45 s) y un ciclo de extensión final (72°C durante 7 min). La temperatura de apareamiento de cebadores para los fragmentos 1828, 456 y 1404 fue 55°C; la del fragmento 1461, 50°C y la de los fragmentos 855 y 993, 57°C.

Paso 2: Digestión enzimática

Los fragmentos obtenidos por amplificación fueron digeridos con las enzimas *KpnI* y *BglIII*. Un fragmento adicional de 687 bp fue obtenido por digestión enzimática del fragmento 1828 con las enzimas *KpnI* y *SacI*. La digestión del vector pGL4-26 se realizó con las enzimas *KpnI* y *BglIII* para la clonación de los fragmentos 1828, 1461, 855, 456, 993 y 1404. Para clonar el fragmento 687 se digirió el vector con las enzimas *SacI* y *KpnI*. Las condiciones de las reacciones de digestión de los fragmentos fueron: *buffer A* 1X, 2 μl de cada una de las enzimas utilizadas, 1 μl de BSA y 20 μl de producto de PCR en un volumen final de 50 μl. Las digestiones se realizaron a 37°C durante 3 h. En las digestiones del vector se utilizaron: *buffer A* 1X, 3 μl de cada enzima utilizada, 1 μl de BSA y 5,6 μg/μl del vector pGL4 en un volumen final de 20 μl. Las digestiones se realizaron a 37°C durante toda la noche. Todas las digestiones fueron comprobadas en gel de agarosa, se purificaron con el kit *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (Roche) y posteriormente se cuantificó el DNA con el espectrofotómetro *NanoDrop* (Thermo Scientific).

Paso 4: Ligación

La ligación de cada uno de los fragmentos de DNA con el vector pGL4 se realizó utilizando el *Quick Ligation™ Kit* (New England Biolabs, Inc.), siguiendo las

MATERIALES Y MÉTODOS

recomendaciones del fabricante. Las proporciones de inserto y vector fueron calculadas a partir de la siguiente ecuación:

$$Xng\ inserto = \frac{ng\ vector \times Kb\ inserto}{Kb\ vector} \times 3$$

Los cálculos se realizaron para ligar un total de 50 ng de vector.

Paso 5: Transformación

Las transformaciones se realizaron en células de la cepa DH5 α de *Escherichia coli* (...). Para ello se utilizaron 100 μ l de células DH5 α competentes y 4 μ l de reacción de ligación. Las células de *E. coli* transformadas se seleccionaron por su crecimiento en placas de agar suplementado con ampicilina. Posteriormente, se extrajo el DNA plasmídico realizando mini-preps utilizando el kit comercial NucleoSpin® Plasmid QuickPure (MACHEREY-NAGEL). La comprobación de la incorporación de los fragmentos en cada uno de los clones se realizó por secuenciación del DNA plasmídico utilizando los cebadores pGL4-F [5'-CAGGTGCCAGAACATTTCTC-3'] y pGL4-R [5'-TACCAACAGTACCGGATTGC-3'].

12.3-TRANSFECCIÓN

Para las transfecciones transitorias se utilizaron las líneas celulares U2OS, TPC-1 y HCT116. Las células se sembraron en placas de seis pocillos, colocando en cada uno 150.000 células y 2 ml de medio de cultivo. Las células crecieron en sus medios de cultivo respectivos durante 24 horas antes de la transfección. Cada transfección se realizó utilizando 1 μ g de DNA plasmídico total en 3 μ l de *X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent* (Roche) y 100 μ l de *Opti-MEM*® (Invitrogen). Para normalizar la eficiencia de las transfecciones las células fueron co-transfectadas además con el vector reportero control pRL-SV40 que contiene el gen luciferasa *hRluc* (*Renilla reniformis*). Las cantidades utilizadas de cada plásmido fueron: 500 ng del vector pMX o pCi, 450 ng del vector pGL4 y 50 ng del vector pRL-SV40. Las células se incubaron durante 48 horas después de la transfección. Pasado este tiempo se realizó la lisis y la recolección del lisado con 250 μ l de *Passive Lysis Buffer* 1X (Promega), suplementado con inhibidores de proteasas *Complete Mini EDTA-free* (Roche) e inhibidores de fosfatasa *phosSTOP* (Roche).

12.4-ENSAYO DUAL DE LUCIFERASA

La actividad del promotor de *WDR3* se analizó mediante el ensayo de luciferasa utilizando el *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System* (Promega). En este ensayo, las actividades luciferasa de los genes *luc2* (pGL4) y *hRluc* (pRL-SV40) son medidas secuencialmente en la misma muestra. En primer lugar se mide la actividad luciferasa de *luc2* por adición de 20 μ l de *Luciferase Assay Reagent II* a 10 μ l del lisado celular, generando una señal luminiscente. Después de cuantificar esta luminiscencia, la reacción es detenida y se inicia simultáneamente la reacción de luminescencia de *hRluc* por la adición de 20 μ l de *Stop & Glo[®] Reagent* en el mismo tubo. La actividad de ambas luciferasas se midió con el luminómetro *FB12* (Berthold) en tubos de polipropileno siliconizado.

13-ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el estudio de asociación caso-control, el análisis de asociación, el desequilibrio de ligamiento y la frecuencia estimada de los haplotipos se llevaron a cabo utilizando el programa SNPStats (Solé *et al.*, 2006). Los *odds ratio* (OR) y los intervalos de confianza del 95% fueron calculados por análisis de regresión logística ajustados a las variables edad y género. La comparación de la proporción de sexos entre los casos y los controles y el equilibrio de Hardy-Weinberg de la distribución de los genotipos en la población control fueron examinados con el test de χ^2 .

Las pruebas de normalidad de las variables cuantitativas se realizaron con el test de Shapiro-Wilk cuando el conjunto de valores fue menor de 30 o con el test de Kolmogorov-Smirnov, con corrección Lilliefors, cuando el conjunto de valores fue mayor de 30. Dependiendo de si los datos siguen una distribución normal o no, fueron analizados utilizando el test de Student o el test de Wilcoxon, respectivamente. La comparación no paramétrica de más de dos grupos se realizó con el test de Kruskal-Wallis. Las variables categóricas fueron analizadas con el test de χ^2 .

El procesamiento y análisis de los datos fueron llevados a cabo utilizando la **versión 2.15.0** del *software* estadístico R (<http://www.r-project.org/>) con un nivel de 5% de significación para todos los análisis.

IV- RESULTADOS

A-ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS GENES *WDR3* Y *TBX15* CON EL CÁNCER DE TIROIDES

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sobre la asociación de la región 1p12 con la susceptibilidad al cáncer de tiroides, identificando dos polimorfismos como marcadores de dicha susceptibilidad (Baida *et al.*, 2008), constituyen el fundamento del trabajo realizado en esta tesis. Estos marcadores de susceptibilidad al cáncer de tiroides son independientes. Uno de ellos se encuentra en el intrón 24 del gen *WDR3*, mientras que el otro marcador se localiza en una región vacía de genes entre los genes *WDR3* y *TBX15* que dista 460 Kb del gen *TBX15*. El análisis de asociación de los genes *WDR3* y *TBX15* con la susceptibilidad al cáncer de tiroides se realizó siguiendo un diseño epidemiológico caso-control, analizando primeramente el gen *WDR3* y luego el gen *TBX15*.

El estudio de asociación de *WDR3* con el cáncer de tiroides formó parte de un trabajo anterior (Akdi *et al.*, 2010) al que se presenta como tesis. Mi participación en dicho trabajo y el hecho de suponer una de las bases de la tesis hacen conveniente la descripción resumida del mismo.

El estudio caso-control de *WDR3* se realizó en una población española de 402 pacientes de cáncer de tiroides y 479 individuos control, genotipando los SNPs rs3754127, rs3765501 y rs4658973. Aunque estos SNPs, de forma individual, no mostraron asociación con el cáncer de tiroides, el análisis de haplotipos reveló que el haplotipo CAT incrementa el riesgo al cáncer de tiroides (*odds ratio* = 1,85; intervalo de confianza 95% = 0,97-3,55; $p = 0,063$) (Akdi *et al.*, 2010).

Los estudios de asociación de *TBX15* con el cáncer de tiroides forman parte de este trabajo de tesis y se describen a continuación. La población española analizada consistió en el mismo grupo de pacientes de cáncer de tiroides y controles utilizados para el análisis de asociación con *WDR3*. En total se genotiparon 402 pacientes de cáncer de tiroides y 479 controles para tres SNPs del gen *TBX15*, rs1779420, rs10802069 y rs12408387.

RESULTADOS

Las características de la población estudiada se resumen en la **Tabla 9**. No se encontraron diferencias significativas en la edad promedio entre controles (46 ± 17 años) y pacientes (47 ± 15 años) (test de Wilcoxon, $p = 0,089$). Sin embargo, la proporción de géneros difiere entre los grupos control y pacientes, mientras que en los controles el género femenino representa el 59,1% en el grupo de pacientes es el 77,6% (test de χ^2 , $p < 0,0001$). Por consiguiente, analizamos la distribución de los genotipos dentro de los géneros para controles y pacientes y no se observaron diferencias estadísticamente significativas (test de χ^2 , $p > 0,05$). Así, las diferencias en la proporción de géneros en los grupos de controles y pacientes parecen no afectar el análisis de asociación en esta población de estudio.

Tabla 9. Características generales de la población estudiada.

		controles	pacientes
Población		479	402
Género	Femenino	283 (59,1%)	312 (77,6%)
	Masculino	196 (40,9%)	90 (22,4%)
Edad promedio \pm SD		46 ± 17	47 ± 15
Tipo de cáncer	Papilar	--	339 (84,3%)
	Folicular	--	59 (14,7%)
	otro	--	4 (1%)

El análisis de las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas calculadas a partir de las frecuencias alélicas, en el grupo de controles, para los polimorfismos estudiados en el gen *TBX15*, mostró que los tres SNPs se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (test de χ^2 , $p > 0,05$). Los resultados del genotipado y del estudio de asociación de los tres polimorfismos del gen *TBX15* con la susceptibilidad al cáncer de tiroides de acuerdo al modelo de herencia codominante se muestran en la **Tabla 10**. La comparación de las frecuencias alélicas no mostró diferencias significativas entre controles y pacientes para ninguno de los polimorfismos analizados (test de χ^2 , $p > 0,05$). Los *odds ratio* (OR) e intervalos de confianza (CI) del 95% fueron calculados por análisis de regresión logística ajustados con la edad y el género. Los ORs de los SNPs estudiados no son significativos, indicando no asociación de ninguno de estos polimorfismos con la susceptibilidad al cáncer de tiroides.

Tabla 10. Frecuencias alélicas y distribución de genotipos de los SNPs seleccionados de *TBX15* y su asociación con el cáncer de tiroides.

SNP	MAF		Genotipo	controles	pacientes	OR (95% CI)	P
	controles	pacientes					
rs1779420	0,49	0,49	C/C	130 (27,4%)	100 (26,2%)	1	0,88
			C/T	227 (47,8%)	190 (49,9%)	1,06 (0,76-1,47)	
			T/T	118 (24,8%)	91 (23,9%)	0,97 (0,66-1,43)	
rs10802069	0,48	0,45	C/C	123 (28,1%)	113 (29,9%)	1	0,38
			C/T	212 (48,4%)	193 (51,1%)	1,01 (0,73-1,41)	
			T/T	103 (23,5%)	72 (19,1%)	0,79 (0,53-1,18)	
rs12408387	0,23	0,24	C/C	279 (58,6%)	233 (58,5%)	1	0,64
			A/C	175 (36,8%)	143 (35,9%)	0,93 (0,70-1,24)	
			A/A	22 (4,6%)	22 (5,5%)	1,25 (0,66-2,35)	

Los tres polimorfismos de *TBX15* genotipados se encuentran en el mismo bloque de ligamiento, por lo tanto, se realizó un análisis de haplotipos combinando estos tres SNPs y se estimó el riesgo asociado a dichos haplotipos. Los resultados se muestran en la **Tabla 11**. Se observa que las diferentes combinaciones de los SNPs no muestran diferencias significativas entre los controles y los pacientes para ninguno de los haplotipos de *TBX15*.

Tabla 11. Análisis de los haplotipos del gen *TBX15* y su asociación con el cáncer de tiroides.

	rs1779420	rs10802069	rs12408387	controles	pacientes	OR (95% CI)	P
1	C	T	C	0,3733	0,3513	1,00	---
2	T	C	C	0,2973	0,2893	1,06 (0,82 - 1,37)	0,68
3	T	C	A	0,1266	0,1441	1,14 (0,84 - 1,56)	0,4
4	C	C	C	0,0961	0,1179	1,31 (0,90 - 1,89)	0,16
5	T	T	A	0,0595	0,0525	0,91 (0,55 - 1,51)	0,71
6	C	T	A	0,0442	0,041	1,04 (0,57 - 1,90)	0,9
otros	*	*	*			1,16 (0,15 - 8,79)	0,88

En resumen, los estudios de asociación realizados indican que *WDR3* es un factor de susceptibilidad al cáncer de tiroides, sin embargo, el análisis de asociación de *TBX15* muestra que este gen no afecta a la susceptibilidad al cáncer de tiroides en la población estudiada.

B-ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE LOS GENES *WDR3* Y *TBX15*

El gen *WDR3* pertenece a la familia de genes que codifican proteínas con motivos WD, involucradas en la progresión del ciclo celular, la transducción de señales, la apoptosis y la regulación génica. Varios estudios han mostrado la expresión alterada de las proteínas con motivos WD en determinados tipos de cáncer (Chernova *et al.*, 2001; Honore *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2005). Además, se ha propuesto que *WDR3* estaría involucrado en la proliferación del ciclo celular a través de la interrupción de la biogénesis del ribosoma (McMahon *et al.*, 2010).

El gen *TBX15* forma parte de la familia de genes T-box, los cuales codifican una familia de factores de transcripción implicados en la regulación de genes del desarrollo. Diversos estudios involucran a genes T-box con la proliferación celular y el cáncer (Bärlund *et al.*, 2000; Packham y Brook, 2003). La función del gen *TBX15* en vertebrados ha sido asociada al desarrollo de las extremidades, columna vertebral y cabeza (Kuijper *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005).

Basándonos en la función atribuida a los genes *WDR3* y *TBX15* y su posible implicación en cáncer, hipotetizamos que estos genes podrían jugar un papel en la etiología del cáncer de tiroides en particular y, posiblemente, en el cáncer en general. Para evaluar esta hipótesis se realizaron diversos estudios que incluyen el análisis de su expresión y la regulación genética y epigenética de los mismos.

1-EXPRESIÓN DE *WDR3*

Si el gen *WDR3* está implicado en la etiología del cáncer, posiblemente, su expresión estará alterada en células y tejidos tumorales. Se han identificado cuatro transcritos para el gen *WDR3* (Hubbard *et al.*, 2009), pero hasta el momento se conoce que solamente uno de ellos se traduce a una proteína funcional. Este transcrito, denominado WDR3-001 (ENST00000349139), tiene una longitud de 3858 bp y se traduce a una proteína de 943 aminoácidos (Q9UNX4), cuya masa es de 106 kDa (The UniProt Consortium, 2012). El estudio de la expresión del gen *WDR3* se realizó a nivel

de transcripción y traducción, utilizando células en cultivo, muestras de tejido de tiroides y muestras de tejidos de colon.

1.1-EXPRESIÓN DE *WDR3* EN CÉLULAS DE TIROIDES

Primeramente se analizó la expresión del gen *WDR3* a nivel de transcripción por qPCR en nueve líneas celulares de cáncer de tiroides de diferente origen: TPC-1 y B-CPAP de tipo papilar; ML-1, WRO y CGTH-W-1 de tipo folicular; y FRO, 8305-C, 8505-C y CAL-62 de tipo anaplásico; y la línea S11N como control, de células normales de tiroides (cultivos primarios de tiroides).

El análisis por PCR cuantitativa se realizó a partir de la amplificación de una región de 209 bp ubicada en los exones 3 y 4 del gen *WDR3*. La cuantificación de la expresión del gen *WDR3* se realizó en relación a la expresión del gen *RPL27* de expresión constitutiva que se utiliza como control. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (AU) de acuerdo al método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

En la **Tabla 12** se indica el valor medio de la expresión de *WDR3* en relación al gen control *RPL27* y el error estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. La representación gráfica de la expresión de *WDR3* se muestra en la **Figura 18**.

Tabla 12. Cuantificación de la expresión de *WDR3* a nivel de mRNA por PCR a tiempo real en líneas celulares de tiroides.

Línea celular	Expresión <i>WDR3/RPL27</i> (AU)	Error estándar	Expresión relativa a S11N	<i>p</i>
S11N	66,51	5,01	1	--
TPC-1	304,19	26,40	4,57	0,0009
B-CPAP	139,03	10,53	2,09	0,0034
ML1	88,55	10,90	1,33	0,14
WRO	239,41	18,83	3,60	0,0005
CGTH-W-1	153,81	4,36	2,31	0,0002
FRO	151,97	20,93	2,28	0,0149
8305-C	263,91	12,82	3,97	$5,7 \times 10^{-5}$
8505-C	191,67	15,14	2,88	0,0014
CAL-62	64,87	7,64	0,98	0,866

RESULTADOS

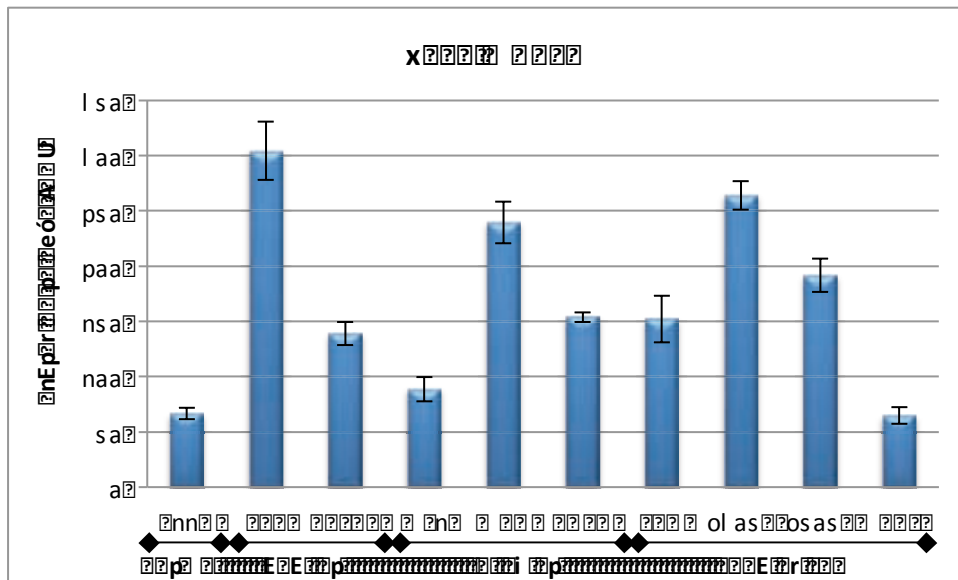


Figura 18. Expresión relativa de *WDR3* analizada por qPCR en líneas celulares de cáncer de tiroides. Las barras representan el valor medio y el error estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (AU).

La expresión relativa de *WDR3* es mayor en todas las líneas celulares de cáncer de tiroides en comparación con la expresión de *WDR3* en las células normales de tiroides (S11N), exceptuando la línea celular CAL-62 que presenta una expresión similar a estas células. Los niveles de expresión de *WDR3* son de 2,1 a 4,6 veces mayores en las líneas celulares TPC-1, B-CPAP, WRO, CGTH-W-1, FRO, 8305-C y 8505-C que en las células normales de tiroides S11N. Las diferencias de expresión observadas en estas líneas celulares de cáncer de tiroides en relación a la expresión de *WDR3* en las células S11N son significativas (**Tabla 12**). La línea celular ML-1 presenta un nivel de expresión 1,3 veces superior y CAL-62 presenta un nivel de expresión similar al de S11N. Las diferencias de expresión de estas líneas celulares en relación a las células normales no son significativas (**Tabla 12**).

El incremento en la expresión de *WDR3* observado en las líneas celulares de cáncer de tiroides es similar en los distintos tipos de cáncer de tiroides, sugiriendo que la expresión de *WDR3* no está relacionada con el tipo de tumor del cual procede cada línea celular.

El análisis de la presencia de la proteína *WDR3* en las distintas líneas celulares y en las células normales se realizó por *western blot*. Este análisis reveló bandas cuya señal

corresponde a la estimación del peso molecular de 106 kDa de la proteína WDR3. La proteína control utilizada como referencia es la vinculina.

La señal correspondiente a la proteína WDR3 es mayor en 8 de las 9 líneas celulares de cáncer de tiroides analizadas, comparadas con las células normales de tiroides S11N; en la línea celular CAL-62 no se observa señal de la proteína WDR3 (**Figura 19**). Las líneas celulares TPC-1, WRO, CGTH-W-1 y FRO muestran la mayor intensidad de señal de la proteína WDR3, seguidas de las líneas celulares 8505-C, 8305-C, B-CPAP y ML1.

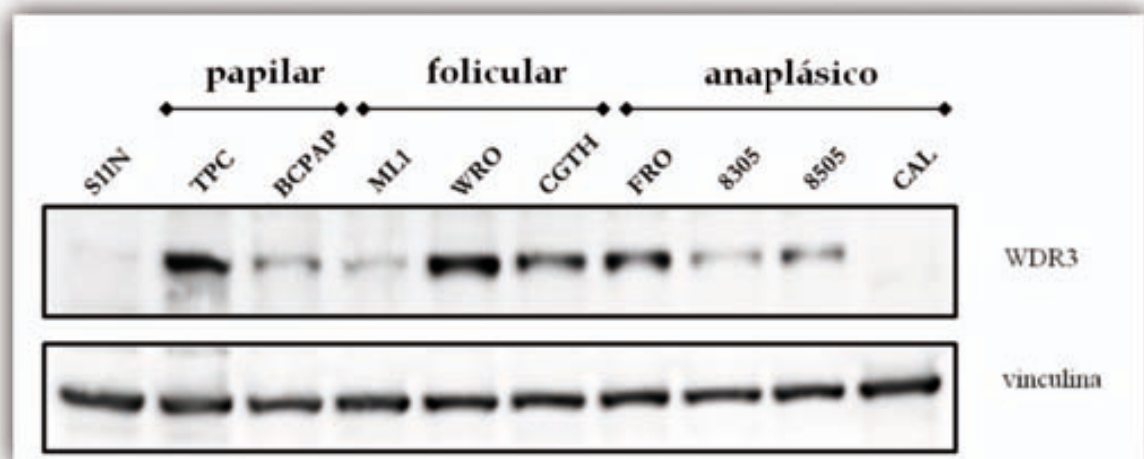


Figura 19. *Western blot* de la proteína WDR3 en líneas celulares de cáncer de tiroides. La proteína control utilizada es la vinculina.

La cuantificación de la señal de la proteína WDR3 en las líneas celulares de cáncer relativa a las células normales S11N muestra que en las líneas celulares de cáncer de tiroides la cantidad de proteína WDR3 es de 6 a 72 veces superior que en las células normales, exceptuando la línea celular CAL-62 que presenta un nivel de WDR3 similar a estas células (**Figura 20**).

En general se observa una correlación directa entre la presencia de la proteína WDR3 detectada por *western blot* y la cantidad de mRNA obtenida por qPCR para cada una de las líneas celulares estudiadas. Las líneas celulares ML-1 y CAL-62 mostraron un nivel bajo de mRNA de *WDR3*, similar a las células normales S11N y también presentan la señal más débil en el *western blot*, comparadas con el resto de las líneas celulares. Los

RESULTADOS

niveles significativos de expresión a nivel de mRNA para el resto de las líneas celulares de cáncer de tiroides (ver **Tabla X**) se corresponden con señales de la proteína WDR3 relativamente más intensas.

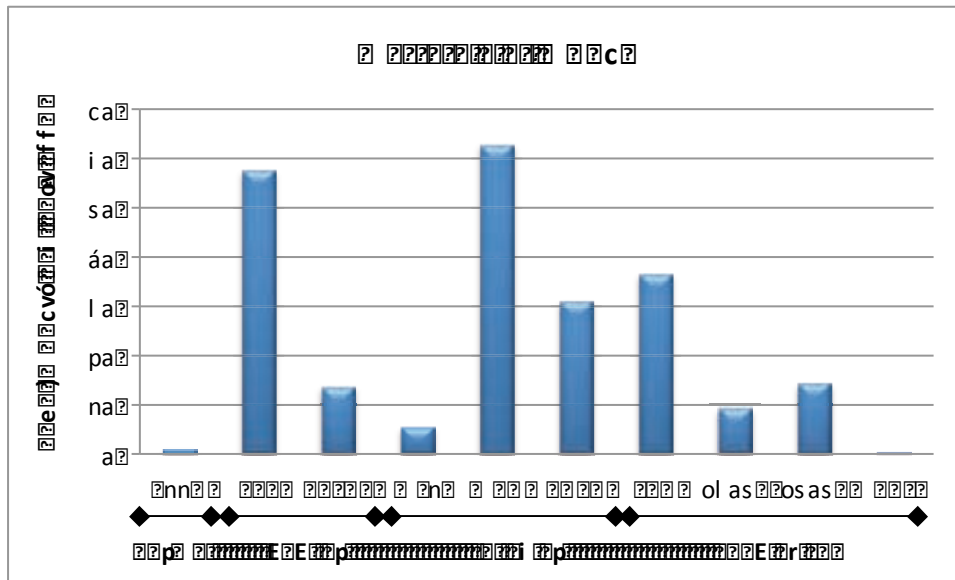


Figura 20. Cuantificación de la proteína WDR3 en líneas celulares de cáncer de tiroides relativa a las células normales S11N.

En resumen, el incremento de la expresión de *WDR3* en las líneas celulares de cáncer de tiroides comparado con la expresión en las células normales de tiroides, tanto a nivel del mRNA como de la proteína WDR3, sugieren que este gen se encuentra sobre-expresado en el cáncer de tiroides por lo que podría estar implicado en la carcinogénesis de la tiroides.

1.2-EXPRESIÓN DE *WDR3* EN TEJIDOS DE TIROIDES

Dada la sobre-expresión del gen *WDR3* en líneas celulares de cáncer de tiroides nos propusimos analizar la expresión de este gen a nivel transcripcional en tejido de tiroides. Se analizó la expresión de *WDR3* mediante qPCR en 24 muestras de tejido de tiroides provenientes del *Banc de Tumors de Catalunya*, que se corresponden con 12 parejas de tejido de tiroides normal y tumoral del mismo individuo. Seis de las parejas corresponden a pacientes con carcinoma papilar de tiroides (PTC), dos parejas a

carcinoma folicular de tiroides (FTC), tres a adenoma folicular de tiroides (Ad) y una a carcinoma medular de tiroides (MTC).

Para la cuantificación del mRNA de *WDR3* por qPCR se amplificó la misma región analizada en las líneas celulares de cáncer de tiroides, es decir, 209 bp que se encuentran en los exones 3 y 4 del gen *WDR3*. La cuantificación de la expresión de *WDR3* relativa a la expresión del gen control *RPL27* se realizó según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los resultados están expresados en unidades arbitrarias (AU) y se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Expresión de *WDR3* a nivel de mRNA en tejidos normal (N) y tumoral (T) de tiroides.

Muestra	tipo	tejido	Expresión relativa (AU)	Ratio [T/N]
P 02	MTC	N	48,97	0,71
		T	34,87	
P 03	PTC	N	26,43	3,60
		T	95,26	
P 05	FTC	N	16,84	1,53
		T	25,70	
P 06	FTC	N	146,41	1,97
		T	288,79	
P 07	PTC	N	10,58	3,20
		T	33,92	
P 09	PTC	N	21,17	1,91
		T	40,33	
P 10	PTC	N	207,05	1,80
		T	373,21	
P 11	PTC	N	--	--
		T	28,92	
P 27	PTC	N	0,33	40,88
		T	13,49	
P 31	Ad	N	79,55	1,62
		T	129,24	
P 32	Ad	N	2,35	30,94
		T	72,70	
P 36	Ad	N	17,08	9,12
		T	155,83	

Todas las muestras de tejido tumoral de tiroides analizadas, derivadas de las células foliculares (PTC, FTC y adenomas), muestran sobre-expresión del gen *WDR3* con

RESULTADOS

respecto a su correspondiente tejido normal (se excluye la muestra 11 ya que no se obtuvieron datos de amplificación del tejido normal). Hay que destacar que la muestra 2 que corresponde a un paciente con MTC (origen en las células parafoliculares), muestra una expresión de *WDR3* menor en el tejido tumoral que en el normal.

La mediana de la expresión relativa de *WDR3* en las 10 parejas de muestras derivadas de células foliculares es de 19,1 en el tejido normal y de 72,7 en el tejido tumoral. Esta diferencia entre tejido normal y tumoral de tiroides es estadísticamente significativa (test de Wilcoxon, $p = 0,002$) y se representa en la **Figura 21**.

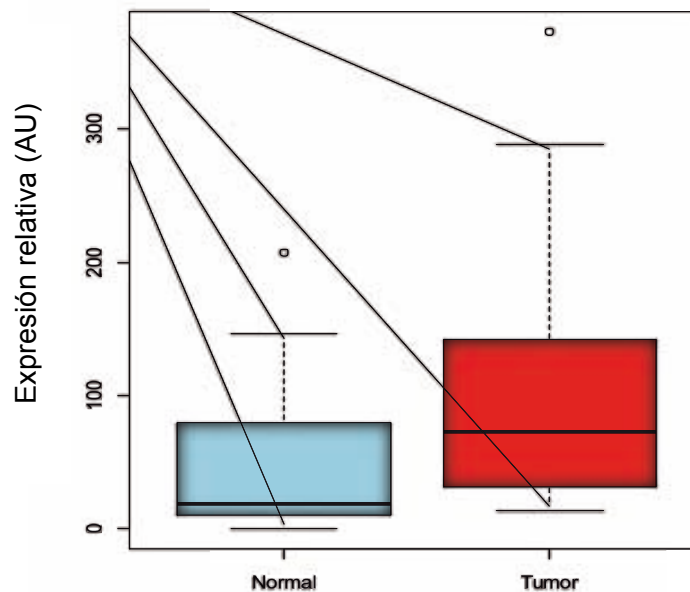


Figura 21. Expresión relativa de *WDR3* analizada por qPCR en las parejas de tejido normal/tumor de tiroides ($p = 0,002$).

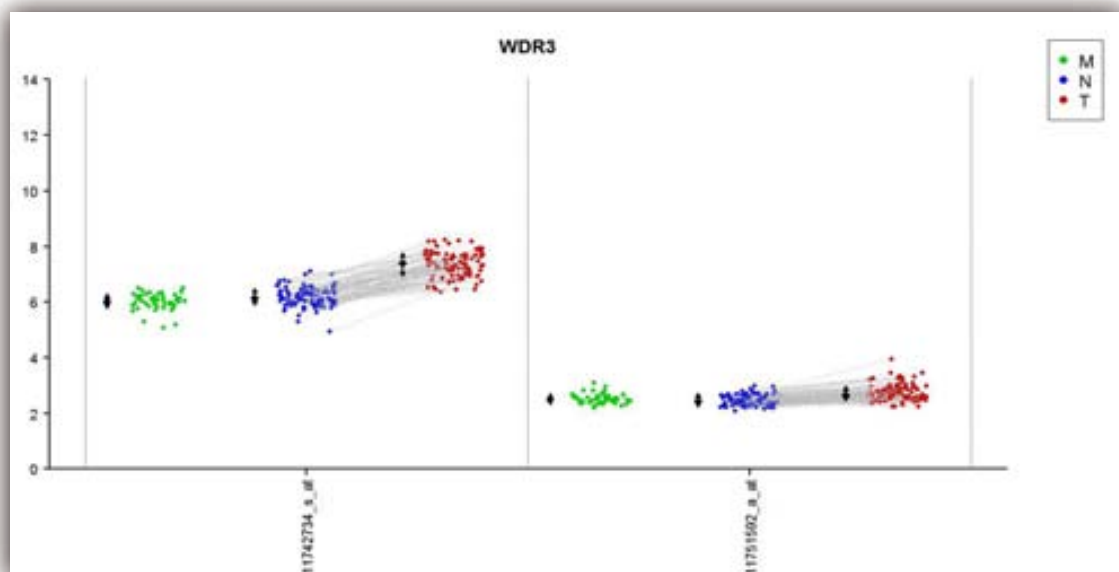
1.3-EXPRESIÓN DE *WDR3* EN TEJIDOS DE COLON

La implicación del gen *WDR3* en la biogénesis de los ribosomas (McMahon *et al.*, 2010) y la relación de este proceso con el crecimiento y la proliferación celular nos lleva a pensar que *WDR3* podría estar involucrado en la tumorigénesis en general.

El estudio de la expresión del gen *WDR3* en tejidos de colon fue llevado a cabo en colaboración con el Dr. Victor Moreno del *Institut Català d'Oncologia*. En este centro integral del cáncer se está llevando a cabo un proyecto que tiene como objetivo la detección y validación de genes candidatos como potenciales marcadores para el diagnóstico de cáncer de colon. Brevemente, este proyecto comprende la detección de genes diferencialmente expresados en el cáncer de colon mediante el *array Affymetrix® Human Genome U219 Array Plate* (Affymetrix) y la posterior validación de los resultados de la primera fase mediante qPCR.

En la primera fase del proyecto se analizaron más de 530 000 sondas correspondientes a más de 36 000 transcritos, los cuales representan más de 20 000 genes mapeados a través de las anotaciones UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/>) o RefSeq (www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/). Dos de estas sondas corresponden al gen *WDR3*, 11742734_s_at que se encuentra en la región 3' del mRNA de *WDR3* y 11751592_s_at que se ubica en la región 5' del mRNA de *WDR3*. Este análisis se llevó a cabo en 98 muestras de tumores de colon pareadas con sus respectivos tejidos normales de colon y 50 muestras de mucosa de colon de personas sanas.

En la **Figura 22** se observa que ambas sondas detectan un incremento de la expresión de *WDR3* en las muestras de tumor, comparadas con las muestras de mucosa normal de colon ($p = 3,3 \times 10^{-54}$ para la sonda 11742734_s_at y $p = 4,9 \times 10^{-7}$ para la sonda 11751592_s_at).



RESULTADOS

Figura 22. Expresión de *WDR3* en tejidos de colon examinada utilizando *Affymetrix Human Genome U219 Array Plate*.

El interés de estos resultados preliminares indujo a su validación, incluyendo el gen *WDR3* en la segunda fase del proyecto, es decir, en la validación de los genes que mostraron expresión diferencial en tumor en la primera fase del estudio del transcriptoma de cáncer colon.

La validación de los genes seleccionados se realizó mediante qPCR utilizando la matriz *96.96 Dynamic Array™ IFCs* en el sistema *BioMark™ System* (Fluidigm). El gen control utilizado como referencia es *ACTB*. Para ello, se analizaron 99 muestras de tumores de colon, 101 muestras de tejido normal de colon de pacientes con cáncer y 53 muestras de mucosa de colon de individuos sanos, provenientes del *Institut Català d'Oncologia*.

El análisis se realizó a partir de la amplificación de la misma región de 209 bp comprendida en los exones 3 y 4 del gen *WDR3* analizada en las células y tejidos de tiroides. La cuantificación de la expresión de *WDR3* relativa a la expresión del gen control *ACTB* se realizó según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). En la **Figura 23** se representa la expresión relativa de *WDR3*, en unidades arbitrarias, en cada uno de los grupos muestrales, mucosa normal de personas sanas, tejido normal y tejido tumoral de pacientes.

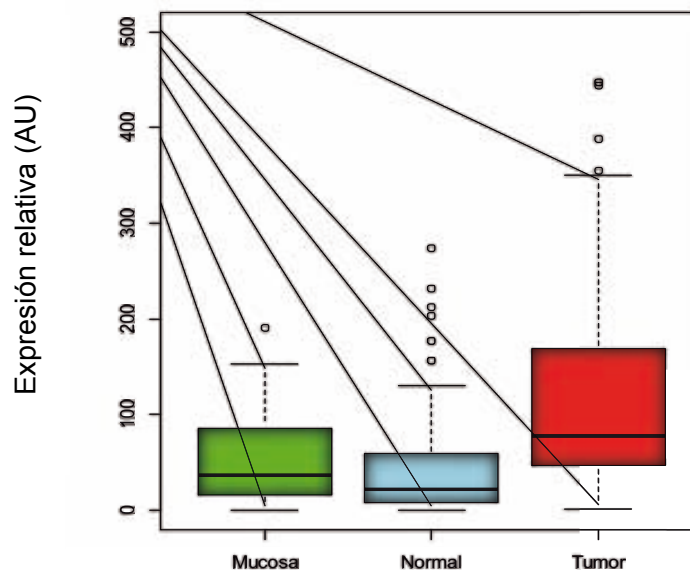


Figura 23. Niveles de expresión de *WDR3* en muestras de mucosa de colon de individuos sanos (Mucosa), tejido normal de colon de pacientes (Normal) y tejido tumoral de colon (Tumor) analizados por qPCR.

El valor de mediana para las muestras de mucosa de colon de individuos sanos es 73,8; para las muestras de tejido normal de pacientes es 42,5 y para las muestras de tejido tumoral de colon es 155,5. Los resultados obtenidos muestran que *WDR3* está claramente sobre-expresado en el tejido tumoral de colon comparado con el tejido normal de colon de los pacientes (test de Kruskal Wallis, $p < 0,0001$) y comparado con la mucosa de colon de individuos sanos (test de Kruskal Wallis, $p = 0,0003$). No se observaron diferencias significativas de expresión de *WDR3* al comparar las muestras de tejido normal de pacientes con la mucosa normal (test de Kruskal Wallis, $p = 0,148$).

A continuación se estudió si existe una relación de la expresión de *WDR3* en los diferentes tipos de tejido de colon con respecto al género y la edad de los pacientes analizados. No se observaron diferencias en la expresión de *WDR3* entre géneros para ninguno de los tejidos de colon, así como tampoco encontramos una influencia de la edad de los pacientes en la expresión de *WDR3*.

Entre las muestras analizadas se encuentran 92 muestras de tejido tumoral y su correspondiente tejido normal, obtenidas del mismo paciente. El valor de mediana de la expresión relativa de *WDR3* en unidades arbitrarias en el tejido normal es de 17,7 y en el tejido tumoral es de 72,5. Las diferencias encontradas entre los dos tipos de tejido son estadísticamente significativas (test de Wilcoxon, $p = 4,4 \times 10^{-12}$).

En resumen, el gen *WDR3* se encuentra sobre-expresado en el cáncer de colon y esta sobre-expresión no parece estar afectada por el género y la edad de los pacientes.

2-REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *WDR3*

Las diferencias observadas en los niveles de expresión del mRNA del gen *WDR3*, tanto en las líneas celulares y tejidos de tiroides como en los tejidos de colon, indican la existencia de mecanismos de regulación de la transcripción génica que modulan la expresión de *WDR3* de manera que se encuentra sobre-expresado en el cáncer de

RESULTADOS

tiroides y de colon en comparación con su expresión en las células y tejidos normales. Por lo tanto, nos propusimos estudiar los posibles mecanismos de regulación de la expresión de *WDR3*.

2.1-METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *WDR3*

El gen *WDR3* presenta en su extremo 5' una región de alta densidad de sitios CpG. Esta isla CpG tiene una longitud de 880 bp (chr1: 118 471 841 – 118 472 720) y abarca un total de 73 sitios CpG. Es por ello que decidimos estudiar el grado de metilación de su región promotora.

2.1.1-Metilación del promotor de *WDR3* en líneas celulares

El grado de metilación de la región 5' del gen *WDR3* fue analizado mediante la técnica *bisulphite sequencing* en DNA extraído de las líneas celulares TPC-1 y B-CPAP de cáncer de tiroides papilar (PTC); WRO y CGTH-W-1 de cáncer de tiroides folicular (FTC); FRO y 8305C de cáncer de tiroides anaplásico (ATC); HeLa, como referencia tumoral no tiroidea y Nthy-ori 3-1, derivada de tejido normal de tiroides, se utilizó como referencia tiroidea no tumoral. Además, se incluyó DNA extraído de sangre periférica de una persona sin patologías de tiroides (SP).

Para este análisis se amplificaron por PCR cuatro fragmentos de la isla CpG de 880 bp del promotor de *WDR3*. Así, mediante el *software* MethPrimer (Li y Dahiya, 2002), se diseñaron pares de cebadores que nos definen los cuatro fragmentos: wA1, wA2, wB1 y wB2. En la **Figura 24** se muestra la posición relativa de estos fragmentos y en la **Tabla 14** se especifican el tamaño y el número de sitios CpG que contiene cada fragmento.

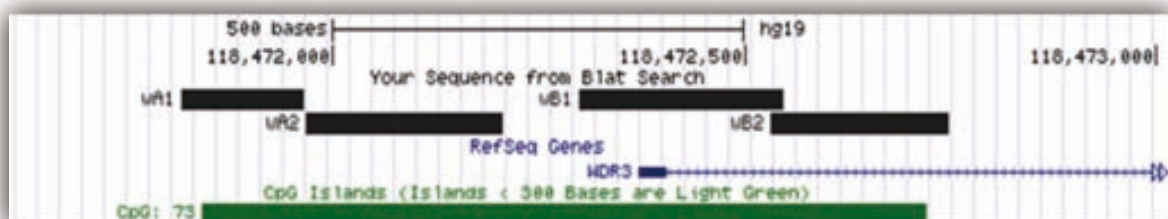


Figura 24. Isla CpG del promotor de *WDR3*. Se indica la posición relativa de los fragmentos wA1, wA2, wB1 y wB2 amplificados por PCR en el análisis por *bisulphite sequencing* (barras en negro). En azul se muestra el sitio de inicio de la transcripción del gen *WDR3* y en verde la localización de la isla CpG (<http://genome.ucsc.edu/>).

Tabla 14. Fragmentos de DNA amplificados por PCR para el análisis de la metilación por *bisulfite sequencing* de la región promotora del gen *WDR3*.

Región	Coordenadas genómicas	Longitud (bp)	Sitios CpG
wA1	118 471 815 – 118 471 963	149	11
wA2	118 471 968 – 118 472 205	238	25
wB1	118 472 300 – 118 472 547	248	17
wB2	118 472 532 – 118 472 749	218	14

El estado de metilación de los sitios CpG de cada una de las regiones amplificadas por PCR, revelado por la secuenciación después de la modificación del DNA genómico con bisulfito sódico, se muestra en la **Figura 25**. La semicuantificación del grado de metilación de los sitios CpG se realizó según el método descrito por Jiang *et al.* (2010), basado en la medición de la altura de los dobles picos observados en los electroferogramas de las secuenciaciones.

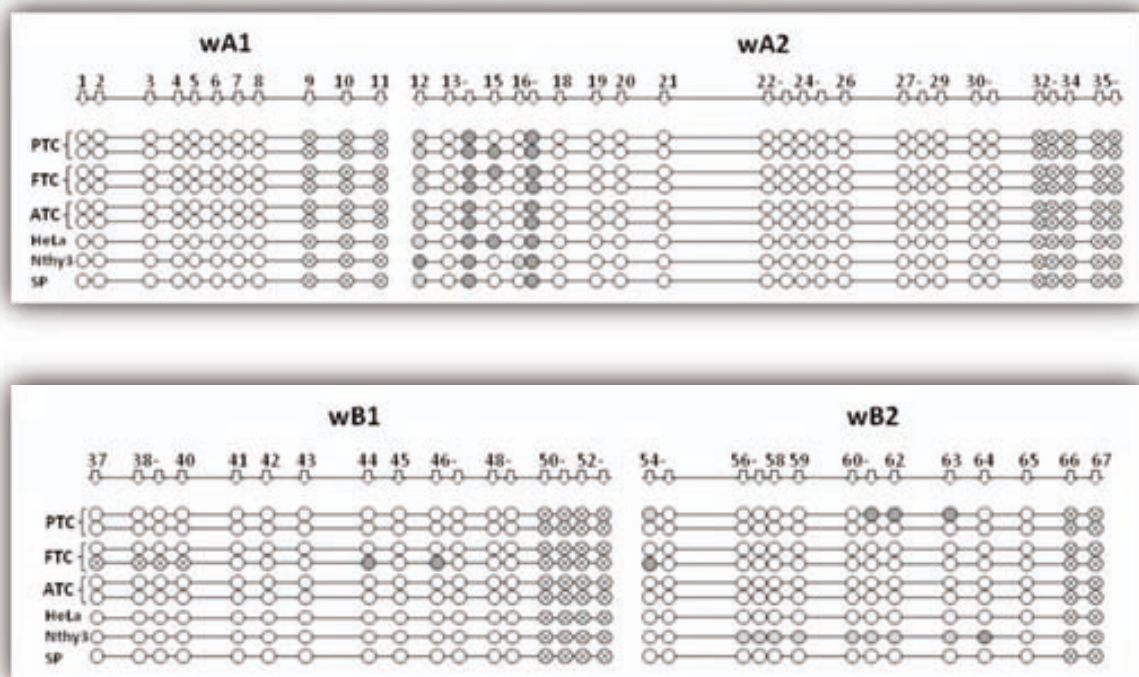


Figura 25. Metilación del promotor de *WDR3* en células humanas. Los sitios CpG de la región analizada se numeran de forma consecutiva (1-67) en los cuatro fragmentos secuenciados (wA1, wA2, wB1 y wB2) y se corresponden con un círculo: ○ no metilado; ◐ 25% de metilación; ◑ 50% de metilación; ⊗ sin datos. PTC: carcinoma papilar de tiroides; FTC: carcinoma folicular de tiroides; ATC: carcinoma anaplásico de tiroides; SP: DNA extraído de sangre periférica.

RESULTADOS

Como se observa en la **Figura 25**, en general, la región promotora del gen *WDR3* se encuentra no metilada en las líneas celulares analizadas. Solamente los sitios CpG 12, 14 y 17 (en wA2) se muestran parcialmente metilados (25-50%) en todos los tipos celulares, y la línea celular Nthy-ori 3-1 muestra, además, metilación parcial en los sitios CpG 56 a 64 (25-50%).

En resumen, las líneas celulares de cáncer de tiroides muestran una hipometilación generalizada de la región promotora de *WDR3*.

El estado de no metilación del promotor del gen *WDR3* en las líneas celulares de cáncer de tiroides sugiere que la sobre-expresión observada en cáncer a nivel de mRNA podría estar asociada a la hipometilación de *WDR3*. Es por ello que decidimos realizar un análisis de la metilación en tejidos normales y tumorales de tiroides para poder establecer si la metilación del promotor de *WDR3* es un factor importante en la carcinogénesis de la glándula tiroides.

2.1.2-Cuantificación de la metilación del promotor de *WDR3* en tejidos de tiroides

La cuantificación del grado de metilación de la región promotora del gen *WDR3* se realizó utilizando la tecnología MassARRAY EpiTYPER (Sequenom, Inc.) en muestras normales y tumorales de tejido de tiroides. Se analizaron 60 muestras de DNA extraído de biopsias de tejido normal y tumoral de tiroides de 35 pacientes con diagnóstico de cáncer de tiroides del *Banc de Tumors de Catalunya*. Las biopsias corresponden a 25 parejas de tejido tumoral con su correspondiente tejido normal de tiroides obtenidos del mismo paciente y 10 muestras de tejido tumoral de pacientes de los que no se dispone de tejido normal.

Previamente al análisis MassARRAY EpiTYPER se realizó un ensayo de predicción *in silico* en el promotor de *WDR3* para seleccionar las regiones sensibles a este análisis que serán más informativas acerca del estado de metilación de los diferentes sitios CpG (ver Materiales y Métodos). Por cuestiones didácticas, se presentarán solamente los resultados de la reacción de escisión en T, ya que en regiones del DNA ricas en CpG

esta reacción es más informativa que la reacción de escisión en C, debido a que en esta última se generan una gran cantidad de fragmentos pequeños que no pueden ser analizados.

Como se ha mencionado anteriormente, la región 5' del gen *WDR3* presenta una isla CpG de 880 bp que comprende 73 sitios CpG. En el análisis *in silico* se estudiaron distintos fragmentos de la región rica en CpGs y se obtuvieron dos regiones del promotor de *WDR3* para el análisis MassARRAY EpiTYPER: WDR3-1 y WDR3-2. La región WDR3-1 comprende un total de 453 bp (chr1: 118 471 539 – 118 471 991) abarcando 24 sitios CpG; y la región WDR3-2 comprende un fragmento de 333 bp (chr1: 118 472 299 – 118 472 631) abarcando 23 sitios CpG (**Figura 26**).

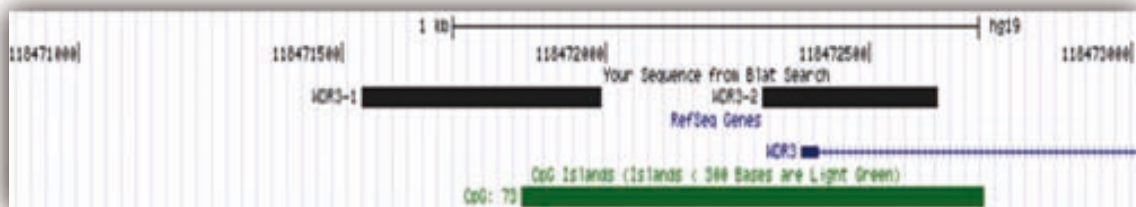


Figura 26. Localización de las regiones en el promotor del gen *WDR3* definidas por el análisis *in silico* para ser estudiadas por MassARRAY EpiTYPER. Las regiones WDR3-1 y WDR3-2 se indican con barras negras. En azul se muestra el sitio de inicio de la transcripción del gen *WDR3* y en verde la localización de la isla CpG (<http://genome.ucsc.edu/>).

La secuencia de la región WDR3-1 destacando los sitios CpG y los fragmentos resultantes de la digestión y análisis por espectrometría de masas obtenidos *in silico* se muestran en la **Figura 27·A**. En la reacción de escisión en T para ambas cadenas (+ y –), 21 de los 24 sitios CpG totales dan información del estado de metilación (comprendidos en los fragmentos azules). Estos sitios informativos quedan incluidos en diez fragmentos que contienen un sitio CpG individual y cinco fragmentos que comprenden dos o tres sitios CpG. Los sitios CpG 2, 9 y 10 no dan información del estado de metilación debido a que el peso molecular de los fragmentos que los contienen se encuentra fuera del rango de análisis (fragmentos grises) (1700-7000 Da).

En la **Figura 27·B** se muestra la secuencia de la región WDR3-2 y la digestión y análisis por espectrometría de masas *in silico* de esta región. En la reacción de escisión

RESULTADOS

en T para ambas cadenas (+ y -), 21 de los 23 sitios CpG totales dan información del estado de metilación. Estos sitios CpG se encuentran en once fragmentos que contienen un sitio CpG individual y tres fragmentos con dos o tres sitios CpG. Los sitios CpG 3 y 14 se encuentran en fragmentos no analizables. Además, los fragmentos que contienen los sitios 2 y 7 coinciden en su peso molecular, al igual que los fragmentos que contienen los sitios 12-13 y 15-16 (indicados con flechas de color gris).

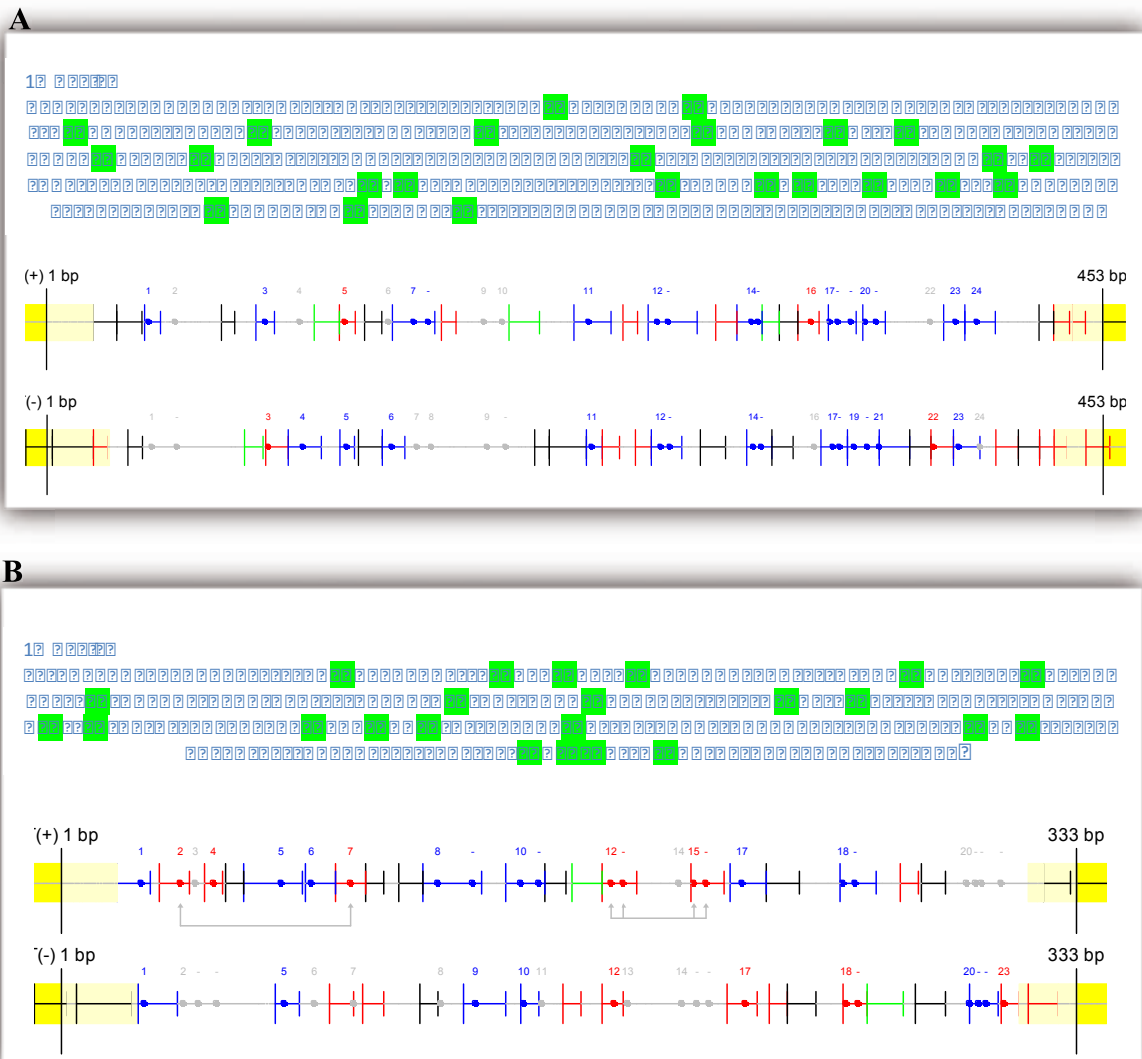
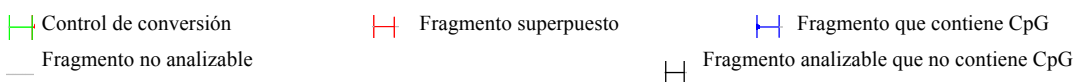


Figura 27. Análisis *in silico* de las regiones WDR3-1 (A) y WDR3-2 (B). Se muestran las secuencias de las regiones analizadas con los sitios CpG resaltados y los perfiles de fragmentación para las reacciones de escisión en T en ambas cadenas (+ y -). Los dinucleótidos CpG están numerados y clasificados por color de acuerdo a su capacidad de ser analizados. En gris se muestran los sitios CpG ubicados en fragmentos cuyo peso molecular se encuentra fuera del rango analizable; en rojo se indican los sitios CpG analizables con superposición del peso molecular de los fragmentos y en azul los sitios CpG analizables.



Las regiones WDR3-1 y WDR3-2 fueron analizadas por MassARRAY EpiTYPER produciendo un total de 26 unidades CpG. Cada unidad CpG muestra un único valor de metilación independiente del número de sitios CpG contenidos en la misma. Así, 16 de estas unidades contienen un solo sitio CpG, 9 unidades contienen dos sitios CpG y 1 unidad contiene tres sitios CpG individuales. La mayor parte de estas unidades CpG coinciden con los fragmentos predichos por el análisis *in silico*.

Para explorar las asociaciones entre las muestras analizadas respecto al grado de metilación relativa de las distintas unidades CpG dentro de las regiones WDR3-1 y WDR-2 y entre ellas, se realizó un análisis jerárquico de grupos no supervisado y el *heatmap* de los resultados de la cuantificación de la metilación de las 25 muestras de tejido normal y 35 muestras de tejido tumoral de tiroides en las 26 unidades CpG. Los resultados se muestran en la **Figura 28** donde se observa que todas las muestras se caracterizan por niveles muy bajos de metilación (<18%). La formación de grupos no supervisados en el gen *WDR3* agrupó las muestras en distintos conjuntos sin una clara definición. Los grupos formados no diferencian las muestras normales de las tumorales, ni tampoco definen el tipo de tejido tumoral del cual proceden las mismas. La mayor parte de los grupos incluyen muestras de tejido normal y tumoral de tiroides de distinto origen.

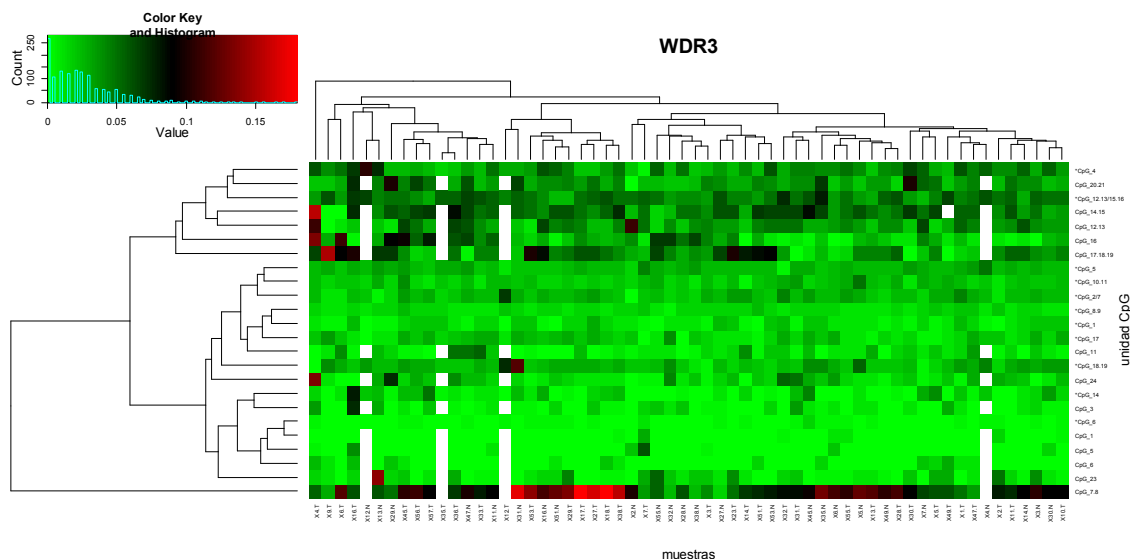


Figura 28. Análisis jerárquico de grupos y *heatmap* del promotor del gen *WDR3*. Análisis de grupos no supervisados de 60 muestras de tejido de tiroides (columnas) y grado de metilación del DNA de 26 unidades CpG (filas) en el promotor del gen *WDR3*. Los valores de la metilación del DNA son representados por una escala de color como se indica en la esquina superior izquierda. En blanco se indican la falta de datos para unidades CpG de muestras concretas.

RESULTADOS

El agrupamiento entre las unidades CpG permite definir claramente tres conjuntos. Uno de los grupos está formado solamente por la unidad CpG 7.8 de la región WDR3-1, la cual muestra los niveles más altos de metilación obtenidos en el promotor de *WDR3* en las muestras en general (parte inferior del *heatmap*). En la parte superior del *heatmap* se define un segundo grupo formado por las unidades CpG 12.13, 14.15, 16, 17.18.19 y 20.21 de la región WDR3-1 y las unidades CpG 4 y 12.13/15.16 de la región WDR3-2 que presentan niveles de metilación intermedios. Las demás unidades CpG están reunidas en un tercer grupo que incluye la mayor parte de las unidades CpG con valores muy bajos de metilación en todos los sitios CpG, ubicado en el centro del *heatmap*.

Los valores de metilación en el tejido normal son similares entre los distintos pacientes analizados (**Figura 29·A**), con valores medios en la región WDR3-1 de 2,7% ($\pm 0,5$) y 2,3% ($\pm 0,4$) en la región WDR3-2, no encontrándose diferencias significativas entre ellos (test de Kruskal-Wallis, $p = 0,9998$ para la región WDR3-1 y $p = 0,8353$ para la región WDR3-2). De la misma forma, el tejido tumoral de tiroides presenta valores similares de metilación entre los pacientes en cada una de las regiones (**Figura 29·B**), sin diferencias significativas entre los mismos (región WDR3-1: media 2,9% $\pm 0,7$; test de Kruskal-Wallis, $p = 0,9972$; región WDR3-2: media 2,2% $\pm 0,4$; test de Kruskal-Wallis, $p = 0,9629$).

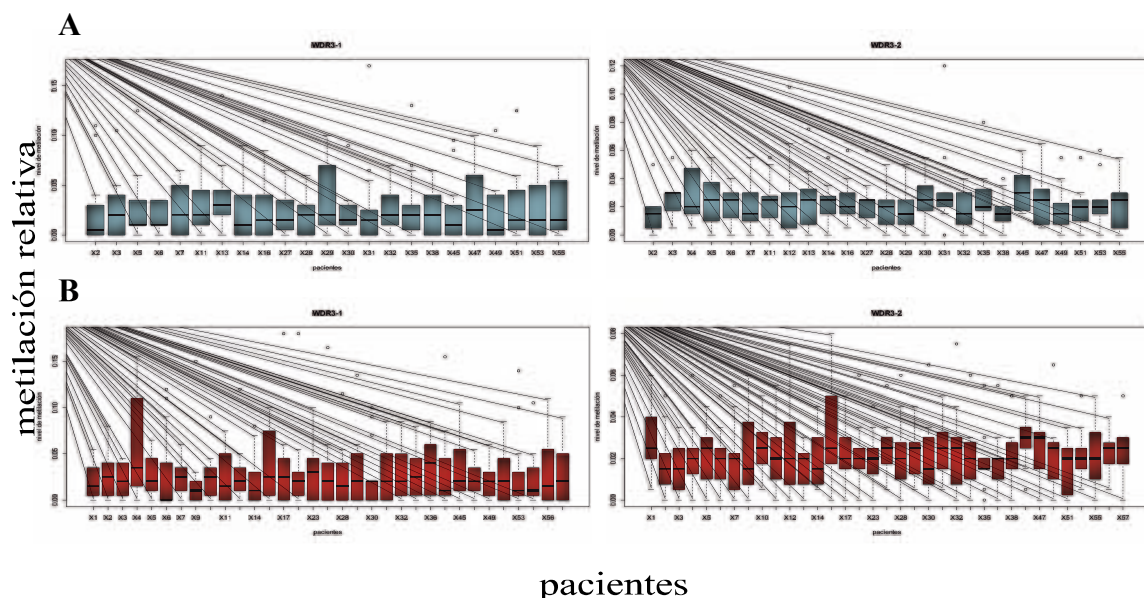


Figura 29. Variación interindividual de la metilación del promotor de *WDR3*. (A) Niveles de metilación en el tejido normal de tiroides (azul) en cada uno de los individuos analizados. (B) Niveles de metilación en el tejido tumoral de tiroides (rojo) en cada individuo para las regiones WDR3-1 (izquierda) y WDR3-2 (derecha).

El valor medio de metilación del promotor del gen *WDR3* en el tejido normal de tiroides es similar al tejido tumoral. En ambos tipos de tejido este valor es inferior al 3%, en concreto, el tejido normal de tiroides presenta un valor medio de metilación del 2,52% y el tejido tumoral de tiroides del 2,58%. Ambos tipos de tejido presentan un valor de mediana del 2% (test de Wilcoxon, $p = 0,715$). En la **Figura 30** se representa la metilación conjunta del promotor de *WDR3* de las muestras de tejido normal y tumoral de tiroides.

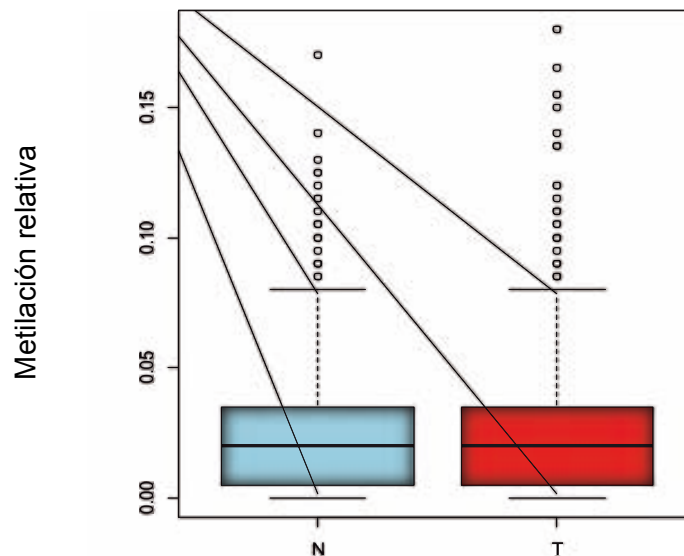


Figura 30. Niveles de metilación del promotor de *WDR3* en tejido de tiroides. Diagrama de cajas del conjunto de valores de metilación de las muestras normales (N) y tumorales (T) de tejido de tiroides ($p = 0,715$).

A pesar de que no se observan diferencias de metilación en el promotor de *WDR3* en las muestras de tejido normal y tumoral, es interesante analizar los niveles de metilación de cada unidad CpG y ver si existen diferencias entre tejido normal y tumoral en unidades CpG específicas. Así, se cuantificó el grado de metilación en las unidades CpG individualmente en el conjunto de muestras de tejido normal y en las muestras de tejido tumoral. En la **Figura 31** se observa variación en los niveles de metilación entre las distintas unidades CpG, aunque no se observan diferencias significativas en el grado de metilación entre las muestras normales y tumorales de la misma unidad CpG (test de Wilcoxon, $p > 0,05$). En resumen, la cuantificación de la metilación en la región 5' del gen *WDR3* indica que los niveles de metilación son muy bajos y que no existen diferencias entre el tejido normal y el tejido tumoral de tiroides.

RESULTADOS

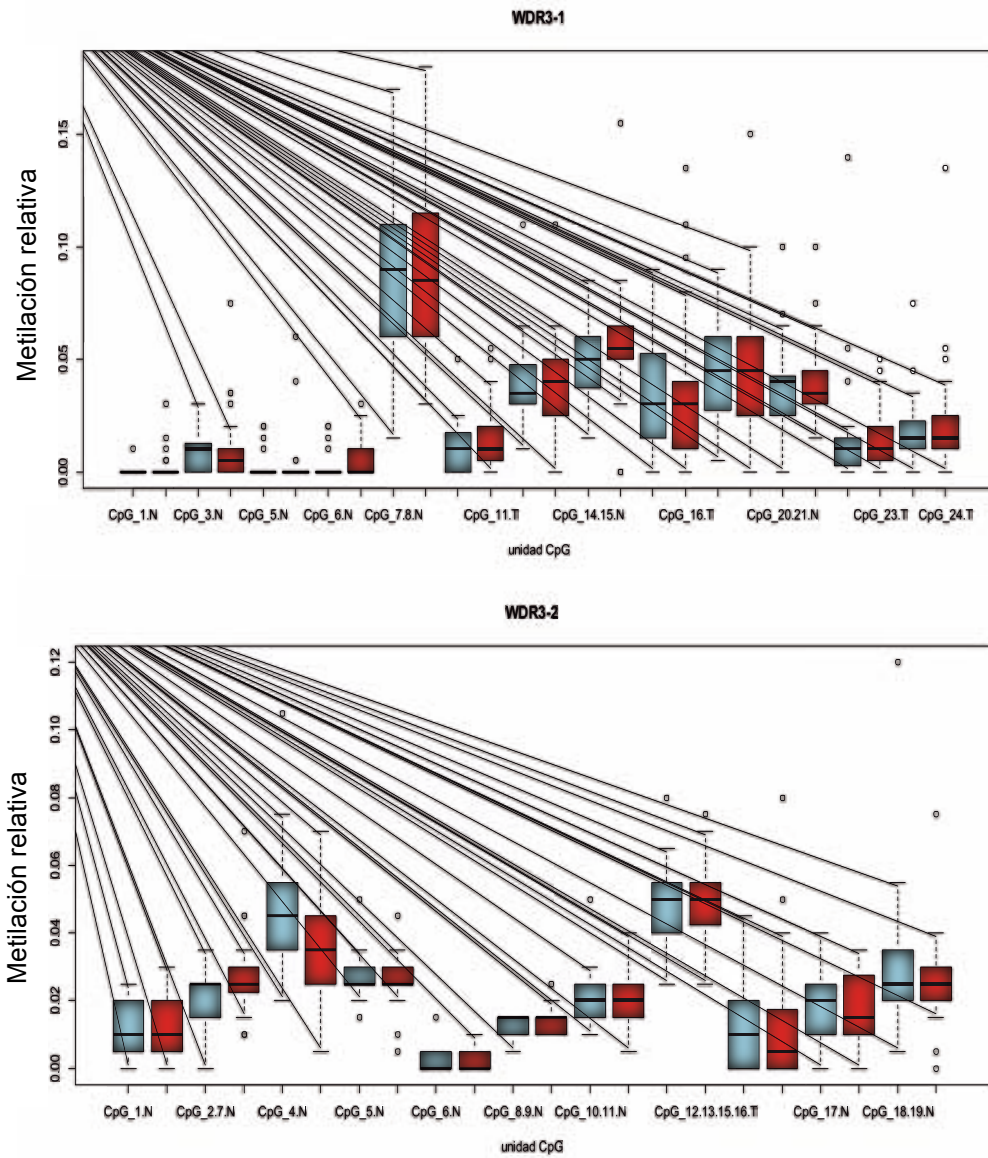


Figura 31. Valores de metilación de las unidades CpG del promotor del gen *WDR3*. Diagrama de cajas de los niveles de metilación del total de individuos en cada unidad CpG para el tejido normal (azul) y tumoral (rojo) de tiroides en las regiones WDR3-1 (arriba) y WDR3-2 (abajo).

2.2-ANÁLISIS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE UNIÓN AL PROMOTOR DE *WDR3*

Como se ha demostrado en el apartado 2.1, la metilación del promotor de *WDR3* no es un mecanismo que regula su expresión. Con el objetivo de aportar más información acerca de la regulación del gen *WDR3*, decidimos investigar posibles factores de transcripción de unión a su región promotora, que puedan modular la expresión de *WDR3*. La regulación de la transcripción mediante factores de transcripción es uno de los mecanismos más importantes en el control de la expresión de genes implicados en la diferenciación, desarrollo y funcionalidad de los tejidos.

2.2.1-Elección de los factores de transcripción a estudiar. Bases de datos

Los factores de transcripción contienen un dominio de unión al DNA que reconoce e interactúa con secuencias específicas del DNA, o motivo. Estos motivos suelen ser cortos y redundantes, por lo que, aunque se identifique el motivo de unión al DNA en determinados factores de transcripción, por lo general, la predicción no es garantía de que el factor de transcripción se una a la región y siempre se requiere determinarlo experimentalmente.

Existen numerosos programas que permiten realizar una búsqueda de potenciales sitios de unión de factores de transcripción. Estos programas utilizan bases de datos de secuencias consenso de unión de factores de transcripción halladas experimentalmente y permiten explorar una secuencia determinada y predecir posibles factores de transcripción que se unen a lo largo de dicha secuencia. Dos de las bases de datos más utilizadas son TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>) (Wingender *et al.*, 2000) y JASPAR (<http://jaspar.genereg.net>) (Sandelin *et al.*, 2004). Por otro lado, el análisis experimental de la unión de factores de transcripción combinando inmunoprecipitación de la cromatina y secuenciación (*ChIP-seq*) ha permitido generar bases de datos que contienen información de sitios de unión de factores de transcripción basados en una aproximación genómica experimental. Esta información está disponible en la *Encyclopedia of DNA elements* (ENCODE, <http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>) (Rosenbloom *et al.*, 2010), para un número limitado de factores de transcripción que requieren la validación experimental concreta. Además,

RESULTADOS

los resultados obtenidos por *ChIP-seq* pueden contener algunos falsos positivos o incluir secuencias que se unieron indirectamente a través de interacciones con otras moléculas.

La búsqueda de los posibles factores de transcripción que se unen a la región promotora del gen *WDR3* se realizó a través de los datos ENCODE. En la **Figura 32** se presenta la información disponible en esta base de datos de los factores de transcripción identificados por *ChIP-seq*, donde se observa que la región promotora que comparten los genes *WDR3* y *GDAP2* permite la unión de múltiples factores de transcripción.

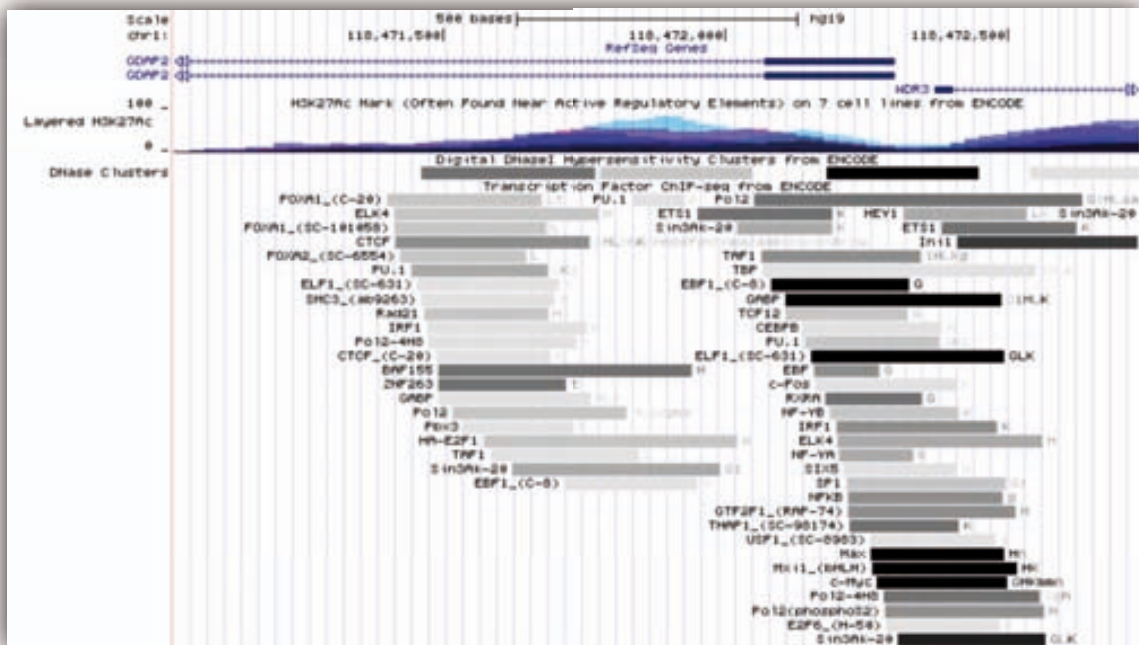


Figura 32. Factores de transcripción identificados por *ChIP-seq* en el promotor del gen *WDR3*. Las cajas de color gris, indican las posiciones de ocupación del factor de transcripción. La intensidad del gris, es proporcional a la señal máxima observada en alguna de las líneas celulares. El nombre a la izquierda de la caja es el factor de transcripción. Las letras a la derecha representan las líneas celulares donde se detectó la señal (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>).

Paralelamente se realizó la búsqueda de más evidencias experimentales acerca de la unión de los factores de transcripción que podrían estar regulando la expresión del gen *WDR3* en la base de datos para elementos reguladores de genes ORegAnno (*Open Regulatory Annotation*) (Montgomery *et al.*, 2006; Griffith *et al.*, 2008). En el promotor

de *WDR3* se ha identificado una región reguladora de 551 bp (chr1: 118 471 446 – 118 471 996), la cual se muestra en la **Figura 33**.

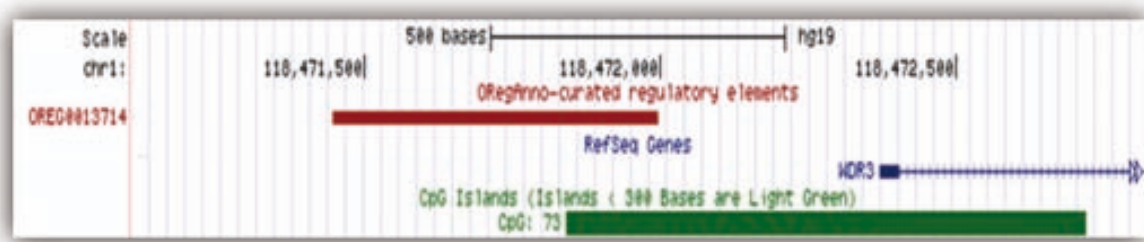


Figura 33. Región reguladora identificada en el promotor de *WDR3*. Se indica en rojo la ubicación de la región identificada y en azul el inicio del gen *WDR3*. (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>).

En esta región reguladora identificada por la base de datos ORegAnno se une el factor de transcripción CTCF (*Transcriptional repressor CTCF*) (Kim *et al.*, 2007). La unión de CTCF en esta región fue identificada mediante *ChIP-on-chip*, una técnica que combina la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) con la tecnología de *microarrays* (chip). Es importante destacar que la región identificada por la base de datos ORegAnno coincide con la región identificada en la base de datos ENCODE para la unión de CTCF.

Por otra parte, se ha demostrado que el factor de transcripción c-Myc induce la expresión de *WDR3* (Schlosser *et al.*, 2003); además, se ha encontrado también que la proteína WDR3 se expresa más en células Rat-1/Myc comparadas con las células Rat-1, sugiriendo que c-Myc podría aumentar la expresión de *WDR3* (McMahon *et al.*, 2010). c-Myc es asimismo, uno de los factores de transcripción identificado por *ChIP-seq* en la base de datos ENCODE.

Así, a partir de la información obtenida en bases de datos y publicaciones, para comenzar con el estudio de la regulación de la transcripción de *WDR3* debida a la unión de factores de transcripción en su región promotora, se optó por estudiar la implicación de los factores de transcripción CTCF y c-Myc en la expresión de *WDR3*.

2.2.2-Presencia de las proteínas CTCF y c-Myc en líneas celulares de tiroides

RESULTADOS

El análisis de las proteínas de CTCF y c-Myc por *western blot* en líneas celulares de tiroides nos indica que las distintas líneas celulares presentan cantidades diferentes de ambas proteínas (**Figura 34**).

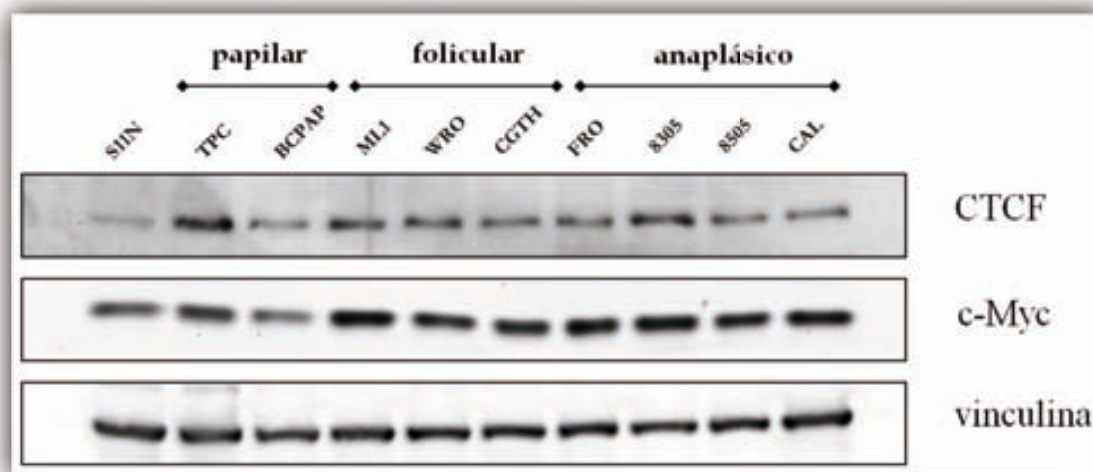


Figura 34. *Western blot* de las proteínas CTCF y c-Myc en líneas celulares de tiroides. La proteína control utilizada es la vinculina.

La cuantificación de la señal obtenida en el *western blot* de las proteínas CTCF y c-Myc en las líneas celulares de tiroides fue cuantificada y comparada con la expresión de *WDR3* a nivel de transcripción con el objetivo de determinar si existe correlación entre ellas. La cantidad de las proteínas CTCF y c-Myc en las líneas celulares derivadas de los diferentes tipos de cáncer de tiroides parece estar correlacionada positivamente con la cantidad de mRNA de *WDR3* (**Figura 35**). Esta correspondencia es evidente en las células derivadas de PTC y ATC. En el caso de las células derivadas de FTC esta correspondencia no es clara.

Estos resultados parecen indicar que los factores de transcripción CTCF y c-Myc podrían estar implicados en la regulación de la expresión de *WDR3*. Sin embargo, es necesario determinar de forma experimental si estos factores juegan un papel en la modulación de la expresión de *WDR3*. Es por ello que nos propusimos estudiar seguidamente el efecto de los factores de transcripción CTCF y c-Myc en la actividad transcripcional del promotor del gen *WDR3* mediante el ensayo de luciferasa.

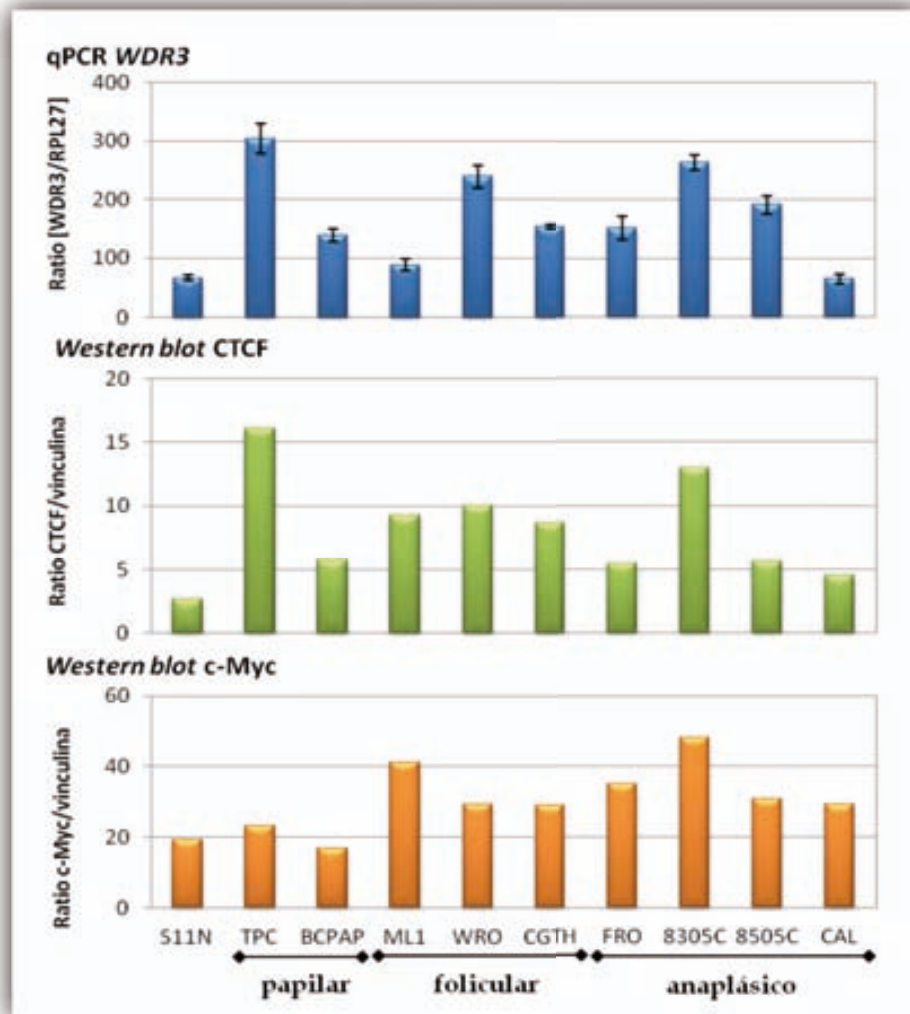


Figura 35. Comparación de la expresión de *WDR3* a nivel de mRNA con la cuantificación de la señal de *western blot* de las proteínas CTCF y c-Myc en líneas celulares de tiroides.

2.2.3-Construcciones plasmídicas

Para analizar la función del promotor de *WDR3* e identificar la región de respuesta a los factores de transcripción CTCF y c-Myc, se clonaron una serie de fragmentos de la región 5' del gen *WDR3* que difieren de forma secuencial en el tamaño. Estos fragmentos se obtuvieron por PCR y digestión enzimática y, posteriormente, se clonaron en el plásmido reportero de luciferasa pGL4 (ver el apartado 12.2 de Materiales y Métodos).

En primer lugar, se obtuvo una construcción plasmídica denominada pGL4-1828 que incluye un fragmento de 1828 bp (-1311/+517-luc), abarcando las regiones de unión de los factores de transcripción CTCF y c-Myc identificadas en la base de datos ENCODE.

RESULTADOS

El fragmento de la región 5' del gen *WDR3*, clonado delante del gen reportero luciferasa *luc2* en el plásmido pGL4, fue el fragmento de referencia para la obtención de los demás fragmentos y construcciones. Las construcciones plasmídicas con deleciones 5' (d5') del fragmento de referencia obtenidas fueron: pGL4-1461-d5' (-944/+517-luc), pGL4-855-d5' (-338/+517-luc) y pGL4-456-d5' (+61/+517-luc). Además se obtuvieron las siguientes construcciones con deleciones 3' (d3'): pGL4-1404-d3' (-1311/+93-luc), pGL4-993-d3' (-1311/-318-luc) y pGL4-687-d3' (-1311/-624-luc). En todas las construcciones se confirmó por secuenciación la incorporación de cada fragmento en el plásmido pGL4. Un esquema de las construcciones obtenidas se muestra en la **Figura 36**. Estos plásmidos se utilizaron para analizar la actividad del promotor de *WDR3* mediante el ensayo de luciferasa. El plásmido pGL4-Ø se utilizó para conocer la expresión basal del gen luciferasa *luc2*.

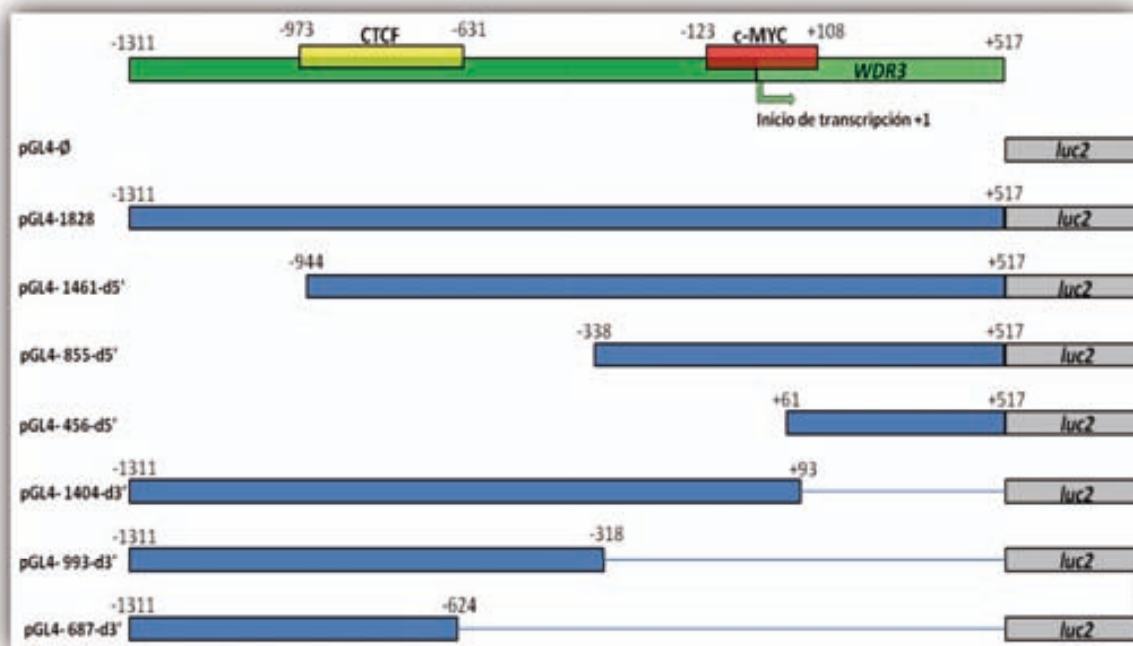


Figura 36. Esquema a escala de los fragmentos del promotor de *WDR3* en cada clon pGL4. En la parte superior se muestran la región 5' del gen *WDR3* (-1311 a +517) y las regiones de unión de los factores de transcripción CTCF y c-MYC de acuerdo a los datos ENCODE.

2.2.4-Análisis de la actividad promotora de la región 5' de *WDR3*

Para conocer la función del promotor de *WDR3* y evaluar su efecto sobre la expresión del gen reportero luciferasa *luc2*, se transfectaron células U2OS con las construcciones mencionadas en el apartado anterior. Asimismo, para normalizar la eficiencia de las transfecciones las células fueron co-transfectadas con el vector reportero control pRL-SV40 que contiene el gen *hRluc*. Los resultados del ensayo dual de luciferasa para las co-transfecciones de los plásmidos con los fragmentos 5' del promotor de *WDR3* se expresan en unidades de luz relativas *luc2/hRluc* y se muestran en la **Figura 37**.

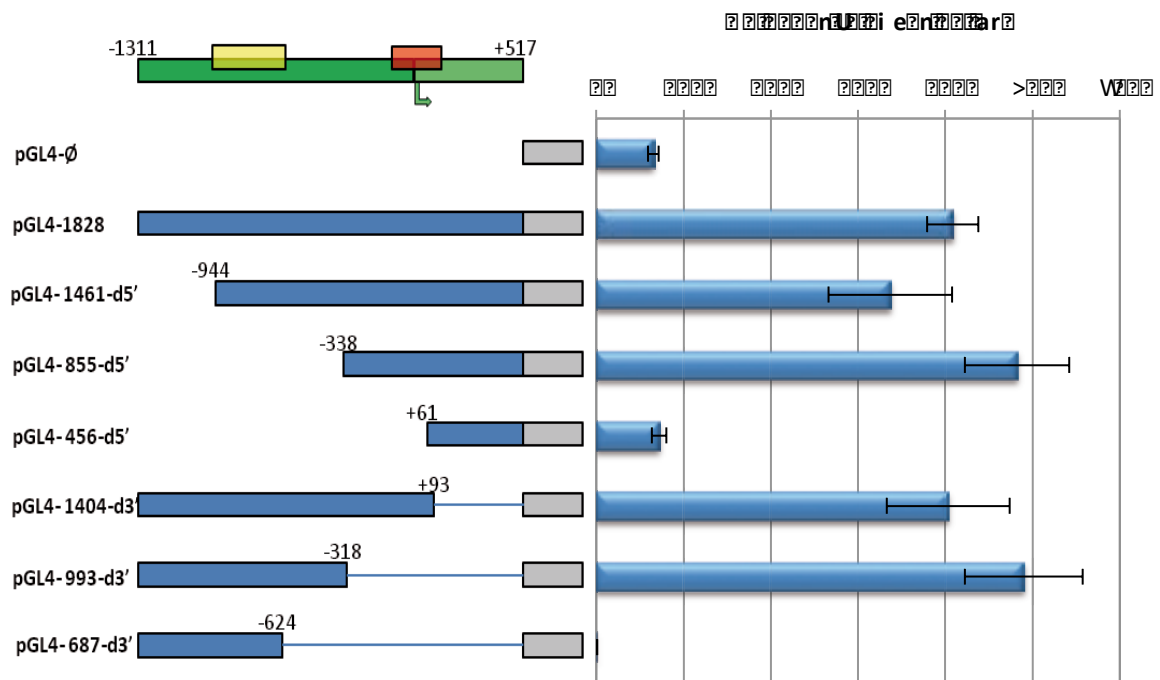


Figura 37. Actividad del promotor de *WDR3*. Las barras representan el valor medio y el error estándar de al menos cinco experimentos independientes.

La actividad luciferasa observada en la transfección con el vector pGL4-Ø muestra el nivel basal de luz relativa debido al promotor mínimo que forma parte del vector pGL4. Esta actividad basal es aumentada significativamente por la transfección con la construcción pGL4-1828 (test t-Student, $p = 5,5 \times 10^{-11}$) y se mantiene elevada con las transfecciones de las construcciones con deleciones 5' pGL4-1461-d5' y pGL4-855-d5'. La actividad luciferasa de la construcción pGL4-1828 no es significativamente diferente a la actividad luciferasa de las construcciones pGL4-1461-d5' y pGL4-855-d5' (test t-Student, $p = 0,35$ y $p = 0,26$; respectivamente). La transfección del plásmido pGL4-456-d5' presenta valores de actividad luciferasa relativa similares al vector vacío (test t-

RESULTADOS

Student, $p = 0,53$). Con respecto a las construcciones con delecciones 3', la transfección con el plásmido pGL4-1404-d3' muestra una recuperación de la actividad luciferasa basal (test t-Student, $p = 3,1 \times 10^{-5}$), la cual se mantiene también elevada con el plásmido pGL4-993-d3' (test t-Student, $p = 0,38$). Por otra parte, la transfección con el vector pGL4-687-d3' muestra una disminución significativa de la actividad luciferasa relativa con respecto al vector pGL4 vacío (test t-Student, $p = 1,1 \times 10^{-7}$).

Los resultados obtenidos en este análisis funcional y estructural del promotor de *WDR3* indican que la región comprendida entre las bases -624 y $+61$ contiene los elementos funcionales necesarios para la expresión de *WDR3*. Más precisamente, podría tratarse de dos regiones independientes, una de ellas ubicada entre las posiciones -624 y -318 , y la otra, entre las posiciones -328 y $+61$. Además, la región comprendida entre las posiciones -1311 y -624 podría presentar elementos que inhiben la expresión de *WDR3*.

2.2.5-Efecto de c-Myc y CTCF en el promotor de *WDR3*

Seguidamente, evaluamos la actividad transcripcional del promotor del gen *WDR3* mediante el ensayo dual de luciferasa para la co-transfección de la construcción de referencia pGL4-1828 con los vectores de expresión de los factores de transcripción c-Myc (pMX-c-Myc) y CTCF (pCi-CTCF) en la línea celular U2OS. El ensayo dual de luciferasa de estas co-transfecciones revela que la actividad del promotor es aumentada por la co-transfección con el vector de expresión del factor de transcripción c-Myc y reprimida por la co-transfección con el vector de expresión del factor de transcripción CTCF (**Figura 38**).

La diferencia observada en la actividad luciferasa de la co-transfección con el vector de expresión de c-Myc es estadísticamente significativa (test t-Student, $p = 0,035$); por otro lado, la co-transfección con el vector de expresión de CTCF muestra una significación estadística marginal (test t-Student, $p = 0,071$). Por otra parte, no se observan diferencias significativas en la co-transfección del vector pGL4 vacío con y sin los vectores de expresión de c-Myc y CTCF (test t-Student, $p = 0,595$ y $p = 0,175$; respectivamente).

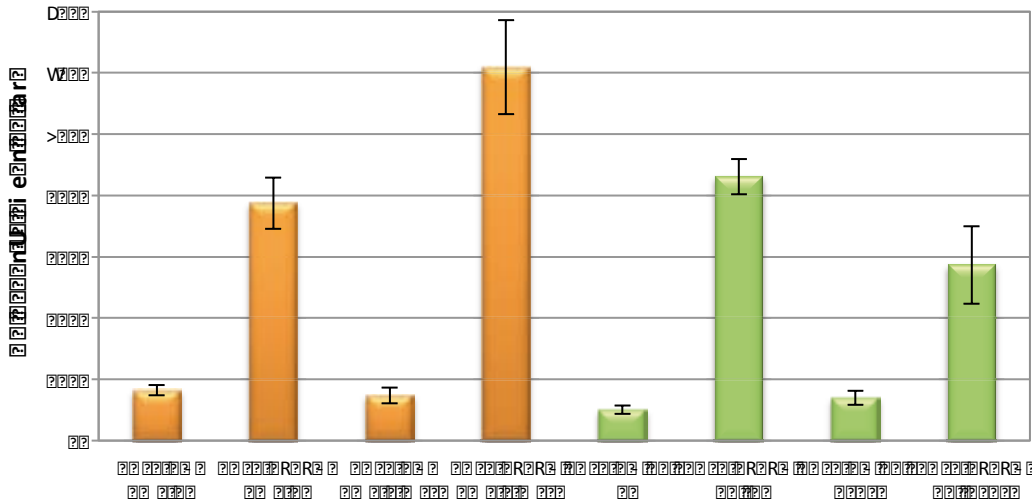
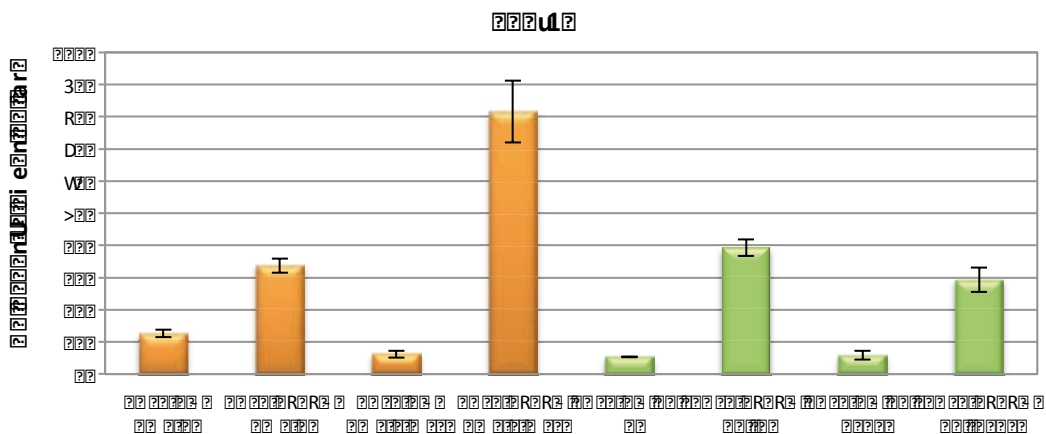


Figura 38. Actividad del promotor de *WDR3* evaluada por el ensayo de luciferasa. A la izquierda, co-transfección con el vector de expresión de c-Myc y a la derecha, con el vector de expresión de CTCF. Las barras representan el valor medio y el error estándar de cinco experimentos independientes.

La actividad del promotor de *WDR3* y su respuesta a la co-transfección con los vectores de expresión de los factores de transcripción de c-Myc y CTCF fue también evaluada en las líneas celulares TPC-1 de cáncer de tiroides y HCT116 de cáncer de colon. El ensayo de luciferasa muestra que el promotor de *WDR3* tiene un comportamiento similar en las líneas celulares evaluadas para las co-transfecciones con ambos factores de transcripción. Se observa un aumento de la actividad del promotor al co-transfectarlo con el vector de c-Myc y una disminución de esta actividad en la co-transfección con CTCF (**Figura 39**).



RESULTADOS

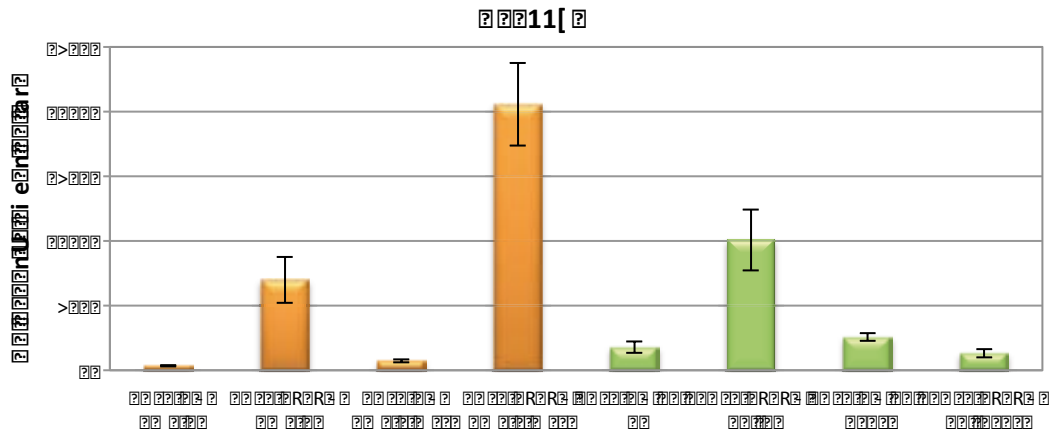


Figura 39. Actividad del promotor de *WDR3* evaluada por el ensayo de luciferasa en las líneas celulares TPC-1 y HCT116. A la izquierda, se muestra la co-transfección con el vector de expresión de c-Myc y a la derecha con el vector de expresión de CTCF. Las barras representan los valores obtenidos en un mínimo de dos experimentos independientes.

Seguidamente, se co-transfectaron los vectores de expresión de los factores de transcripción CTCF y c-Myc con los plásmidos que portan los fragmentos de la región 5' de *WDR3*. El ensayo de luciferasa muestra que el vector de expresión de c-Myc duplica la actividad luciferasa relativa en las co-transfecciones con los plásmidos pGL4-1828, pGL4-1461-d5' y pGL4-855-d5'. En la co-transfección con el plásmido pGL4-456-d5' el incremento de la actividad luciferasa es de 1,3 veces. Con los demás plásmidos, la co-transfección con el vector de expresión de c-Myc parece no afectar la actividad luciferasa (**Figura 40**).

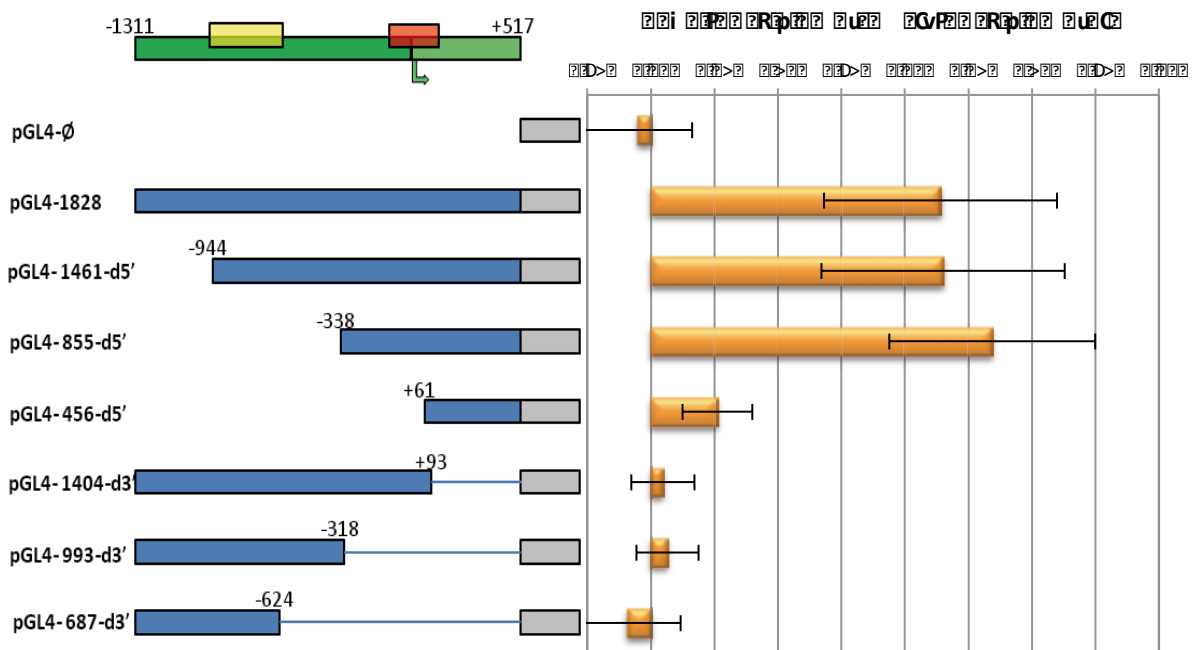


Figura 40. Análisis comparativo de la actividad del promotor de *WDR3* utilizando una serie de deleciones 5' y 3' del promotor de *WDR3*, evaluada por el ensayo de luciferasa. Se muestra el incremento medio de la actividad luciferasa para las co-transfecciones del vector pGL4 con los distintos fragmentos del promotor con y sin el vector de expresión de c-Myc.

Estos resultados indican que la región de respuesta del promotor del gen *WDR3* al factor de transcripción c-Myc se encuentra localizada en el fragmento contenido en el plásmido pGL4-855-d5'.

Por otra parte, la co-transfección con el vector de expresión de CTCF (**Figura 41**) muestra que la actividad luciferasa de las construcciones pGL4-1828 y pGL4-1404-d3' disminuye un 40% y un 20%, respectivamente. Sin embargo, el vector de expresión de CTCF co-transfectado con los plásmidos pGL4-993-d3' y pGL4-687-d3' aumenta 1,5 y 1,8 veces, respectivamente, la actividad luciferasa. Las co-transfecciones con los vectores con deleciones 5' parecen no afectar la actividad luciferasa.

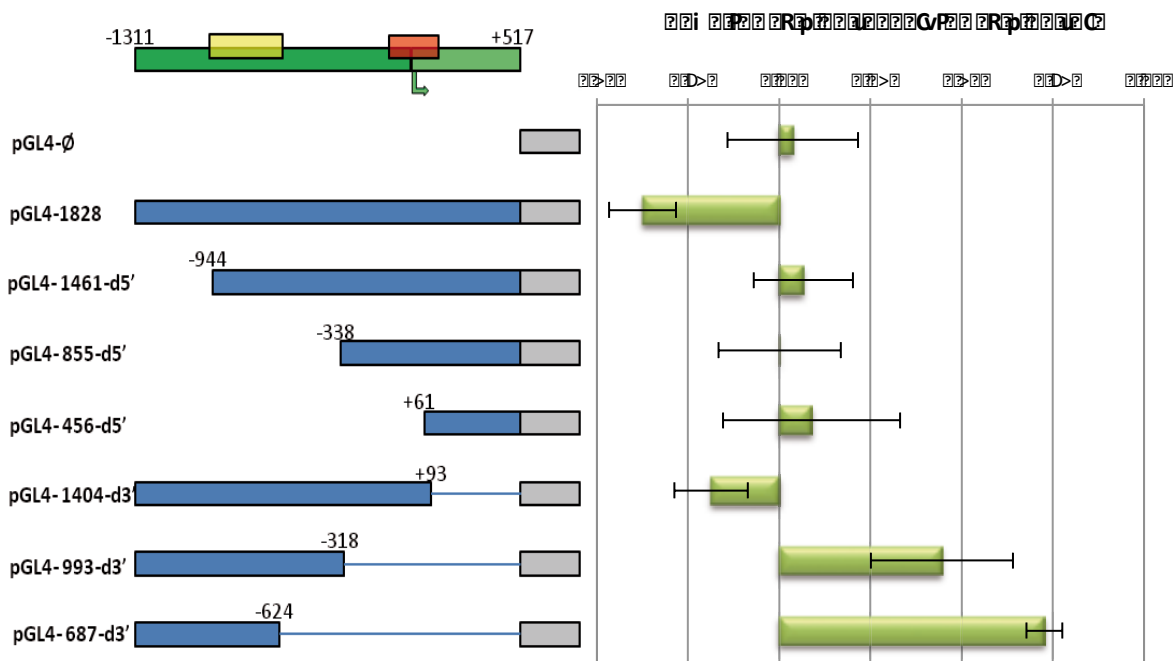


Figura 41. Análisis comparativo de la actividad del promotor de *WDR3* utilizando una serie de deleciones 5' y 3' del promotor de *WDR3*, evaluada por el ensayo de luciferasa. Se muestran los valores de actividad luciferasa relativa para las co-transfecciones del vector pGL4 con los distintos fragmentos del promotor con y sin el vector de expresión de CTCF. Las barras representan el valor medio y el error estándar de al menos tres experimentos independientes.

RESULTADOS

Estos resultados parecen indicar que el factor de transcripción CTCF podría unirse en la región comprendida entre las posiciones -1311 y -944, y que el efecto que provoca en el promotor de *WDR3* depende de la secuencia comprendida entre las posiciones -318 y +517, donde posiblemente se unan otros factores de transcripción que conjuntamente actúen regulando la expresión de *WDR3*. En ausencia de esta secuencia (-318/+517) el factor de transcripción CTCF tiene un efecto activador, sin embargo, cuando el promotor de *WDR3* no presenta esta delección, la actividad de CTCF es represora.

3-EXPRESIÓN DE *TBX15*

Como se ha indicado en el apartado A de esta sección de resultados, *TBX15* no muestra asociación con el cáncer de tiroides en la población estudiada. Sin embargo, las funciones de la familia de los genes T-box están asociadas a la proliferación celular y al cáncer. Nuestros estudios preliminares también indicaban que el gen *TBX15* podía presentar una expresión alterada en líneas celulares de tiroides. Por lo tanto, nos propusimos investigar la expresión del gen *TBX15* en líneas celulares de tiroides y en tejidos de tiroides.

A partir del gen *TBX15* se transcriben cinco mRNAs (Hubbard *et al.*, 2009). Los transcriptos TBX15-002 (ENST00000369429) y TBX15-001 (ENST00000207157) dan lugar, respectivamente, a las dos isoformas descritas de la proteína TBX15: la isoforma 1 (Q96SF7-1) de 602 aminoácidos que ha sido elegida como la secuencia canónica y la isoforma 2 (Q96SF7-2) de 496 aminoácidos que difiere de la secuencia canónica en la pérdida de 106 aminoácidos del extremo N-terminal (The UniProt Consortium, 2012). El estudio de la expresión del gen *TBX15* se realizó mediante qPCR y *western blot*.

3.1-EXPRESIÓN DE *TBX15* EN CÉLULAS DE TIROIDES

La expresión del gen *TBX15* fue analizada primeramente a nivel de transcripción por qPCR en nueve líneas celulares de cáncer de tiroides de diferente origen: TPC-1 y B-CPAP de tipo papilar; ML-1, WRO y CGTH-W-1 de tipo folicular; y FRO, 8305-C, 8505-C y CAL-62 de tipo anaplásico. Asimismo, se incluyó el cultivo primario de tiroides normal S11N como control de células normales de tiroides.

El análisis de la expresión por PCR cuantitativa se realizó a partir de la amplificación de una región de 156 bp ubicada en los exones 5 y 7 del gen *TBX15*. La cuantificación de la expresión de *TBX15*, en relación a la expresión del gen control *RPL27*, se realizó según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

RESULTADOS

En la **Tabla 15** se indica el valor medio de la expresión de *TBX15* en relación al gen control *RPL27* expresado en unidades arbitrarias (AU) y el error estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. La representación gráfica de la expresión de *TBX15* se muestra en la **Figura 42**.

Como se muestra en la **Tabla 15**, 6 de las 9 líneas celulares de cáncer de tiroides presentan una reducción significativa de la expresión de *TBX15* respecto a las células normales S11N. Esta disminución de la expresión varía en un rango del 64% al 96%. En las líneas celulares WRO, CGTH-W-1 y CAL-62 la expresión de *TBX15* no es diferente significativamente respecto a las células normales.

Tabla 15. Cuantificación de la expresión de *TBX15* a nivel de mRNA por PCR a tiempo real en líneas celulares de tiroides.

Línea celular	Expresión <i>TBX15/RPL27</i> (AU)	Error estándar	Expresión relativa a S11N	<i>p</i>
S11N	318,63	54,11	1	--
TPC-1	63,34	7,86	0,20	0,0016
B-CPAP	147,51	17,99	0,46	0,01
ML1	28,15	9,02	0,09	8,9 x 10 ⁻⁵
WRO	275,00	15,31	0,86	0,42
CGTH-W-1	271,15	20,62	0,85	0,44
FRO	28,79	6,18	0,09	0,0002
8305-C	51,38	6,65	0,16	0,0004
8505-C	11,55	3,68	0,04	0,0001
CAL-62	374,03	58,51	1,17	0,53

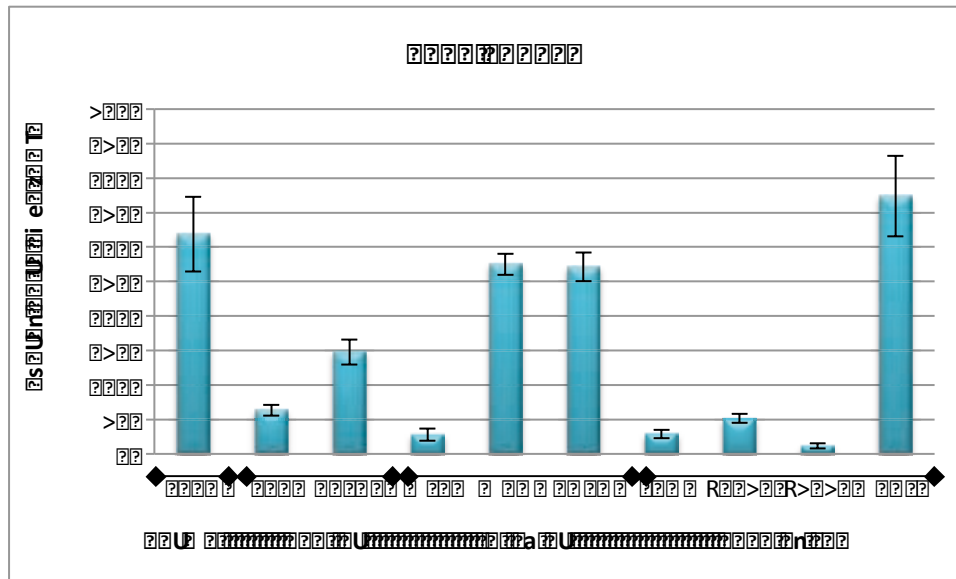


Figura 42. Expresión relativa de *TBX15* analizada por qPCR en líneas celulares de cáncer de tiroides. Las barras representan el valor medio y el error estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (AU).

El análisis de la presencia de la proteína TBX15 en las líneas celulares de cáncer de tiroides y en las células normales S11N y S63N se realizó por *western blot*. Este análisis reveló una banda de 55 kDa correspondiente a la estimación del tamaño de la proteína TBX15. La proteína control utilizada como referencia es la vinculina.

En la **Figura 43** se puede observar que las líneas celulares de cáncer de tiroides presentan una mayor cantidad de proteína TBX15 en comparación con las células normales de tiroides. En la línea celular WRO la presencia de proteína TBX15 es muy superior al resto de las líneas celulares. En las células normales S11N y S63N se observa una banda muy tenue, indicando la poca cantidad de proteína TBX15 en estas células.

RESULTADOS

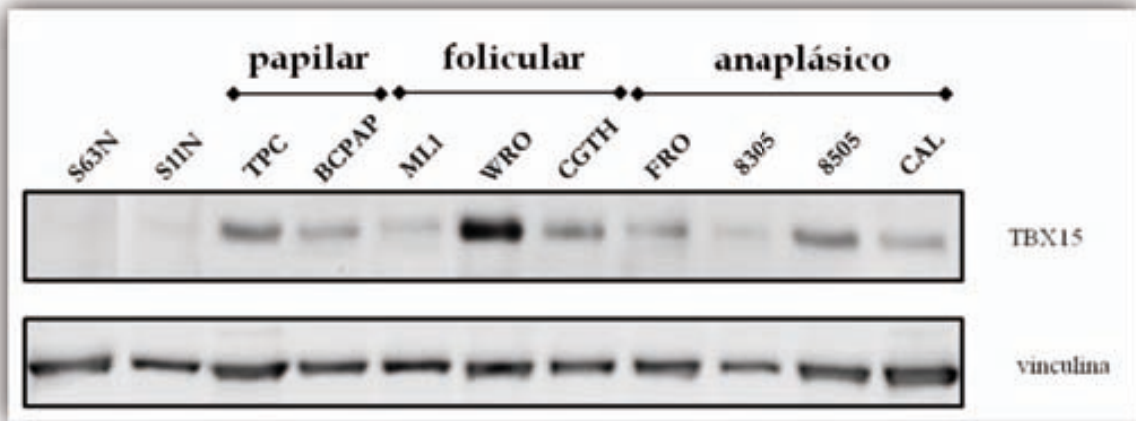


Figura 43. *Western blot* de la proteína TBX15 en líneas celulares de cáncer de tiroides. La proteína control utilizada es la vinculina.

La cuantificación de la señal de la proteína TBX15 en las células analizadas muestra una mayor presencia de TBX15 en todas las líneas celulares de cáncer de tiroides con respecto a las células normales S11N, con valores de 2,5 a 10 veces superiores, exceptuando WRO que presenta un aumento relativo de TBX15 de 36 veces (**Figura 44**).

La variación encontrada entre las distintas líneas celulares de cáncer de tiroides en la proteína TBX15, no presenta una correlación evidente con el tipo de cáncer de tiroides del cual proceden. Dentro de cada tipo de cáncer de tiroides, las diferentes líneas celulares presentan distintos niveles de expresión.

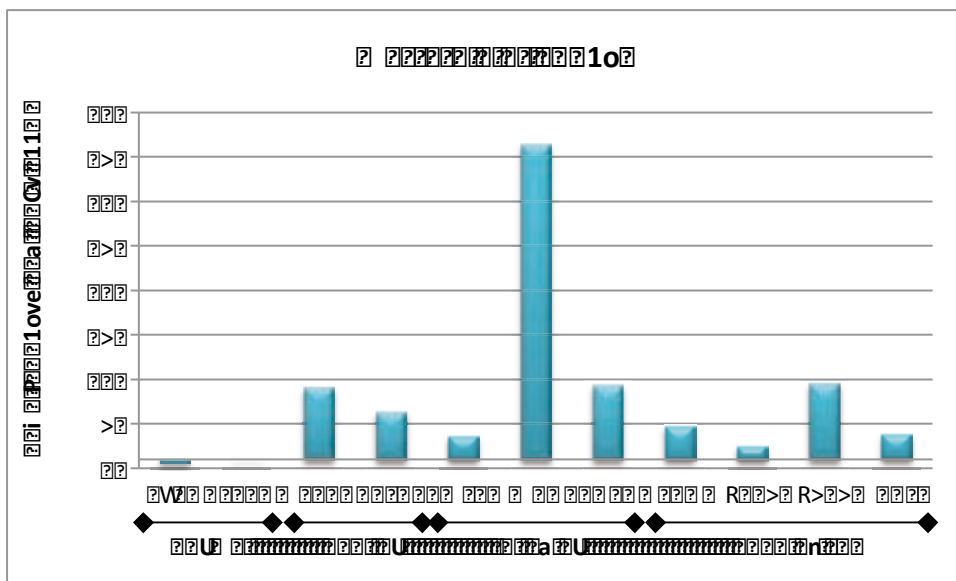


Figura 44. Cuantificación de la proteína TBX15 en líneas celulares de cáncer de tiroides relativa a las células normales S11N.

La señal de *western blot* de la proteína TBX15 no está correlacionada con la cantidad de mRNA de *TBX15* analizada por qPCR en nuestros experimentos. Mientras que en la cuantificación por qPCR, en general, las líneas celulares de cáncer de tiroides muestran reducción de la expresión de *TBX15* con respecto a las células normales, en el *western blot* la señal de TBX15 es mayor en las líneas celulares de cáncer que en las células normales de tiroides. La aparente correlación negativa entre la cantidad de mRNA de *TBX15* y la cantidad de proteína TBX15 observada en las células normales y en las líneas celulares derivadas de PTC y ATC, no se cumple en las líneas celulares derivadas de FTC. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la expresión de TBX15 está regulada a dos niveles, transcripcional y postranscripcional.

En resumen, se observa una menor expresión del mRNA de *TBX15* en todas las líneas celulares de cáncer de tiroides en relación a las células normales, pero estos niveles de expresión no están correlacionados de manera directa con la presencia de la proteína TBX15 en las líneas celulares de cáncer de tiroides analizadas.

3.2-EXPRESIÓN DE *TBX15* EN TEJIDOS DE TIROIDES

El análisis de la expresión de *TBX15* mediante qPCR se llevó a cabo utilizando las 12 parejas de tejido tumoral con su correspondiente tejido normal de tiroides provenientes del *Banc de Tumors de Catalunya*, analizadas previamente para la expresión de *WDR3*. El análisis se realizó a partir de la amplificación de la misma región analizada en las líneas celulares de cáncer de tiroides, un fragmento de 156 bp ubicado en los exones 5 y 7 del gen *TBX15*. La cuantificación de la expresión de *TBX15* relativa a la expresión del gen control *RPL27* se realizó según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) (**Tabla 16**).

Tabla 16. Expresión de *TBX15* a nivel de mRNA en tejidos normal (N) y tumoral (T) de tiroides.

Muestra	tipo	tejido	Expresión relativa (AU)	Ratio [T/N]
---------	------	--------	----------------------------	----------------

RESULTADOS

P 02	MTC	N	9700,59	0,168
		T	1633,62	
P 03	PTC	N	207,05	0,081
		T	16,84	
P 05	FTC	N	13,30	0,986
		T	13,12	
P 06	FTC	N	5930,16	0,049
		T	288,79	
P 07	PTC	N	6,84	0,191
		T	1,30	
P 09	PTC	N	7,23	0,742
		T	5,37	
P 10	PTC	N	2262,74	0,165
		T	373,21	
P 11	PTC	N	2672,28	0,002
		T	5,33	
P 27	PTC	N	--	--
		T	1,27	
P 31	Ad	N	5,15	2,235
		T	11,50	
P 32	Ad	N	20,59	1,117
		T	23,00	
P 36	Ad	N	13,49	0,707
		T	9,54	

Las muestras de tejido tumoral de tiroides procedentes de los carcinomas de células foliculares (PTC y FTC) o parafoliculares (MTC) analizadas, muestran una marcada reducción en la expresión del gen *TBX15* con respecto a su tejido normal, excepto la muestra 5 donde los niveles de expresión de *TBX15* en el tejido normal y tumoral son similares. Sin embargo, de las tres muestras de adenomas foliculares de tiroides analizadas, dos de ellas presentan un aumento de expresión de *TBX15* en el tejido tumoral comparado al tejido normal y la otra una reducción.

Los valores de mediana en unidades arbitrarias de la expresión relativa del gen *TBX15* en las muestras de tejido normal de tiroides es de 20,6 y en el tejido tumoral de 13,1. Las diferencias entre estos tejidos son estadísticamente significativas (test de Wilcoxon, $p = 0,032$). Al considerar solamente las muestras de carcinomas de tiroides, excluyendo las muestras de adenomas, la significación estadística de las diferencias entre el tejido normal y el tejido tumoral de tiroides en la expresión de *TBX15* es de $p = 0,008$ (test de

Wilcoxon). En resumen, a nivel de transcripción, el gen *TBX15* muestra una disminución de expresión en el tejido tumoral de tiroides.

4-REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *TBX15*

Dadas las diferencias encontradas a nivel transcripcional en la expresión de *TBX15*, tanto en las líneas celulares de tiroides como en los tejidos de tiroides, nos propusimos estudiar el grado de metilación de la región promotora de este gen.

4.1-METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *TBX15*

El gen *TBX15* presenta en su extremo 5' dos regiones de alta densidad de sitios CpG (**Figura 45**). Una de estas islas CpG (chr1: 119 531 992 – 119 532 196) se localiza sobre el sitio de inicio de la transcripción, comprende 205 bp y abarca 19 sitios CpG. La otra isla CpG (chr1: 119 535 667 – 119 535 987) se encuentra en la región distal del promotor de *TBX15*, ubicada a 3,4 kb del sitio de inicio de la transcripción del gen. Esta isla CpG comprende 36 dinucleótidos CpG en una secuencia de 321 bp y se ha demostrado que esta isla puede regular la actividad transcripcional de *TBX15* dependiendo del estado de metilación (Chelbi *et al.*, 2011).

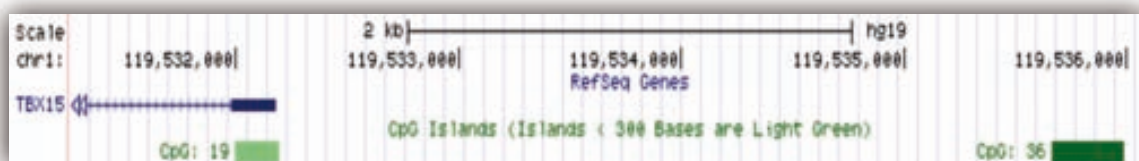


Figura 45. Ubicación de las islas CpG en la región 5' del gen *TBX15*. En azul se muestra el sitio de inicio de la transcripción de *TBX15* y en verde las islas CpG (<http://genome.ucsc.edu/>).

4.1.1-Metilación del promotor distal de *TBX15* en líneas celulares

El análisis de la metilación de la isla CpG, ubicada en el promotor distal del gen *TBX15*, se realizó utilizando la técnica *bisulphite sequencing* en las líneas celulares TPC-1 y B-CPAP de cáncer de tiroides papilar (PTC); WRO y CGTH-W-1 de cáncer de tiroides

RESULTADOS

folicular (FTC); FRO y 8305C de cáncer de tiroides anaplásico (ATC); HeLa, como referencia tumoral no tiroidea y Nthy-ori 3-1, derivada de tejido normal de tiroides, como referencia tiroidea no tumoral. Además, se incluyó DNA extraído de sangre periférica de una persona sin patologías de tiroides (SP).

Para este análisis se amplificaron por PCR tres fragmentos en la región del promotor distal de *TBX15* utilizando cebadores diseñados con el *software* MethPrimer (Li y Dahiya, 2002). El fragmento t1 (119 535 156 – 119 535 386) tiene una longitud de 231 bp y abarca un total de 15 sitios CpG; el fragmento t2 (119 535 561 -119 535 848) comprende 288 bp y abarca 25 sitios CpG; el fragmento t3 (119 535 782 -119 536 031) tiene una longitud de 250 bp y abarca 19 sitios CpG (**Figura 46**). Cuatro sitios CpG solapan en los fragmentos t2 y t3 siendo entonces 55 el total de sitios CpG abarcados en este estudio.

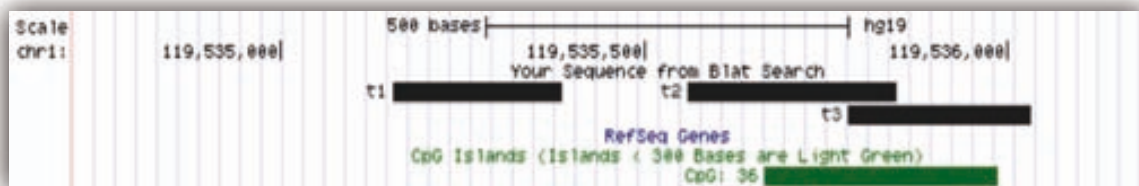
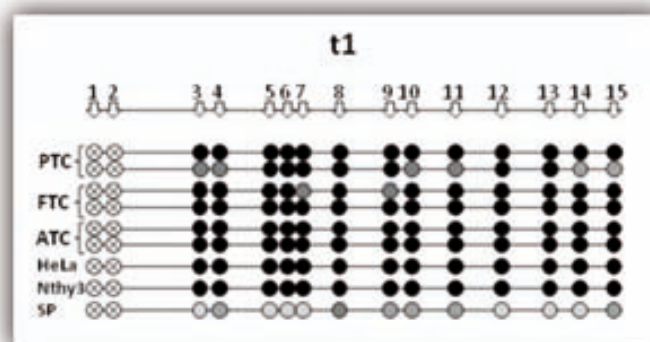


Figura 46. Isla CpG del promotor distal del gen *TBX15*. Se indica la posición relativa de los fragmentos t1, t2 y t3 amplificados por PCR en el análisis por *bisulphite sequencing* (barras en negro). En verde se muestra la ubicación de la isla CpG (<http://genome.ucsc.edu/>).

El estado de metilación de los 55 sitios CpG analizados en el promotor distal de *TBX15* y revelado por la secuenciación después de la modificación del DNA genómico con bisulfito sódico se muestra en la **Figura 47**. Al igual que con el gen *WDR3*, la semicuantificación del grado de metilación de los sitios CpG se realizó según el método de Jiang *et al.* (2010).



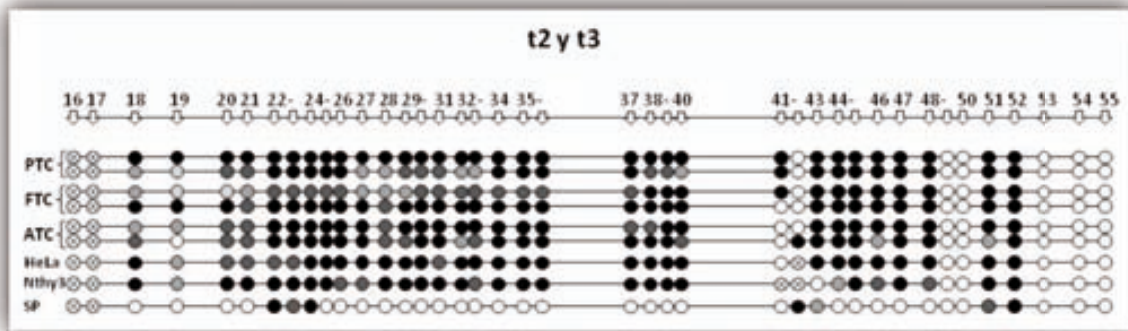


Figura 47. Metilación del promotor distal de *TBX15* en células humanas. Los sitios CpG de la región analizada se numeran de forma consecutiva (1-55) en los tres fragmentos secuenciados (t1, t2 y t3) y se corresponden con un círculo: ○ no metilado; ◐ 25% de metilación; ◑ 50% de metilación; ◒ 75% de metilación; ● 100% de metilación ⊗ sin datos. PTC: carcinoma papilar de tiroides; FTC: carcinoma folicular de tiroides; ATC: carcinoma anaplásico de tiroides; SP: DNA extraído de sangre periférica.

En la región t1 se observa un porcentaje de metilación en general para las diferentes líneas celulares analizadas mayor al 75%. La muestra de DNA extraído de sangre periférica también muestra metilación en esta región pero con porcentajes de metilación menores al 50%. Los sitios CpG comprendidos en las regiones t2 y t3 muestran diferentes niveles de metilación dependiendo de la ubicación en la secuencia. Los sitios comprendidos entre los dinucleótidos CpG 18-40 y 44-48 muestran porcentajes de metilación elevados en todas las líneas celulares analizadas, y no se observan diferencias relacionadas con el tipo de cáncer del cual proceden. Sin embargo, las células de sangre periférica muestran no metilación en la mayor parte de los sitios CpG mencionados. A partir del dinucleótido CpG 49 hasta el 55 el patrón de metilación es similar para todas las líneas celulares y las células de sangre periférica.

El grado de metilación elevado, observado en el promotor distal de *TBX15* en las líneas celulares de cáncer de tiroides se corresponde con la disminución de la expresión de *TBX15* a nivel de transcripción en estas mismas líneas celulares (ver apartado 3.1). En resumen, estos resultados indican que el promotor distal de *TBX15* se encuentra altamente metilado en las líneas celulares de tiroides.

RESULTADOS

4.1.2-Cuantificación de la metilación del promotor distal de *TBX15* en tejidos de tiroides

Los resultados de metilación del promotor distal de *TBX15* en las líneas celulares nos indujeron a realizar un análisis cuantitativo de la metilación de esta región del promotor de *TBX15* en muestras de tejido normal y tumoral de tiroides mediante la tecnología MassARRAY EpiTYPER (Sequenom, Inc.).

El análisis MassARRAY EpiTYPER se llevó a cabo en 59 muestras de DNA extraído de biopsias de tejido normal y tumoral de tiroides de 35 pacientes con diagnóstico de cáncer de tiroides del *Banc de Tumors de Catalunya*. Las biopsias obtenidas corresponden a 24 parejas de tejido tumoral con su correspondiente tejido normal de tiroides obtenidos del mismo paciente y 11 muestras de tejido tumoral independientes.

Al igual que con la región promotora de *WDR3*, se realizó el ensayo de predicción *in silico* previo al análisis MassARRAY EpiTYPER del promotor distal del gen *TBX15*. La región seleccionada se denominó TBX15-1 y se encuentra ubicada en las coordenadas chr1: 119 535 501 – 119 535 849. (**Figura 48**). Esta región abarca completamente la región t2 y parte de la región t3 analizadas previamente por *bisulfite sequencing* en las líneas celulares.

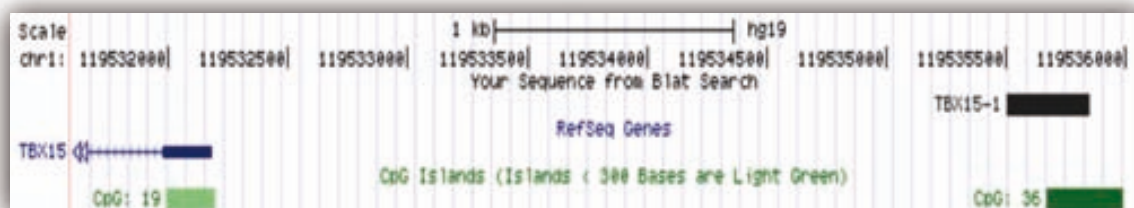


Figura 48. Localización de la región TBX15-1 en el promotor distal de *TBX15* definida por el análisis *in silico* para ser estudiada por MassARRAY EpiTYPER. La barra negra indica la ubicación de la región. En azul se muestra el sitio de inicio de la transcripción del gen *TBX15* y en verde las islas CpG (<http://genome.ucsc.edu/>).

La región TBX15-1 tiene una longitud de 349 pares de bases y comprende 26 sitios CpG. La secuencia de esta región y los fragmentos resultantes de la digestión y análisis por espectrometría de masas *in silico* se muestran en la **Figura 49**. La reacción de escisión en T para ambas cadenas (+ y -) permite el análisis de 23 de los 26 sitios CpG, generando ocho fragmentos que contienen un solo dinucleótido y siete fragmentos con dos o más sitios CpG. Los fragmentos que no pueden ser analizados contienen los sitios 4, 8 y 13.

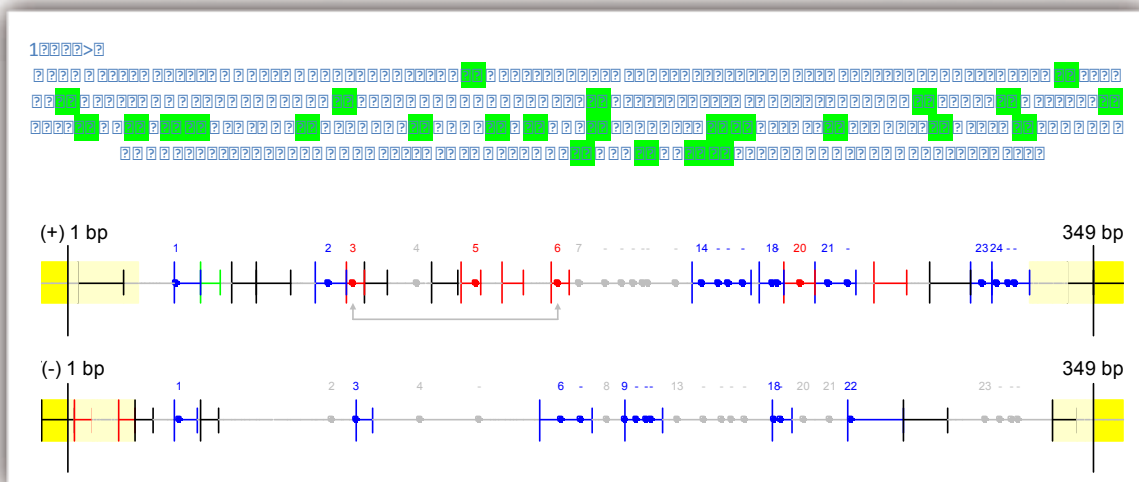


Figura 49. Análisis *in silico* de la región TBX15-1. Secuencia de la región analizada y ubicación de los 26 sitios CpG. En la parte inferior se muestran los perfiles de fragmentación para la reacción de escisión en T en ambas cadenas. Los dinucleótidos CpG están numerados y clasificados por color de acuerdo a su capacidad de ser analizados. En gris se muestran los sitios CpG ubicados en fragmentos cuyo peso molecular se encuentra fuera del rango analizable; en rojo se indican los sitios CpG analizables con superposición del peso molecular de los fragmentos y en azul los sitios CpG analizables.

	Control de conversión		Fragmento superpuesto		Fragmento que contiene CpG
	Fragmento no analizable		Superposición		Fragmento analizable que no contiene CpG

En el análisis de la región TBX15-1 utilizando el ensayo MassARRAY EpiTYPER se obtuvieron un total de 10 unidades CpG, cada una con un único valor de metilación. De las unidades obtenidas, 6 contienen un sitio CpG, 2 contienen dos sitios CpG, 1 unidad contiene tres sitios CpG y 1 unidad contiene cuatro sitios CpG individuales.

Para examinar las relaciones entre las distintas muestras y las diferentes unidades CpG del promotor de *TBX15*, se llevó a cabo el análisis jerárquico de grupos no supervisado de los valores obtenidos en la cuantificación de la metilación, en cada una de las

RESULTADOS

muestras de tejido de tiroides normal y tumoral para las distintas unidades CpG. Este análisis proporciona una visión imparcial sobre estas relaciones y también permite comprobar la capacidad de los valores de metilación de las unidades CpG de discriminar entre las muestras normales y tumorales.

El análisis de grupos no supervisado y el *heatmap* basados en la cuantificación de la metilación del promotor de *TBX15* se realizaron sobre 24 muestras de tejido normal y 35 muestras de tejido tumoral de tiroides en las 10 unidades CpG obtenidas (**Figura 50**). Entre las muestras analizadas se formaron distintos grupos que incluyen tanto muestras de tejido normal como tumoral. Al analizar la relación de las muestras en las distintas agrupaciones, no existe asociación con respecto al tipo de cáncer de tiroides del cual proceden. Se aprecia la formación de un grupo compuesto por las muestras tumorales de los pacientes 3, 6 y 23 que claramente se define por el alto nivel de metilación que presentan. El resto de muestras no presentan diferencias marcadas entre ellas.

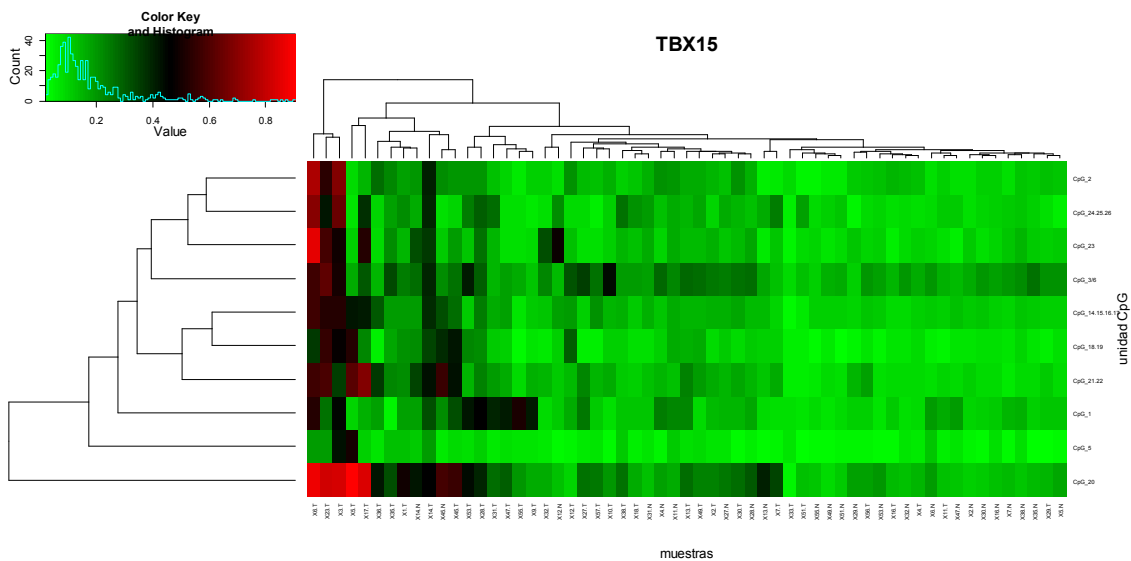


Figura 50. Análisis jerárquico de grupos y *heatmap* del promotor del gen *TBX15*. Análisis de grupos no supervisado de la metilación del DNA en las 10 unidades CpG (filas) obtenidas en las 59 muestras de tejido de tiroides (columnas) en el promotor del gen *TBX15*. Los valores de la metilación del DNA son representados por una escala de color como se indica en la esquina superior izquierda.

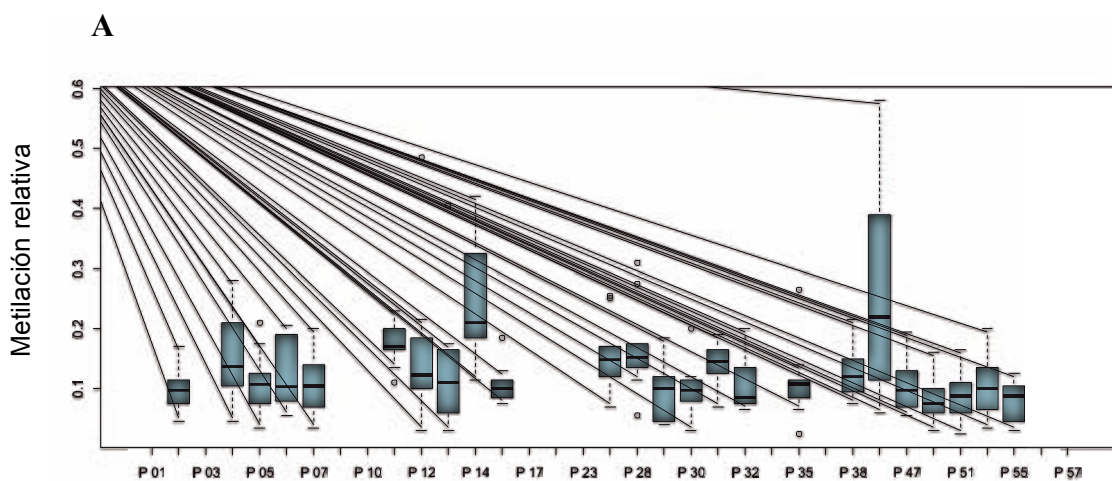
Con respecto a las unidades CpG se observa que la unidad CpG 20 presenta los niveles más altos de metilación en gran parte de las muestras (parte inferior del *heatmap*),

mientras que la unidad CpG 5 muestra los niveles más bajos de metilación comparada con el resto de unidades. Estas dos unidades se separan del resto de las unidades CpG que no muestran grandes diferencias de metilación entre ellas.

Aunque el análisis indica que en la región TBX15-1 existen sitios CpG con posible metilación diferencial y que ciertos tumores de cáncer de tiroides muestran niveles de metilación elevados, el nivel de metilación del promotor distal de *TBX15* no forma grupos diferenciados de muestras normales y tumorales.

Variación de los niveles de metilación del promotor de *TBX15* entre individuos

Los individuos analizados presentan diferencias en el grado de metilación del promotor distal del gen *TBX15* (**Figura 51**). En las muestras de tejido normal el valor medio de metilación es de 13% con un rango de media de 8-28%. Las diferencias observadas en la metilación entre los distintos individuos son estadísticamente significativas (test de Kruskal-Wallis, $p = 5,7 \times 10^{-7}$). En las muestras de tejido tumoral el valor porcentual medio de metilación entre individuos es de 21% con un rango de valores de media de 6-60%. Las diferencias en las muestras de tejido tumoral entre los individuos son significativas (test de Kruskal-Wallis, $p < 2,2 \times 10^{-16}$).



RESULTADOS

B

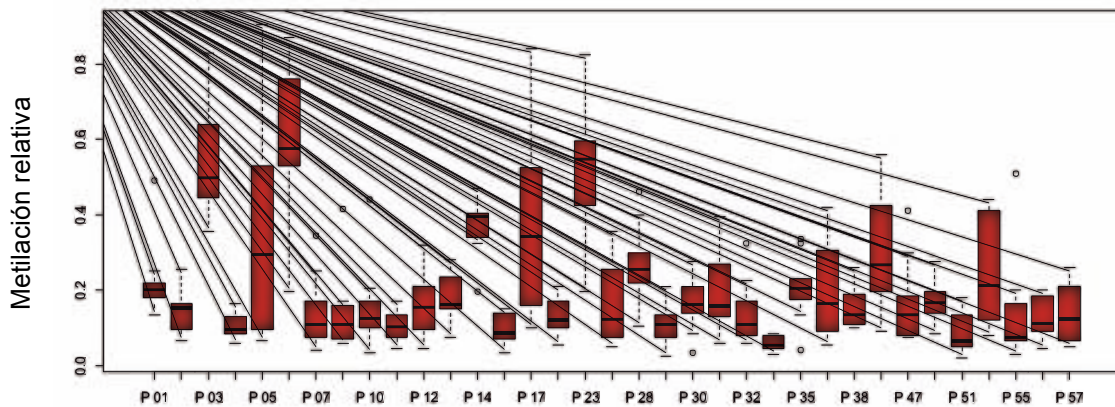


Figura 51. Variación interindividual de la metilación del promotor distal del gen *TBX15*. A) Niveles de metilación del tejido normal de tiroides. B) Niveles de metilación del tejido tumoral de tiroides en los individuos analizados.

En la **Figura 52** se representa el grado de metilación del promotor distal de *TBX15* en el total de muestras de tejido normal comparado con las muestras de tejido tumoral de tiroides. El tejido normal de tiroides presenta un valor porcentual medio de metilación de 13,1% y el tejido tumoral de tiroides tiene un porcentaje medio de metilación de 21%, con una mediana de 11,5% y 15%, respectivamente. Las diferencias entre los niveles de metilación de las muestras de tejido normal y tumoral de tiroides en la región promotora distal del gen *TBX15* son significativas (test de Wilcoxon, $p = 2,7 \times 10^{-8}$).

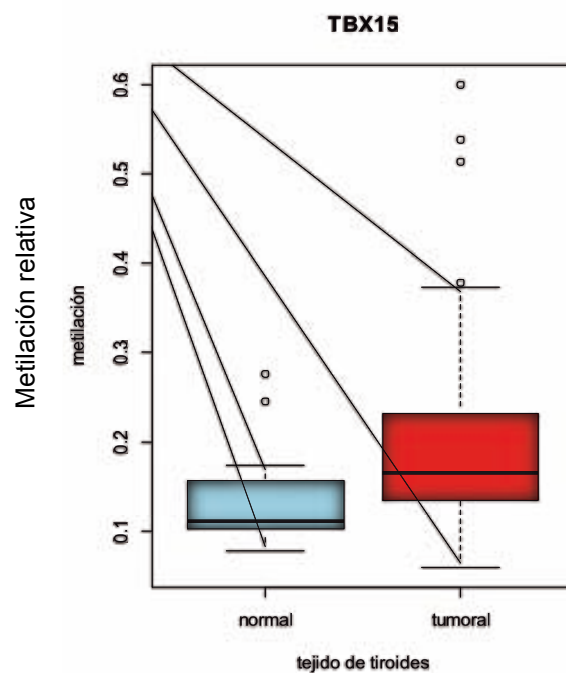


Figura 52. Niveles de metilación del promotor distal de *TBX15* en tejidos de tiroides. Diagrama de cajas de los niveles de metilación en el tejido normal (azul) y tumoral (rojo) de tiroides ($p = 2,7 \times 10^{-8}$).

La diferencia entre los niveles de metilación de las muestras de tejido normal y tumoral indica niveles de metilación diferencial para las distintas unidades CpG analizadas. Por lo tanto, se analizó la metilación en cada unidad CpG para el conjunto de las muestras de tejido normal (24) y tumoral (35). Los resultados se muestran en la **Figura 53**. Se observa que el nivel de metilación en cada unidad CpG analizada es mayor en el tejido tumoral que en el tejido normal y, concretamente, las unidades CpG 2, 5, 20 y 21.22 muestran diferencias significativas entre ambos tipos de tejido.

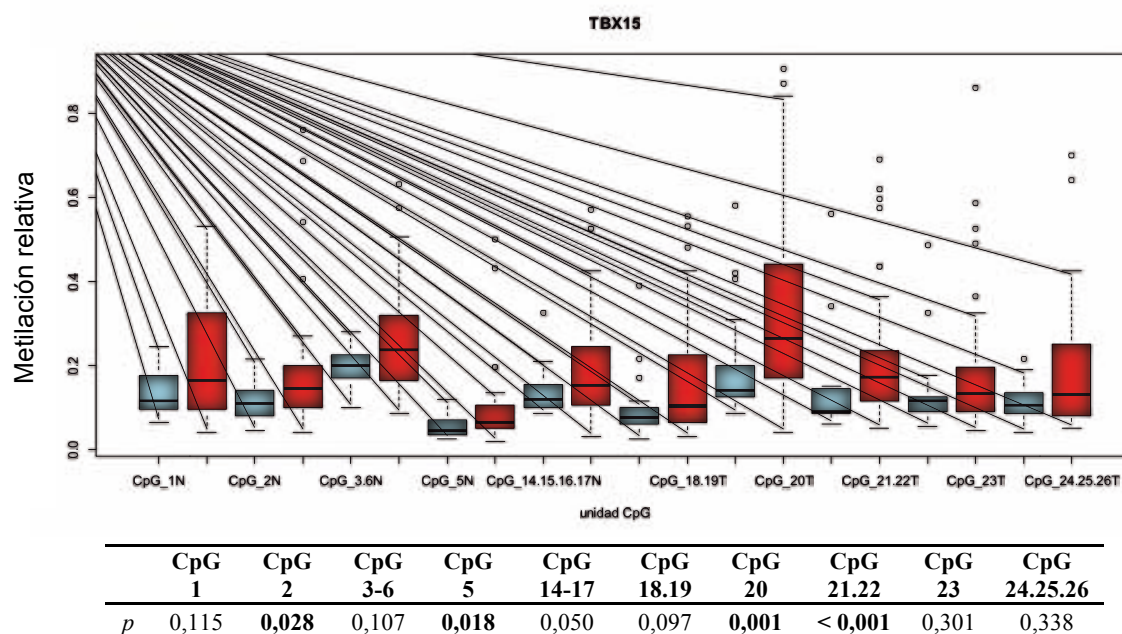


Figura 53. Valores de metilación de las unidades CpG del promotor de *TBX15*. Diagrama de cajas de los niveles de metilación del total de individuos en cada unidad CpG para el tejido normal (azul) y tumoral (rojo) de tiroides en las región TBX15-1. Se indica el valor *p* de la comparación estadística entre tejido normal y tumoral en cada unidad analizada.

Seguidamente se realizó el mismo análisis del nivel de metilación utilizando solamente los datos de las 24 parejas de tejido normal/tumoral del mismo paciente presentes en el total de muestras de tiroides analizadas. De estas 24 parejas normal/tumor, 12

RESULTADOS

corresponden a pacientes con PTC, 4 a pacientes con FTC, 1 a pacientes con ATC, 4 a pacientes con adenoma de tiroides y 3 a pacientes con MTC.

En el conjunto de muestras de tejido normal y tumoral procedentes de los mismos individuos, se incrementa la significación estadística al comparar los niveles de metilación del DNA en el tejido normal con respecto al tejido tumoral (test de Wilcoxon, $p = 6,2 \times 10^{-13}$). Al analizar el grado de metilación de cada unidad CpG en las muestras pareadas se observa que un número mayor de unidades CpG muestran diferencias significativas entre el tejido normal y tumoral. Estas diferencias se encuentran en las unidades CpG 1, CpG 3-6, CpG 5, CpG 18.19, CpG 20 y CpG 21.22 (Figura 54).

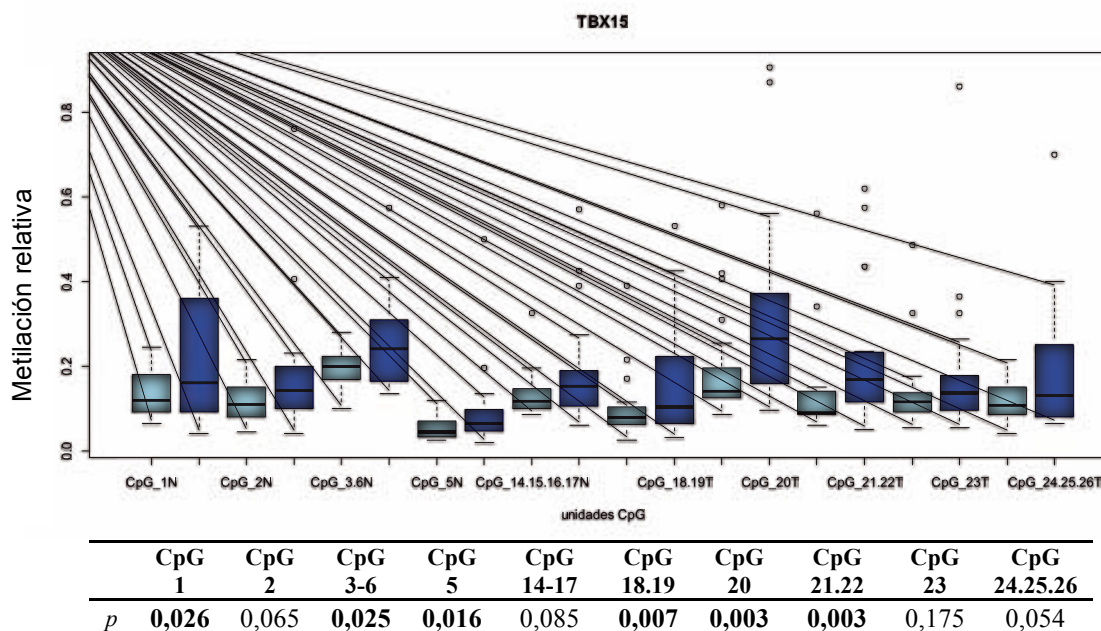


Figura 54. Valores de metilación de las unidades CpG del promotor de *TBX15* en las parejas de tejido normal/tumor. Diagrama de cajas de los niveles de metilación de las muestras pareadas en cada unidad CpG para el tejido normal (celeste) y tumoral (azul). Se indica el valor p de la comparación estadística entre tejido normal y tumoral en cada unidad CpG analizada.

Metilación de *TBX15* según el tipo de tumor de tiroides

El análisis de la metilación total en cada una de las muestras analizadas representado en la **Figura 51**, indica que algunas muestras de tumor presentan niveles de metilación muy superiores al resto de las muestras, por ejemplo P 03, P 06 y P 23, por lo que podrían existir diferencias en la metilación dependiendo de las características clínico-patológicas de los paciente. En este estudio hemos analizado el nivel de metilación para los distintos tipos de tumor de los que se tienen muestras pareadas de tejido normal y tumoral.

Carcinoma papilar de tiroides (PTC): los niveles de metilación de los tejidos normal y tumoral se muestran en la **Figura 55**. Los valores obtenidos corresponden a las diez unidades CpG obtenidas en 12 pacientes con este tipo de cáncer diagnosticado. Los valores de mediana de la metilación en los tejidos normal y tumoral de tiroides son 12% y 15%; respectivamente. El tejido normal presenta un valor porcentual medio de metilación del 13,8%; el tejido tumoral presenta un porcentaje medio de 17,4% de metilación. La diferencia encontrada entre estas muestras tiene una significación de $p = 4,9 \times 10^{-5}$.

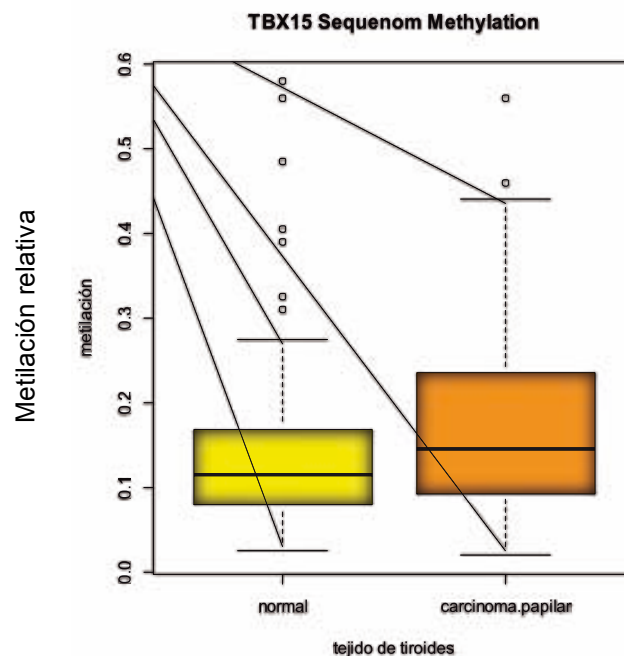


Figura 55. Metilación del promotor de *TBX15* en pacientes con carcinoma papilar de tiroides (n = 12) (test de Wilcoxon, $p = 4,9 \times 10^{-5}$).

RESULTADOS

Carcinoma folicular de tiroides (FTC): Los niveles de metilación correspondientes a este tipo de cáncer, se muestran en la **Figura 56**. Los valores están referidos a 4 pacientes con carcinoma folicular de tiroides en las diez unidades CpG de la región promotora de *TBX15*. La mediana en las muestras de tejido normal es 10% y en las muestras de tejido tumoral 19%. La diferencia encontrada entre estas muestras tiene una significación de $p = 4,1 \times 10^{-6}$. Los porcentajes medios de metilación para el tejido normal y el tejido tumoral son 10,2% y 31,2% respectivamente.

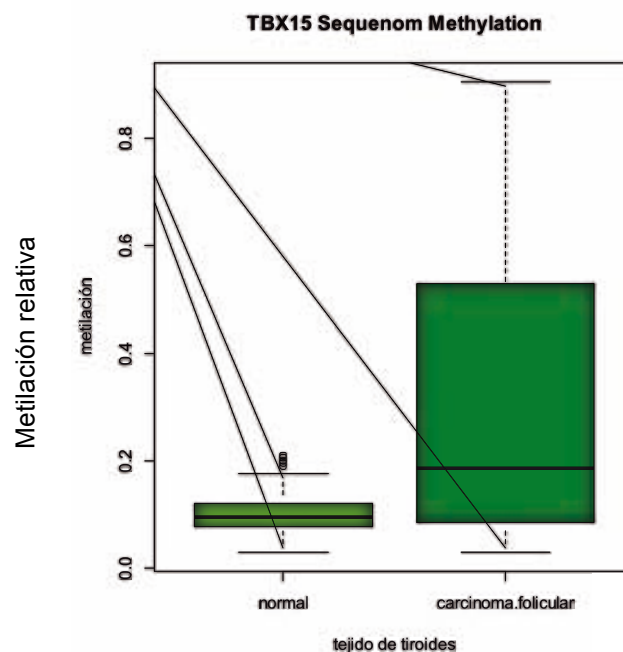


Figura 56. Metilación del promotor de *TBX15* en pacientes con carcinoma folicular de tiroides ($n = 4$) (test de Wilcoxon, $p = 4,1 \times 10^{-6}$).

Carcinoma anaplásico de tiroides (ATC): Dada la baja frecuencia de este tipo de cáncer de tiroides, los niveles de metilación para el promotor de *TBX15* encontrados en el tejido normal y en el tejido tumoral, están referidos a un solo paciente, el cual presenta un valor de mediana de 21% y 40% para el tejido normal y tumoral, respectivamente (**Figura 57**). Las diferencias encontradas en estas muestras presentan una significación de $p = 0,002$. El valor medio en porcentaje de metilación del tejido normal es 24,5% y el del tejido tumoral 37,2%.

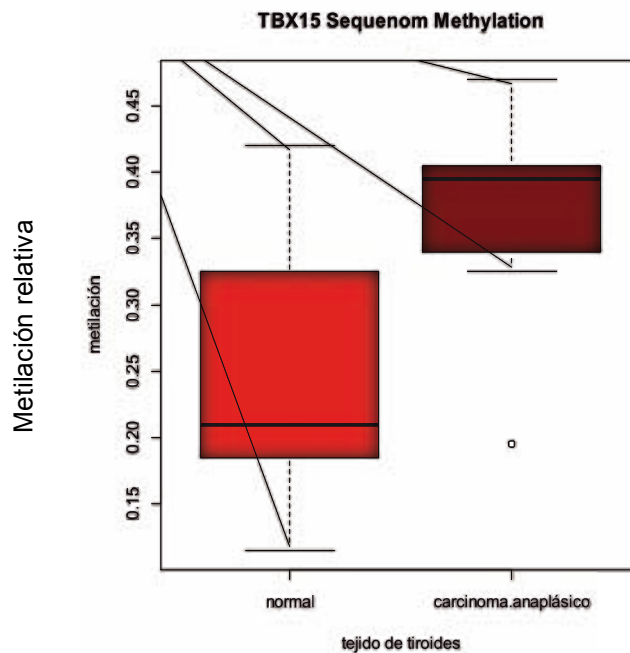


Figura 57. Metilación del promotor de *TBX15* en 1 paciente con carcinoma anaplásico de tiroides (test de Wilcoxon, $p = 0,002$).

Adenoma folicular de tiroides (Ad): Los niveles de metilación correspondientes a adenoma folicular de tiroides están referidos a 4 pacientes. El tejido normal presenta un valor porcentual medio de metilación del 12%; el tejido tumoral presenta un porcentaje medio de 17,2% de metilación. Los valores de mediana para estas muestras son 12% y 14% para cada tipo de tejido (**Figura 58**). La diferencia encontrada entre estas muestras tiene una significación de $p = 0,0004$.

Carcinoma medular de tiroides (MTC): los niveles de metilación para este tipo de cáncer se obtuvieron de 3 pacientes. Los valores de mediana son 10% para el tejido normal y 14% para el tejido tumoral de tiroides (**Figura 59**). La media porcentual en el tejido normal es de 12%; en el tejido tumoral es de 11,7%. No se observan diferencias significativas en la metilación de ambos tejidos (test de Wilcoxon, $p = 0,97$).

RESULTADOS

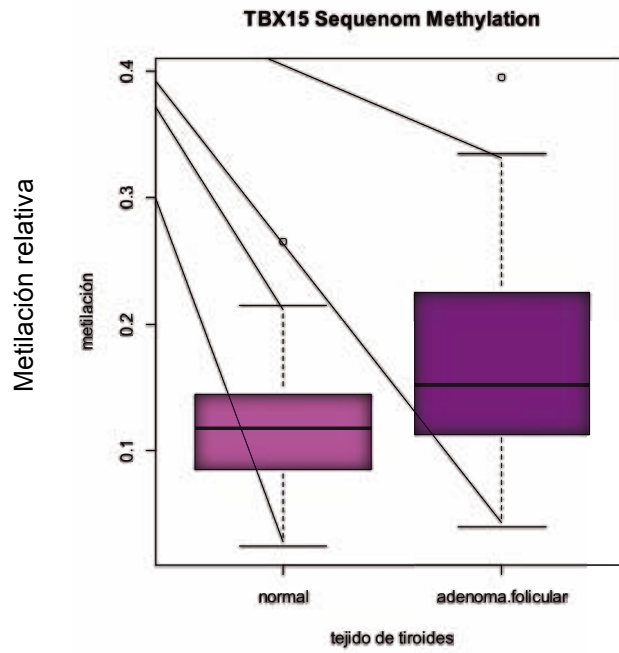


Figura 58. Metilación del promotor de *TBX15* en pacientes con adenoma folicular de tiroides (n = 4) (test de Wilcoxon, $p = 0,0004$).

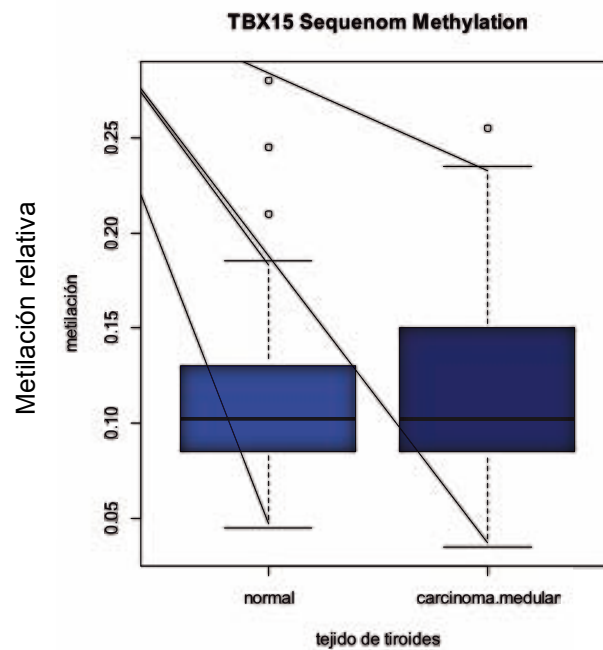


Figura 59. Metilación del promotor de *TBX15* en pacientes con carcinoma medular de tiroides (n = 3) (test de Wilcoxon, $p = 0,97$).

En resumen, se observa un incremento de la metilación del promotor distal de *TBX15* en el tejido tumoral con respecto al tejido normal en los pacientes con cáncer de tiroides

derivado de las células foliculares, es decir, PTC, FTC y ATC, así como en los adenomas de tiroides. Las muestras analizadas indican que el FTC es el tipo de cáncer de tiroides con los niveles más altos de metilación en el promotor de *TBX15*. El MTC, que deriva de las células parafoliculares, no muestra diferencias de metilación en el promotor distal de *TBX15* entre el tejido tumoral y normal.

4.1.3-Cuantificación de la metilación del promotor distal de *TBX15* en tumores cerebrales

Diversos estudios han puesto en evidencia patrones de metilación del DNA específicos de tejido (Byun *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2012). Es por ello que se propuso analizar el grado de metilación de la región promotora del gen *TBX15* en otros tipos de tumores. A lo largo del trabajo de tesis tuvimos acceso a muestras de tumores cerebrales, por lo que se estimó conveniente realizar en estas muestras el análisis de metilación.

Mediante la tecnología MassARRAY EpiTYPER (Sequenom, Inc.) se analizaron tumores del sistema nervioso central y líneas celulares establecidas directamente de estos tumores. Estas muestras proceden del *Queensland Children's Tumour Bank* y del *Royal Children's Hospital*, Australia y comprenden 11 muestras de tumores cerebrales pediátricos, 12 líneas celulares establecidas de tejido tumoral sólido primario y 2 muestras de tejido cerebral no tumoral.

En el análisis de los resultados se siguió el mismo proceso que para las muestras de tiroides. Primeramente se realizó el análisis jerárquico de grupos no supervisado y el *heatmap* de los valores obtenidos en la cuantificación de la metilación del promotor del gen *TBX15* en las muestras de células y tejidos cerebrales (**Figura 60**).

RESULTADOS

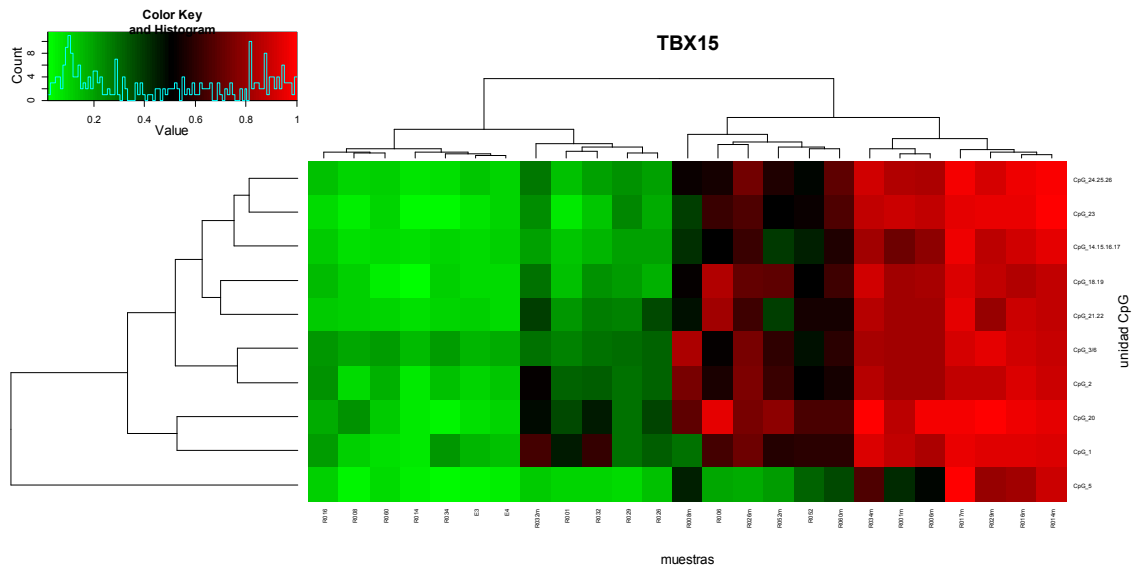


Figura 60. Análisis jerárquico de grupos y heatmap del promotor del gen *TBX15*. Análisis de grupos no supervisado de la metilación del DNA en las 10 unidades CpG (filas) obtenidas en las 25 muestras procedentes de células y tejido cerebrales (columnas) en el promotor del gen *TBX15*. Los valores de la metilación del DNA son representados por una escala de color como se indica en la esquina superior izquierda.

Se observa claramente la separación de las muestras en dos grandes grupos. El grupo que presenta los mayores niveles de metilación está a su vez dividido en dos subgrupos: uno de éstos presenta valores muy altos de metilación en todas las unidades CpG, cercanos a 1 (100% de metilación) y está formado exclusivamente por líneas celulares de tumores cerebrales primarios; el otro subgrupo presenta valores intermedios de metilación y está compuesto por tumores y líneas celulares derivadas de tumores primarios. El segundo grupo grande corresponde a las muestras con menor grado de metilación y también se encuentra dividido en dos subgrupos. Uno de ellos, formado en su mayoría por los tumores primarios con valores intermedios de metilación cercanos a los del grupo anteriormente mencionado, y el otro subgrupo, cuyos valores de metilación son bajos, está formado por algunos tumores y las muestras de tejido cerebral no tumoral.

Entre las unidades CpG no se observan diferencias claras de metilación entre ellas. En general, la separación de grupos de este análisis es dirigida por los niveles de metilación que presentan las diferentes muestras y no por la metilación de las distintas unidades CpG.

Los niveles de metilación para los distintos tipos de muestras cerebrales se muestran en la **Figura 61**. Las muestras evaluadas de tejido cerebral no tumoral presentan una media de metilación de 11% y una mediana de 10,5%. El tejido tumoral presenta un valor de metilación medio de 25% y una mediana de 19,5%; las diferencias en los niveles de metilación entre estos tejidos son significativas (test de Wilcoxon, $p = 0,001$). Las líneas celulares derivadas de tumores primarios presentan valores altos de metilación, media de 73% y mediana de 82%. La diferencia del nivel de metilación de las líneas celulares con la metilación del tejido normal y tumoral de cerebro es altamente significativa (test de Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$).

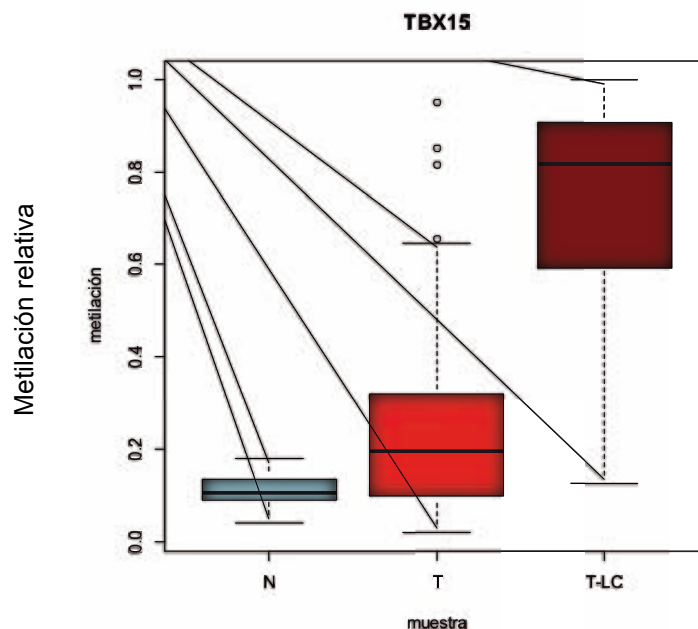


Figura 61. Metilación de los tejidos cerebrales en el promotor de *TBX15*. Diagrama de cajas de los niveles de metilación en tejido normal (N), tumoral (T) y células derivadas de tejido tumoral primario de cerebro (T-LC).

El análisis del nivel de metilación para cada unidad CpG en el tejido normal, el tejido tumoral y las líneas celulares de tejido tumoral de cerebro se muestra en la **Figura 62**. Se observa que los valores de metilación del tejido tumoral de cerebro son mayores que en el tejido normal de cerebro para todas las unidades CpG, sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas para ninguna de las unidades CpG, seguramente, debido al bajo número de muestras de tejido normal de cerebro ($n = 2$). Por otra parte,

RESULTADOS

las líneas celulares presentan niveles de metilación muy elevados en todas las unidades CpG.

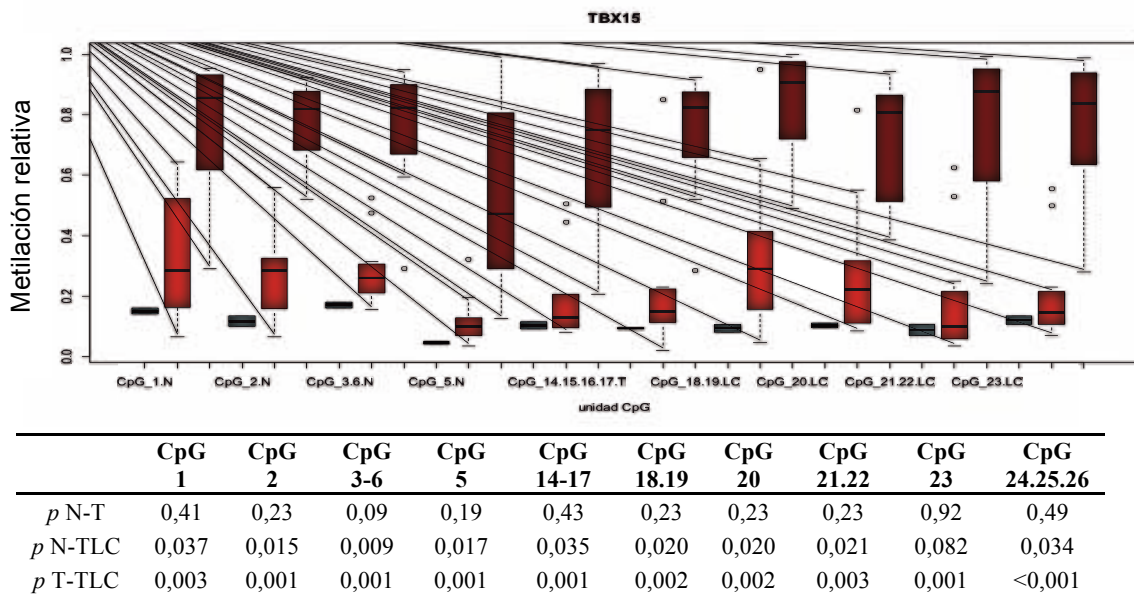


Figura 62. Valores de metilación de las unidades CpG del promotor distal de *TBX15*. Diagrama de cajas de los niveles de metilación del total de muestras en cada unidad CpG para el tejido normal (azul), tumoral (rojo) y líneas celulares de tejido cerebral (marrón) en la región *TBX15*-1. Se indican los valores *p* de las comparaciones estadísticas entre el tejido normal y tumoral (test de Wilcoxon) y entre las líneas celulares y cada tipo de tejido (test de Kruskal-Wallis).

En resumen, se observa un incremento del nivel de metilación en el tejido tumoral con respecto al tejido normal de cerebro, aunque debido al número de muestras analizadas, las diferencias observadas no son estadísticamente significativas. Asimismo, las líneas celulares derivadas de tumores cerebrales primarios presentan niveles de metilación muy superiores a las muestras de tejido de las cuales derivan.

V- DISCUSIÓN

El cáncer es una enfermedad cuya existencia es conocida desde la antigüedad, pero ha comenzado a tener importancia en las últimas décadas debido a su elevada frecuencia y a la magnitud de las cifras de mortalidad que ocasiona. Actualmente, el cáncer es una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial. Se estima que 1 de cada 5 personas desarrollará un cáncer antes de los 75 años. Esta enfermedad afecta a personas de todas las edades y de todas las clases sociales.

Numerosos estudios se llevan a cabo en todo el mundo para conocer las causas y el comportamiento del cáncer y aplicar este conocimiento a la mejora de la prevención, diagnóstico y tratamiento de las personas afectadas. Es en este contexto en el cual nuestro grupo pretende contribuir con estos objetivos, aportando nuevos conocimientos sobre los procesos involucrados en el desarrollo tumoral en el cáncer de tiroides en particular y en la carcinogénesis en general.

Actualmente, no se conocen muchos factores genéticos de alta penetrancia en cáncer de tiroides. Las alteraciones genéticas más frecuentes de la carcinogénesis de la glándula tiroides están representadas, principalmente, por la activación de los protooncogenes *BRAF*, *RAS*, *RET* y *NTRK1* y el silenciamiento de los genes supresores de tumores *PTEN* y *TP53*. Basados en estudios de susceptibilidad al cáncer de tiroides llevados a cabo en nuestro laboratorio, hipotetizamos que los genes *WDR3* y *TBX15* podrían ser genes candidatos implicados en el cáncer de tiroides.

Los genes *WDR3* y *TBX15* pertenecen a las familias génicas WD y T-box, respectivamente. La familia de genes que codifican para proteínas con repeticiones WD está implicada en procesos celulares como la síntesis y procesamiento del RNA, el control del ciclo celular y la apoptosis (Li y Roberts, 2001), evidenciando su importante papel en la proliferación de las células; además, varios estudios han mostrado una expresión irregular de las proteínas con motivos WD en determinados tipos de cáncer (Chernova *et al.*, 2001; Honore *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2005). La familia T-box, por su parte, está implicada principalmente en procesos del desarrollo (Packham y Brook, 2003; Singh *et al.*, 2005); además, en los últimos años, han surgido evidencias que indican una relación entre los genes T-box y la tumorigénesis, con efectos sobre la proliferación celular, invasión y metástasis (Peres *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Trempus *et al.*, 2011).

DISCUSIÓN

Los genes *WDR3* y *TBX15* se localizan en la región cromosómica 1p12. Esta región ha sido asociada con numerosos tipos de cáncer, como por ejemplo carcinomas de pulmón, mama, intestino, ovario y riñón, tumores cerebrales, miosarcoma y mieloma (Mitelman Database, 2012). En nuestro laboratorio se han identificado dos polimorfismos marcadores de susceptibilidad al cáncer de tiroides independientes en la región 1p12 (Baida *et al.*, 2008), uno de los cuales se ubica en el intrón 24 del gen *WDR3* y el otro, en una región vacía de genes, ubicada a 460 Kb del gen *TBX15*.

Partiendo de lo anteriormente expuesto, hipotetizamos que los genes *WDR3* y *TBX15* podrían estar relacionados con el cáncer. Es por ello que en el presente trabajo de tesis realizamos un estudio de asociación de los genes *WDR3* y *TBX15* con la susceptibilidad al cáncer de tiroides y, seguidamente, analizamos su expresión y regulación principalmente en cáncer de tiroides y también en cáncer de colon y tumores cerebrales.

WDR3

Los estudios de asociación del gen *WDR3* con el cáncer de tiroides han revelado que el haplotipo CAT (SNPs rs3754127, rs3765501 y rs4658973) incrementa el riesgo al cáncer de tiroides, indicando que el gen *WDR3* es un factor de susceptibilidad a este tipo de cáncer (Akdi *et al.*, 2010). Un estudio reciente en nuestro laboratorio muestra que variantes génicas de estos mismos polimorfismos están asociadas con bajos niveles de daño en el DNA posteriores al tratamiento con radiación ionizante, sugiriendo un papel de *WDR3* en la mantención de la estabilidad del genoma (García-Quispes *et al.*, enviado a publicar).

El análisis de expresión del gen *WDR3* realizado en las líneas celulares de cáncer de tiroides revela que *WDR3* se sobre-expresa tanto a nivel del mRNA como de la proteína *WDR3* en ocho de las nueve líneas celulares de cáncer de tiroides analizadas, observándose una correlación directa en los niveles de mRNA y proteína obtenidos. Estos niveles de expresión no parecen estar relacionados con el tipo de tumor del cual procede cada línea celular ya que se observa que los niveles de *WDR3* varían en las líneas celulares procedentes de cada tipo de cáncer de tiroides. Además, la expresión de *WDR3* analizada en las muestras de tejido de tiroides confirma esta sobre-expresión de

WDR3 en los tumores de tiroides, evidenciando que la expresión del gen *WDR3* se encuentra alterada en el cáncer de tiroides y sugiriendo que *WDR3* juega un papel necesario para la proliferación celular. Asimismo, el análisis de la expresión de *WDR3* en muestras de tejido de colon muestra que este gen también se sobre-expresa en cáncer de colon. Es importante destacar que el incremento en la expresión de *WDR3* observado en el tejido de tiroides tumoral con respecto al tejido normal es de 3,8 veces y, de forma similar, el incremento en la expresión observado en el tejido de colon tumoral con respecto al tejido normal es de 4,1 veces. Estos valores remarcan la consistencia del análisis de expresión realizado y refuerzan la hipótesis de la sobre-expresión de *WDR3* en el cáncer.

Esta expresión aumentada de *WDR3* en el cáncer, concuerda con los resultados encontrados por McMahon *et al.* (2010), donde observan que la supresión de *WDR3* utilizando RNAs de interferencia reduce la proliferación celular, el tamaño de las células y la formación de *foci*, lo cual indica que *WDR3* aumenta el crecimiento y la proliferación de células transformadas.

Por otra parte, se conoce que *WDR3* forma parte de un complejo ribonucleoproteico involucrado en el procesamiento del pre-rRNA de la subunidad pequeña del ribosoma (Turner *et al.*, 2009) y que su homólogo funcional en levadura, la proteína DIP2, forma parte del complejo ribonucleoproteico necesario para el procesamiento del pre-rRNA en la biogénesis del rRNA 18S (Dragon *et al.*, 2002). Además, recientemente se ha demostrado que la proteína *WDR3* es necesaria para el procesamiento del rRNA 18S que forma parte de la subunidad pequeña 40 S del ribosoma (McMahon *et al.*, 2010). La regulación de la traducción y el control de la biogénesis de los ribosomas son procesos celulares esenciales que afectan el crecimiento y la proliferación celular. Alteraciones en estos mecanismos han sido asociados frecuentemente con los procesos cancerígenos (Ruggero y Pandolfi, 2003; Holland *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis con respecto al incremento en la expresión de *WDR3* en cáncer de tiroides y cáncer de colon, sumado a la función atribuida a *WDR3* en la biogénesis de los ribosomas, un proceso directamente relacionado con el crecimiento y la proliferación celular, indican que la sobre-expresión de *WDR3* podría ser un evento involucrado en la tumorigénesis en general.

DISCUSIÓN

La sobre-expresión de *WDR3* nos indujo a explorar posibles mecanismos de regulación del gen *WDR3* con el fin de dilucidar estos mecanismos implicados la tumorigénesis. El entendimiento de los mecanismos que regulan la expresión de *WDR3* nos permitirá establecer posibles estrategias para su regulación negativa, y así poder analizar su efecto en el cáncer de tiroides y otros tipos de cáncer, con el objetivo de contribuir al posible desarrollo de tratamientos contra esta enfermedad.

Las diferencias observadas en los niveles de expresión del mRNA del gen *WDR3* tanto en las líneas celulares de tiroides como en los tejidos de tiroides y de colon, indican la existencia de mecanismos de regulación de la transcripción génica que modulan la expresión de *WDR3* de manera que se encuentra sobre-expresado en el cáncer de tiroides y de colon en comparación con su expresión en las células y tejidos normales. El gen *WDR3* presenta en su extremo 5' una región de alta densidad de sitios CpG. Es por ello que nos propusimos estudiar el grado de metilación de su región promotora ya que esta modificación epigenética podría estar implicada en las diferencias encontradas en el gen *WDR3* a nivel transcripcional. El análisis de la metilación del promotor de *WDR3* en líneas celulares de tiroides por *bisulfite sequencing* muestra que la región 5' del gen *WDR3* se encuentra no metilada tanto en el cáncer de tiroides como en las células normales. De igual manera, la cuantificación de la metilación en tejidos normales y tumorales de tiroides mediante el análisis MassARRAY EpiTYPER, muestra que este gen se encuentra no metilado de forma generalizada tanto en el cáncer de tiroides como en los tejidos normales de tiroides. Estos resultados indican que esta modificación epigenética no es la responsable de las diferencias de expresión encontradas en *WDR3*.

Por otra parte, la obtención de las construcciones plasmídicas con deleciones 5' y 3' del promotor de *WDR3* constituyen un modelo de estudio que permite su aplicación en el análisis de la regulación de la expresión de *WDR3* debida a la unión de factores de transcripción, permitiendo dilucidar parte de los mecanismos implicados en el control de la expresión de *WDR3* en el cáncer. Así, se han identificado numerosos factores de transcripción que podrían unirse a la región promotora del gen *WDR3* y regular su expresión. Para analizar la regulación de la expresión de *WDR3* debida a la unión de estos factores, decidimos comenzar el análisis estudiando los factores de transcripción c-Myc y CTCF, los cuales fueron identificados de acuerdo a la información disponible

en bases de datos y publicaciones. La unión de estos factores a la región promotora de *WDR3* fue evidenciada por experimentos de *ChIP-seq*. Por lo tanto, analizamos en primer lugar la correlación entre estos factores y la expresión de *WDR3* y, seguidamente, la influencia de la co-transfección de los vectores de expresión de los factores CTCF y c-Myc en la actividad del promotor de *WDR3* mediante el ensayo de luciferasa. Aparentemente, existe una correlación directa positiva entre los niveles de expresión de CTCF y la expresión de *WDR3* en líneas celulares de cáncer de tiroides. Sin embargo, el estudio de la actividad del promotor de *WDR3* analizada mediante el ensayo de luciferasa muestra que la co-transfección con el vector de expresión de CTCF disminuye la cantidad de luz relativa. Se ha observado que CTCF está implicado en la regulación de genes actuando directamente como represor (Filippova *et al.*, 1996), o activador (Vostrov y Quitschke, 1997), y también mediando cambios locales en la estructura de la cromatina que pueden bloquear la interacción de los promotores con las secuencias *enhancers* (Bell *et al.*, 1999) o actuar como barrera que protege a los genes de la inactivación transcripcional observada en genes cercanos a regiones heterocromáticas (Cuddapah *et al.*, 2009), como podría ser el caso del gen *WDR3* cercano al centrómero del cromosoma 1.

El factor de transcripción c-Myc aumenta la actividad del promotor de *WDR3* indicando que este factor promueve la expresión de *WDR3*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Schlosser *et al.* (2003) donde se observó una inducción de la expresión de *WDR3* por c-Myc al investigar el papel de este factor de transcripción en el procesamiento del RNA ribosómico. En este trabajo se indica que es posible que la transcripción de los genes rDNA dependa de la unión de c-Myc a los sitios de alta afinidad, mientras que el procesamiento del precursor de rRNA depende de genes activados por la unión de c-Myc a los sitios de baja afinidad. La regulación de la expresión de *WDR3* parece ser el resultado de la combinación de múltiples factores que podrían unirse a su región promotora, entre los cuales se encuentran CTCF y c-Myc.

TBX15

Los estudios de asociación del gen *TBX15* con el cáncer de tiroides a partir del genotipado de los SNPs rs1779420, rs10802069 y rs12408387, han mostrado que este gen no afecta a la susceptibilidad al cáncer de tiroides en la población estudiada.

DISCUSIÓN

El análisis de expresión de *TBX15* en las líneas celulares de cáncer de tiroides a nivel de mRNA revela que seis de las nueve líneas celulares de cáncer de tiroides analizadas presentan una expresión disminuida de *TBX15* en comparación con las células normales de tiroides. Sin embargo, esta disminución en la expresión no se corresponde con el análisis de la proteína TBX15 por *western blot*, el cual evidencia un aumento en la expresión de TBX15 en las líneas celulares de cáncer de tiroides en comparación con las células normales y, tanto en las células normales de tiroides como en las líneas celulares derivadas de PTC y ATC, la cantidad de proteína TBX15 parece tener una correlación negativa con la cantidad de mRNA. Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos de regulación de la expresión de *TBX15* a nivel transcripcional y postranscripcional. La expresión de *TBX15* analizada a nivel de mRNA en tejidos de tiroides muestra una disminución de su expresión en el tejido tumoral de tiroides. Estos resultados concuerdan con los encontrados en las líneas celulares de cáncer de tiroides, evidenciando que el gen *TBX15* se encuentra reprimido a nivel de la transcripción en el cáncer de tiroides.

Por otra parte, el gen *TBX15* presenta en la región distal de su promotor, una isla CpG que se ha descrito afecta a la expresión de TBX15 (Chelbi *et al.*, 2011). El análisis de la metilación del promotor distal de *TBX15* en las líneas celulares, muestra una hipermetilación generalizada que se corresponde con la disminución de la expresión de *TBX15* a nivel de mRNA en estas mismas líneas celulares, indicando que la metilación de esta región del promotor podría ser uno de los factores que regulan la expresión transcripcional de *TBX15*. Por otra parte, el análisis del mRNA de *TBX15* en tejido de tiroides muestra una expresión disminuida de este gen en el tejido tumoral de tiroides. Asimismo, el análisis de la metilación en tejidos normales y tumorales de tiroides muestra que el tejido tumoral presenta mayores niveles de metilación que el tejido normal de tiroides. Estos resultados coinciden con los encontrados en las líneas celulares de tiroides y se corresponden con los niveles de metilación encontrados en el promotor distal de *TBX15*. Recientemente se ha demostrado que *TBX15* se encuentra diferencialmente metilado en cáncer de próstata, observando que las muestras de cáncer presentan niveles de metilación significativamente más altos que las muestras benignas adyacentes al tumor y que el grado de metilación está fuertemente asociado con el estadio patológico de la enfermedad (Kron *et al.*, 2012). También las muestras de tejido

de tumor cerebral analizadas en este trabajo de tesis presentan una mayor metilación comparadas con las muestras de tejido normal de cerebro. Además, las líneas celulares derivadas de los mismos tejidos tumorales de cerebro presentan niveles de metilación altamente superiores a los tumores de los cuales provienen. Esta metilación elevada observada en las líneas celulares coincide con la elevada metilación encontrada en numerosas líneas celulares comparada con los tumores de los cuales derivan y se ha demostrado además que a pesar de que las líneas celulares de cáncer presenten una tasa incrementada de hipermetilación de ciertas islas CpG, mantienen el perfil de hipermetilación de cada tipo celular del tumor (Paz *et al.*, 2003).

VI- CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo de tesis son las siguientes.

- 1- En nuestra población de estudio la distribución de las frecuencias genotípicas de los SNPs del gen *TBX15* genotipados mostró que estos polimorfismos analizados individualmente o en combinaciones de haplotipos, no están asociados con la susceptibilidad al cáncer de tiroides.
- 2- El gen *WDR3* se encuentra sobre-expresado en las líneas celulares de cáncer de tiroides tanto a nivel de mRNA como de la proteína WDR3, además, *WDR3* se sobre-expresa en tejido tumoral de tiroides, indicando su implicación en la tumorigénesis de la glándula tiroides.
- 3- El gen *WDR3* también se sobre-expresa en tejido tumoral de colon, lo cual, sumado a la implicación de *WDR3* en cáncer de tiroides y a su papel en la biogénesis de los ribosomas, indican un papel de *WDR3* en la carcinogénesis general.
- 4- El promotor de *WDR3* se encuentra hipometilado en las líneas celulares de cáncer de tiroides y en los tejidos normales y tumorales de tiroides. Por lo tanto, las diferencias de expresión de *WDR3* a nivel de mRNA no dependen del estado de metilación de su región promotora.
- 5- Existe una correlación directa entre la cantidad de proteína CTCF y c-Myc y la expresión de *WDR3* a nivel de mRNA.
- 6- La transfección del vector de expresión del factor de transcripción c-Myc aumenta la actividad del promotor *WDR3*, medida por el ensayo de luciferasa. Además, la región de respuesta del promotor WDR3 a c-Myc se localiza entre los sitios +517 y □338.
- 7- La transfección del vector de expresión del factor de transcripción CTCF disminuye la actividad del promotor *WDR3*, medida por el ensayo de luciferasa y la región de respuesta del promotor *WDR3* a CTCF se localiza entre los sitios

CONCLUSIONES

- 1311 y □944. Además, este efecto represor de la actividad del promotor depende de la secuencia comprendida entre las posiciones □318 y +517.
- 8- Las construcciones plasmídicas con deleciones 5' y 3' del promotor de *WDR3* constituyen un modelo de estudio que permite su aplicación en el análisis de la regulación de la expresión de *WDR3* debida a la unión de factores de transcripción.
 - 9- El gen *TBX15* presenta una expresión disminuida a nivel de mRNA en las líneas celulares de cáncer de tiroides y en tejidos tumorales de tiroides, comparadas con células y tejidos normales.
 - 10- El promotor distal de *TBX15* se encuentra hipermetilado en las líneas celulares de cáncer de tiroides. Además, el tejido tumoral de tiroides se encuentra más metilado que el tejido normal de tiroides.
 - 11- El tipo de cáncer de tiroides que presenta los mayores niveles de metilación en el promotor distal de *TBX15*, es el carcinoma folicular de tiroides.
 - 12- Los tumores cerebrales se encuentran más metilados en el promotor distal de *TBX15* que el tejido normal de cerebro. Además, las líneas celulares derivadas de estos tumores cerebrales se encuentran hipermetiladas.

VII- BIBLIOGRAFÍA

A

- Agulnik SI, Papaioannou VE, Silver LM. Cloning, mapping, and expression analysis of TBX15, a new member of the T-Box gene family. *Genomics*. 1998 Jul 1;51(1):68-75.
- Akdi A, Giménez EM, García-Quispes W, Pastor S, Castell J, Biarnés J, Marcos R, Velázquez A. WDR3 gene haplotype is associated with thyroid cancer risk in a Spanish population. *Thyroid*. 2010 Jul;20(7):803-9.
- Akdi A, Pérez G, Pastor S, Castell J, Biarnés J, Marcos R, Velázquez A. Common variants of the thyroglobulin gene are associated with differentiated thyroid cancer risk. *Thyroid*. 2011 May;21(5):519-25. Epub 2011 Apr 10.
- Akhoondi S, Sun D, von der Lehr N, Apostolidou S, Klotz K, Maljukova A, Cepeda D, Fiegl H, Dafou D, Marth C, Mueller-Holzner E, Corcoran M, Dagnell M, Nejad SZ, Nayer BN, Zali MR, Hansson J, Egyhazi S, Petersson F, Sangfelt P, Nordgren H, Grander D, Reed SI, Widschwendter M, Sangfelt O, Spruck C. FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Res*. 2007 Oct 1;67(19):9006-12.
- Alvarez-Nuñez F, Bussaglia E, Mauricio D, Ybarra J, Vilar M, Lerma E, de Leiva A, Matias-Guiu X; Thyroid Neoplasia Study Group. PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid*. 2006 Jan;16(1):17-23.

B

- BAC Resource Consortium, Cheung VG, Nowak N, Jang W, Kirsch IR, Zhao S, Chen XN, Furey TS, Kim UJ, Kuo WL, Olivier M, Conroy J, Kasprzyk A, Massa H, Yonescu R, Sait S, Thoren C, Snijders A, Lemyre E, Bailey JA, Bruzel A, Burrill WD, Clegg SM, Collins S, Dhami P, Friedman C, Han CS, Herrick S, Lee J, Ligon AH, Lowry S, Morley M, Narasimhan S, Osoegawa K, Peng Z, Plajzer-Frick I, Quade BJ, Scott D, Sirotkin K, Thorpe AA, Gray JW, Hudson J, Pinkel D, Ried T, Rowen L, Shen-Ong GL, Strausberg RL, Birney E, Callen DF, Cheng JF, Cox DR, Doggett NA, Carter NP, Eichler EE, Haussler D, Korenberg JR, Morton CC, Albertson D, Schuler G, de Jong PJ, Trask BJ. Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):953-8.
- Baida A, Akdi M, González-Flores E, Galofré P, Marcos R, Velázquez A. Strong association of chromosome 1p12 loci with thyroid cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Jun;17(6):1499-504.
- Baida A, Farrington SM, Galofré P, Marcos R, Velázquez A. Thyroid cancer susceptibility and THRA1 and BAT-40 repeats polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Mar;14(3):638-42.
- Ballestar E, Esteller M. Epigenetic gene regulation in cancer. *Adv Genet*. 2008;61:247-67.
- Bamshad M, Lin RC, Law DJ, Watkins WC, Krakowiak PA, Moore ME, Franceschini P, Lala R, Holmes LB, Gebuhr TC, Bruneau BG, Schinzel A, Seidman JG, Seidman CE, Jorde LB. Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat Genet*. 1997 Jul;16(3):311-5.
- Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011 Mar;21(3):381-95. Epub 2011 Feb 15.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):669-81.

BIBLIOGRAFÍA

- Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Nov;14(11):1008-16. Epub 2007 Nov 5.
- Bongers EM, Duijf PH, van Beersum SE, Schoots J, Van Kampen A, Burckhardt A, Hamel BC, Losan F, Hoefsloot LH, Yntema HG, Knoers NV, van Bokhoven H. Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome. *Am J Hum Genet.* 2004 Jun;74(6):1239-48. Epub 2004 Apr 21.
- Bongarzone I, Vigneri P, Mariani L, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA. RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res.* 1998 Jan;4(1):223-8.
- Boron WF, Boulpaep E (Eds). *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach*, Elsevier/Saunders, pp. 1,300. 2003. ISBN: 1-4160-2328-3.
- Braybrook C, Doudney K, Marçano AC, Arnason A, Bjornsson A, Patton MA, Goodfellow PJ, Moore GE, Stanier P. The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. *Nat Genet.* 2001 Oct;29(2):179-83.
- Brummelkamp TR, Kortlever RM, Lingbeek M, Trettel F, MacDonald ME, van Lohuizen M, Bernards R. TBX-3, the gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence. *J Biol Chem.* 2002 Feb 22;277(8):6567-72. Epub 2001 Dec 17.
- Bryan EJ, Jokubaitis VJ, Chamberlain NL, Baxter SW, Dawson E, Choong DY, Campbell IG. Mutation analysis of EP300 in colon, breast and ovarian carcinomas. *Int J Cancer.* 2002 Nov 10;102(2):137-41.
- Byun HM, Siegmund KD, Pan F, Weisenberger DJ, Kanel G, Laird PW, Yang AS. Epigenetic profiling of somatic tissues from human autopsy specimens identifies tissue- and individual-specific DNA methylation patterns. *Hum Mol Genet.* 2009 Dec 15;18(24):4808-17. Epub 2009 Sep 23.
- C
- Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 13;96(8):4240-5.
- Cartier A, Parent A, Labrecque P, Laroche G, Parent JL. WDR36 acts as a scaffold protein tethering a G-protein-coupled receptor, Gαq and phospholipase Cβ in a signalling complex. *J Cell Sci.* 2011 Oct 1;124(Pt 19):3292-304. doi: 10.1242/jcs.085795.
- Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, Marano F, Ortoleva L, Poli R, Asioli S, Bandino A, Palestini N, Grange C, Bussolati B, Boccuzzi G. Histone Deacetylase Inhibition Modulates E-Cadherin Expression and Suppresses Migration and Invasion of Anaplastic Thyroid Cancer Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 May 4. [Epub ahead of print]
- Chan JKC, Hirokawa, M., Evans H, Williams ED, Osamura Y, Cady B, Sobrinho-Simoes M, Derwahl M, Paschke R, Belge G, Oriola J, Studer H, Eng C, Asa SL, Lloyd RV, Baloch Z, Ghossein R, Mazzaferri EL, Fagin JA Tumours of the thyroid and parathyroid: follicular adenoma. En: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, Eds. WHO classification of

- tumours: pathology, genetics of tumours of endocrine organs. Lyon, France: *IARC Press*; 2004, 98–103.
- Chelbi ST, Doridot L, Mondon F, Dussour C, Rebourcet R, Busato F, Gascoin-Lachambre G, Barbaux S, Rigourd V, Mignot TM, Tost J, Vaiman D. Combination of promoter hypomethylation and PDX1 overexpression leads to TBX15 decrease in vascular IUGR placentas. *Epigenetics*. 2011 Feb;6(2):247-55. Epub 2011 Feb 1.
- Chen Y, Liou CP, Tseng HH, Jan YJ, Li CF, Tzeng CC. Deletions of chromosome 1p and 15q are associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumors. *J Formos Med Assoc*. 2009 Jan;108(1):28-37.
- Chen Y, Young MA. Structure of a thyroid hormone receptor DNA-binding domain homodimer bound to an inverted palindrome DNA response element. *Mol Endocrinol*. 2010 Aug;24(8):1650-64. Epub 2010 Jul 7.
- Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jul;10(7):457-69.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*. 1994 Aug 11;22(15):2990-7.
- Claudio JO, Liew CC, Ma J, Heng HH, Stewart AK, Hawley RG. Cloning and expression analysis of a novel WD repeat gene, WDR3, mapping to 1p12-p13. *Genomics*. 1999 Jul 1;59(1):85-9.
- Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Apr 16;95(8):625-7.
- Cohen-Katsenelson K, Wasserman T, Khateb S, Whitmarsh AJ, Aronheim A. Docking interactions of the JNK scaffold protein WDR62. *Biochem J*. 2011 Nov 1;439(3):381-90. doi: 10.1042/BJ20110284.
- Conlon, F. L. and Yutzey, K T-box factors. In: Heart Development and Regeneration, Rosenthal N, Harvey RP (Eds). *Academic Press*. 2010.
- Coolen MW, Statham AL, Gardiner-Garden M, Clark SJ. Genomic profiling of CpG methylation and allelic specificity using quantitative high-throughput mass spectrometry: critical evaluation and improvements. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(18):e119. Epub 2007 Sep 13.
- Crusio KM, King B, Reavie LB, Aifantis I. The ubiquitous nature of cancer: the role of the SCF(Fbw7) complex in development and transformation. *Oncogene*. 2010 Sep 2;29(35):4865-73. Epub 2010 Jun 14.
- Cuddapah S, Jothi R, Schones DE, Roh TY, Cui K, Zhao K. Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res*. 2009 Jan;19(1):24-32. Epub 2008 Dec 3.

BIBLIOGRAFÍA

Dardano A, Falzoni S, Caraccio N, Polini A, Tognini S, Solini A, Berti P, Di Virgilio F, Monzani F. 1513A>C polymorphism in the P2X7 receptor gene in patients with papillary thyroid cancer: correlation with histological variants and clinical parameters. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(2):695-8.

de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA, de Vries EG, van der Zee AG, te Meerman GJ, ter Elst A. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One.* 2007 Sep 19;2(9):e898.

Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA, Wormsley S, Settlege RE, Shabanowitz J, Osheim Y, Beyer AL, Hunt DF, Baserga SJ. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature.* 2002 Jun 27;417(6892):967-70. Epub 2002 Jun 9.

Duo S, Tiao-Dong T, Lei Z, Wei W, Hong-Li S, Xian-Wei D. Expression and clinical significance of *tbx2* in pancreatic cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2009 Jan-Mar;10(1):118-22.

E

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2000 Apr 15;28(8):E32.

Ehrich M, Nelson MR, Stanssens P, Zabeau M, Liloglou T, Xinarianos G, Cantor CR, Field JK, van den Boom D. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 1;102(44):15785-90. Epub 2005 Oct 21.

Elisei R, Shiohara M, Koeffler HP, Fagin JA. Genetic and epigenetic alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitors p15INK4b and p16INK4a in human thyroid carcinoma cell lines and primary thyroid carcinomas. *Cancer.* 1998 Nov 15;83(10):2185-93.

Emes RD, Ponting CP. A new sequence motif linking lissencephaly, Treacher Collins and oral-facial-digital type 1 syndromes, microtubule dynamics and cell migration. *Hum Mol Genet.* 2001 Nov 15;10(24):2813-20.

Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:629-56.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007 Apr;8(4):286-98. Epub 2007 Mar 6.

Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 2007 Apr 15;16 Spec No 1:R50-9.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001 Apr 15;61(8):3225-9.

F

Farin HF, Bussen M, Schmidt MK, Singh MK, Schuster-Gossler K, Kispert A. Transcriptional repression by the T-box proteins *Tbx18* and *Tbx15* depends on Groucho corepressors. *J Biol Chem.* 2007 Aug 31;282(35):25748-59. Epub 2007 Jun 21.

- Farrar D, Rai S, Chernukhin I, Jagodic M, Ito Y, Yammine S, Ohlsson R, Murrell A, Klenova E. Mutational analysis of the poly(ADP-ribosyl)ation sites of the transcription factor CTCF provides an insight into the mechanism of its regulation by poly(ADP-ribosyl)ation. *Mol Cell Biol.* 2010 Mar;30(5):1199-216. Epub 2009 Dec 28.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 07/05/2012.
- Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, Balint B, Siebert R, Taniguchi H, Yamamoto H, Hidalgo M, Tan AC, Galm O, Ferrer I, Sanchez-Cespedes M, Villanueva A, Carmona J, Sanchez-Mut JV, Berdasco M, Moreno V, Capella G, Monk D, Ballestar E, Ropero S, Martinez R, Sanchez-Carbayo M, Prosper F, Agirre X, Fraga MF, Graña O, Perez-Jurado L, Mora J, Puig S, Prat J, Badimon L, Puca AA, Meltzer SJ, Lengauer T, Bridgewater J, Bock C, Esteller M. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res.* 2012 Feb;22(2):407-19. Epub 2011 May 25.
- Fernando RI, Litzinger M, Trono P, Hamilton DH, Schlom J, Palena C. The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. *J Clin Invest.* 2010 Feb;120(2):533-44. doi: 10.1172/JCI38379. Epub 2010 Jan 11.
- Filippova GN, Fagerlie S, Klenova EM, Myers C, Dehner Y, Goodwin G, Neiman PE, Collins SJ, Lobanenkov VV. An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol.* 1996 Jun;16(6):2802-13.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005 Apr;37(4):391-400. Epub 2005 Mar 13.
- Fraga MF, Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques.* 2002 Sep;33(3):632, 634, 636-49.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Mar 1;89(5):1827-31.
- Furey TS, Haussler D. Integration of the cytogenetic map with the draft human genome sequence. *Hum Mol Genet.* 2003 May 1;12(9):1037-44.
- Furuya F, Shimura H, Suzuki H, Taki K, Ohta K, Haraguchi K, Onaya T, Endo T, Kobayashi T. Histone deacetylase inhibitors restore radioiodide uptake and retention in poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer cells by expression of the sodium/iodide symporter thyroperoxidase and thyroglobulin. *Endocrinology.* 2004 Jun;145(6):2865-75. Epub 2004 Feb 19.
- G
- García-Quispes WA, Pérez-Machado G, Akdi A, Pastor S, Galofré P, Biarnés F, Castell J, Velázquez A, Marcos R. Association studies of OGG1, XRCC1, XRCC2 and XRCC3 polymorphisms with differentiated thyroid cancer. *Mutat Res.* 2011 May 10;709-710:67-72. Epub 2011 Mar 21.

BIBLIOGRAFÍA

- Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL, Tallini G. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol.* 2001 Mar;158(3):987-96.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987 Jul 20;196(2):261-82.
- Gesta S, Bezy O, Mori MA, Macotela Y, Lee KY, Kahn CR. Mesodermal developmental gene Tbx15 impairs adipocyte differentiation and mitochondrial respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Feb 15;108(7):2771-6. Epub 2011 Jan 31.
- Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 25;103(17):6676-81. Epub 2006 Apr 14.
- Giusti F, Falchetti A, Franceschelli F, Marini F, Tanini A, Brandi ML. Thyroid cancer: current molecular perspectives. *J Oncol.* 2010;2010:351679. Epub 2010 Mar 29.
- Goodman MT, Kolonel LN, Wilkens LR. The association of body size, reproductive factors and thyroid cancer. *Br J Cancer.* 1992 Dec;66(6):1180-4.
- Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, Kaul R, Swarbreck D, Dunham A, Scott CE, Howe KL, Woodfine K, Spencer CC, Jones MC, Gillson C, Searle S, Zhou Y, Kokocinski F, McDonald L, Evans R, Phillips K, Atkinson A, Cooper R, Jones C, Hall RE, Andrews TD, Lloyd C, Ainscough R, Almeida JP, Ambrose KD, Anderson F, Andrew RW, Ashwell RI, Aubin K, Babbage AK, Bagguley CL, Bailey J, Beasley H, Bethel G, Bird CP, Bray-Allen S, Brown JY, Brown AJ, Buckley D, Burton J, Bye J, Carder C, Chapman JC, Clark SY, Clarke G, Clee C, Cobley V, Collier RE, Corby N, Coville GJ, Davies J, Deadman R, Dunn M, Earthrowl M, Ellington AG, Errington H, Frankish A, Frankland J, French L, Garner P, Garnett J, Gay L, Ghori MR, Gibson R, Gilby LM, Gillett W, Glithero RJ, Grafham DV, Griffiths C, Griffiths-Jones S, Grocock R, Hammond S, Harrison ES, Hart E, Haugen E, Heath PD, Holmes S, Holt K, Howden PJ, Hunt AR, Hunt SE, Hunter G, Isherwood J, James R, Johnson C, Johnson D, Joy A, Kay M, Kershaw JK, Kibukawa M, Kimberley AM, King A, Knights AJ, Lad H, Laird G, Lawlor S, Leongamornlert DA, Lloyd DM, Loveland J, Lovell J, Lush MJ, Lyne R, Martin S, Mashreghi-Mohammadi M, Matthews L, Matthews NS, McLaren S, Milne S, Mistry S, Moore MJ, Nickerson T, O'Dell CN, Oliver K, Palmeiri A, Palmer SA, Parker A, Patel D, Pearce AV, Peck AI, Pelan S, Phelps K, Phillimore BJ, Plumb R, Rajan J, Raymond C, Rouse G, Saenphimmachak C, Sehra HK, Sheridan E, Shownkeen R, Sims S, Skuce CD, Smith M, Steward C, Subramanian S, Sycamore N, Tracey A, Tromans A, Van Helmond Z, Wall M, Wallis JM, White S, Whitehead SL, Wilkinson JE, Willey DL, Williams H, Wilming L, Wray PW, Wu Z, Coulson A, Vaudin M, Sulston JE, Durbin R, Hubbard T, Wooster R, Dunham I, Carter NP, McVean G, Ross MT, Harrow J, Olson MV, Beck S, Rogers J, Bentley DR, Banerjee R, Bryant SP, Burford DC, Burrill WD, Clegg SM, Dhami P, Dovey O, Faulkner LM, Gribble SM, Langford CF, Pandian RD, Porter KM, Prigmore E. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature.* 2006 May 18;441(7091):315-21.
- Greenberg VL, Williams JM, Cogswell JP, Mendenhall M, Zimmer SG. Histone deacetylase inhibitors promote apoptosis and differential cell cycle arrest in anaplastic thyroid cancer cells. *Thyroid.* 2001 Apr;11(4):315-25.
- Griffith OL, Montgomery SB, Bernier B, Chu B, Kasaian K, Aerts S, Mahony S, Sleumer MC, Bilenky M, Haeussler M, Griffith M, Gallo SM, Giardine B, Hooghe B, Van Loo P, Blanco

- E, Ticoll A, Lithwick S, Portales-Casamar E, Donaldson IJ, Robertson G, Wadelius C, De Bleser P, Vlieghe D, Halfon MS, Wasserman W, Hardison R, Bergman CM, Jones SJ; Open Regulatory Annotation Consortium. ORegAnno: an open-access community-driven resource for regulatory annotation. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36(Database issue):D107-13. Epub 2007 Nov 15.
- Guan H, Ji M, Hou P, Liu Z, Wang C, Shan Z, Teng W, Xing M. Hypermethylation of the DNA mismatch repair gene hMLH1 and its association with lymph node metastasis and T1799A BRAF mutation in patients with papillary thyroid cancer. *Cancer.* 2008 Jul 15;113(2):247-55.
- Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A, Bergthorsson JT, He H, Blondal T, Geller F, Jakobsdottir M, Magnusdottir DN, Matthiasdottir S, Stacey SN, Skarphedinsson OB, Helgadóttir H, Li W, Nagy R, Aguillo E, Faure E, Prats E, Saez B, Martinez M, Eyjolfsson GI, Bjornsdottir US, Holm H, Kristjansson K, Frigge ML, Kristvinsson H, Gulcher JR, Jonsson T, Rafnar T, Hjartarsson H, Mayordomo JI, de la Chapelle A, Hrafnkelsson J, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet.* 2009; 41:460-4.
- H
- Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate.* 2004 May 1;59(2):177-89.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- Handschug K, Sperling S, Yoon SJ, Hennig S, Clark AJ, Huebner A. Triple A syndrome is caused by mutations in AAAS, a new WD-repeat protein gene. *Hum Mol Genet.* 2001 Feb 1;10(3):283-90.
- Hansel DE, Rahman A, House M, Ashfaq R, Berg K, Yeo CJ, Maitra A. Met proto-oncogene and insulin-like growth factor binding protein 3 overexpression correlates with metastatic ability in well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms. *Clin Cancer Res.* 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6152-8.
- He ML, Chen Y, Peng Y, Jin D, Du D, Wu J, Lu P, Lin MC, Kung HF. Induction of apoptosis and inhibition of cell growth by developmental regulator hTBX5. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Sep 20;297(2):185-92.
- He H, Nagy R, Liyanarachchi S, Jiao H, Li W, Suster S, Kere J, de la Chapelle A. A susceptibility locus for papillary thyroid carcinoma on chromosome 8q24. *Cancer Res.* 2009; 69:625-31.
- Hemminki K, Eng C, Chen B. Familial risks for nonmedullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Oct;90(10):5747-53. Epub 2005 Jul 19.
- Henning KA, Li L, Iyer N, McDaniel LD, Reagan MS, Legerski R, Schultz RA, Stefanini M, Lehmann AR, Mayne LV, Friedberg EC. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF. *Cell.* 1995 Aug 25;82(4):555-64.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003 Nov 20;349(21):2042-54.

BIBLIOGRAFÍA

- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9821-6.
- Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Lin A, Kluger HM, Berger AJ, Cheng E, Trombetta ES, Wu T, Niinobe M, Yoshikawa K, Hannigan GE, Halaban R. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res*. 2004 Aug 1;64(15):5270-82.
- Hölzel M, Rohrmoser M, Schlee M, Grimm T, Harasim T, Malamoussi A, Gruber-Eber A, Kremmer E, Hiddemann W, Bornkamm GW, Eick D. . Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. *J Cell Biol*. 2005 Aug 1;170(3):367-78. Epub 2005 Jul 25
- Ho T, Li G, Lu J, Zhao C, Wei Q, Sturgis EM. Association of XRCC1 polymorphisms and risk of differentiated thyroid carcinoma: a case-control analysis. *Thyroid*. 2009;19(2):129-35.
- Ho YS, Tseng SC, Chin TY, Hsieh LL, Lin JD. p53 gene mutation in thyroid carcinoma. *Cancer Lett*. 1996 May 15;103(1):57-63.
- Holland EC, Sonenberg N, Pandolfi PP, Thomas G. Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2004 Apr 19;23(18):3138-44.
- Honoré B, Baandrup U, Nielsen S, Vorum H. Endonuclein is a cell cycle regulated WD-repeat protein that is up-regulated in adenocarcinoma of the pancreas. *Oncogene*. 2002 Feb 7;21(7):1123-9.
- Hoogaars WM, Barnett P, Rodriguez M, Clout DE, Moorman AF, Goding CR, Christoffels VM. TBX3 and its splice variant TBX3 + exon 2a are functionally similar. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008 Jun;21(3):379-87. Epub 2008 Apr 26.
- Hoque MO, Rosenbaum E, Westra WH, Xing M, Ladenson P, Zeiger MA, Sidransky D, Umbrecht CB. Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jul;90(7):4011-8. Epub 2005 Apr 19.
- Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condouris S, Wang Y, Trink A, El-Naggar AK, Tallini G, Vasko V, Xing M. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 15;13(4):1161-70.
- Hu S, Liu D, Tufano RP, Carson KA, Rosenbaum E, Cohen Y, Holt EH, Kiseljak-Vassiliades K, Rhoden KJ, Tolaney S, Condouris S, Tallini G, Westra WH, Umbrecht CB, Zeiger MA, Califano JA, Vasko V, Xing M. Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Int J Cancer*. 2006 Nov 15;119(10):2322-9.
- Hubbard TJ, Aken BL, Ayling S, Ballester B, Beal K, Bragin E, Brent S, Chen Y, Clapham P, Clarke L, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Fernandez-Banet J, Gordon L, Graf S, Haider S, Hammond M, Holland R, Howe K, Jenkinson A, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Kokocinski F, Kulesha E, Lawson D, Longden I, Megy K, Meidl P, Overduin B, Parker A, Pritchard B, Rios D, Schuster M, Slater G, Smedley D, Spooner W, Spudich G, Trevanion S, Vilella A, Vogel J, White S, Wilder S, Zadissa A, Birney E, Cunningham F, Curwen V, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Herrero J, Kasprzyk A, Proctor G, Smith J, Searle S, Flicek P. Ensembl 2009. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37(Database issue):D690-7.

I

Ito Y, Koessler T, Ibrahim AE, Rai S, Vowler SL, Abu-Amero S, Silva AL, Maia AT, Huddleston JE, Uribe-Lewis S, Woodfine K, Jagodic M, Nativio R, Dunning A, Moore G, Klenova E, Bingham S, Pharoah PD, Brenton JD, Beck S, Sandhu MS, Murrell A. Somatically acquired hypomethylation of IGF2 in breast and colorectal cancer. *Hum Mol Genet.* 2008 Sep 1;17(17):2633-43. Epub 2008 Jun 9.

J

Jacobs JJ, Keblusek P, Robanus-Maandag E, Kristel P, Lingbeek M, Nederlof PM, van Welsem T, van de Vijver MJ, Koh EY, Daley GQ, van Lohuizen M. Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet.* 2000 Nov;26(3):291-9.

Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B, de la Chapelle A. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(5):1502-5

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1074-80.

Jiang C, Pugh BF. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet.* 2009 Mar;10(3):161-72.

Jiang M, Zhang Y, Fei J, Chang X, Fan W, Qian X, Zhang T, Lu D. Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfite-PCR sequencing traces. *Lab Invest.* 2010 Feb;90(2):282-90. Epub 2009 Dec 14.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002 Jun;3(6):415-28.

Joseph B, Ji M, Liu D, Hou P, Xing M. Lack of mutations in the thyroid hormone receptor (TR) alpha and beta genes but frequent hypermethylation of the TRbeta gene in differentiated thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Dec;92(12):4766-70. Epub 2007 Oct 2.

K

Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI, Green RD, Zhang MQ, Lobanenkov VV, Ren B. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell.* 2007 Mar 23;128(6):1231-45.

Kirk EP, Sunde M, Costa MW, Rankin SA, Wolstein O, Castro ML, Butler TL, Hyun C, Guo G, Otway R, Mackay JP, Waddell LB, Cole AD, Hayward C, Keogh A, Macdonald P, Griffiths L, Fatkin D, Sholler GF, Zorn AM, Feneley MP, Winlaw DS, Harvey RP. Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2007 Aug;81(2):280-91. Epub 2007 Jun 15.

Kitazono M, Robey R, Zhan Z, Sarlis NJ, Skarulis MC, Aikou T, Bates S, Fojo T. Low concentrations of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228), increase expression of the Na(+)/I(-) symporter and iodine accumulation in poorly differentiated thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jul;86(7):3430-5.

BIBLIOGRAFÍA

- Knobel M, Medeiros-Neto G. Relevance of iodine intake as a reputed predisposing factor for thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Jul;51(5):701-12.
- Kondo T, Zheng L, Liu W, Kurebayashi J, Asa SL, Ezzat S. Epigenetically controlled fibroblast growth factor receptor 2 signaling imposes on the RAS/BRAF/mitogen-activated protein kinase pathway to modulate thyroid cancer progression. *Cancer Res*. 2007 Jun 1;67(11):5461-70.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):693-705.
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. PAX8-PPARGgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science*. 2000 Aug 25;289(5483):1357-60.
- Kron K, Liu L, Trudel D, Pethe V, Trachtenberg J, Fleshner N, Bapat B, van der Kwast T. Correlation of ERG Expression and DNA Methylation Biomarkers with Adverse Clinicopathologic Features of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 May 15;18(10):2896-904. Epub 2012 Mar 27.
- L
- Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell*. 2001 Mar 23;104(6):849-59.
- Landa I, Montero-Conde C, Malanga D, De Gisi S, Pita G, Leandro-García LJ, Inglada-Pérez L, Letón R, De Marco C, Rodríguez-Antona C, Viglietto G, Robledo M. Allelic variant at -79 (C>T) in CDKN1B (p27Kip1) confers an increased risk of thyroid cancer and alters mRNA levels. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(2):317-28.
- Lausch E, Hermanns P, Farin HF, Alanay Y, Unger S, Nikkel S, Steinwender C, Scherer G, Spranger J, Zabel B, Kispert A, Superti-Furga A. TBX15 mutations cause craniofacial dysmorphism, hypoplasia of scapula and pelvis, and short stature in Cousin syndrome. *Am J Hum Genet*. 2008 Nov;83(5):649-55.
- Leenhardt L, Aurengo A. Post-Chernobyl thyroid carcinoma in children. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2000 Dec;14(4):667-77.
- Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Williams ED, Goyns M, Stringer B, Wynford-Thomas D. High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene*. 1989 Feb;4(2):159-64.
- Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T, Bonnet D, Lyonnet S, Young ID, Raeburn JA, Buckler AJ, Law DJ, Brook JD. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet*. 1997 Jan;15(1):21-9.
- Li D, Roberts R. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Dec;58(14):2085-97.
- Lin JC, Jeong S, Liang G, Takai D, Fatemi M, Tsai YC, Egger G, Gal-Yam EN, Jones PA. Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer Cell*. 2007 Nov;12(5):432-44.

Liu D, Hu S, Hou P, Jiang D, Condouris S, Xing M. Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 15;13(4):1341-9.

Lomnytska M, Dubrovskaya A, Hellman U, Volodko N, Souchelnytskyi S. Increased expression of cSHMT, Tbx3 and utrophin in plasma of ovarian and breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2006 Jan 15;118(2):412-21.

Lo Nigro C, Chong CS, Smith AC, Dobyns WB, Carrozzo R, Ledbetter DH. Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet.* 1997 Feb;6(2):157-64.

Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 9;105(36):13556-61. Epub 2008 Sep 3.

Lyng H, Brøvig RS, Svendsrud DH, Holm R, Kaalhus O, Knutstad K, Oksefjell H, Sundfør K, Kristensen GB, Stokke T. Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer. *BMC Genomics.* 2006 Oct 20;7:268.

M

Masuda Alford E, Hu MI, Ahn P, Lamont JP. **Thyroid and Parathyroid Cancers.** En Haller DG, Wagman LD, Camphausen KA, Hoskins WJ. Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. Medical, Surgical, & Radiation Oncology. Publisher: *UBM Medical* 2011

McMahon M, Ayllón V, Panov KI, O'Connor R. Ribosomal 18 S RNA processing by the IGF-I-responsive WDR3 protein is integrated with p53 function in cancer cell proliferation. *J Biol Chem.* 2010 Jun 11;285(24):18309-18. Epub 2010 Apr 14.

Mears L, Diaz-Cano SJ. Difference between familial and sporadic medullary thyroid carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2003 Feb;27(2):266-7.

Mertens F, Johansson B, Höglund M, Mitelman F. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res.* 1997 Jul 1;57(13):2765-80.

Migliori V, Müller J, Phalke S, Low D, Bezzi M, Mok WC, Sahu SK, Gunaratne J, Capasso P, Bassi C, Cecatiello V, De Marco A, Blackstock W, Kuznetsov V, Amati B, Mapelli M, Guccione E. Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin maintenance. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Jan 8;19(2):136-44. doi: 10.1038/nsmb.2209.

Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature.* 2007 Aug 2;448(7153):553-60. Epub 2007 Jul 1.

Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.). Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (2012). <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

BIBLIOGRAFÍA

Montgomery SB, Griffith OL, Sleumer MC, Bergman CM, Bilenky M, Pleasance ED, Prychyna Y, Zhang X, Jones SJ. ORegAnno: an open access database and curation system for literature-derived promoters, transcription factor binding sites and regulatory variation. *Bioinformatics*. 2006 Mar 1;22(5):637-40. Epub 2006 Jan 5.

N

Naiche LA, Harrelson Z, Kelly RG, Papaioannou VE. T-box genes in vertebrate development. *Annu Rev Genet*. 2005;39:219-39.

Negri E, Dal Maso L, Ron E, La Vecchia C, Mark SD, Preston-Martin S, McTiernan A, Kolonel L, Yoshimoto Y, Jin F, Wingren G, Rosaria Galanti M, Hardell L, Glatte E, Lund E, Levi F, Linos D, Braga C, Franceschi S. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. II. Menstrual and reproductive factors. *Cancer Causes Control*. 1999 Apr;10(2):143-55.

Neumann S, Schuchardt K, Reske A, Reske A, Emmrich P, Paschke R. Lack of correlation for sodium iodide symporter mRNA and protein expression and analysis of sodium iodide symporter promoter methylation in benign cold thyroid nodules. *Thyroid*. 2004 Feb;14(2):99-111.

Niazi AK, Niazi SK. Endocrine effects of Fukushima: Radiation-induced endocrinopathy. *Indian J Endocrinol Metab*. 2011 Apr;15(2):91-5.

Nicholas AK, Khurshid M, Désir J, Carvalho OP, Cox JJ, Thornton G, Kausar R, Ansar M, Ahmad W, Verloes A, Passemard S, Misson JP, Lindsay S, Gergely F, Dobyns WB, Roberts E, Abramowicz M, Woods CG. WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly. *Nat Genet*. 2010 Nov;42(11):1010-4. Epub 2010 Oct 3.

Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Nov;88(11):5399-404.

Nosé V. Thyroid cancer of follicular cell origin in inherited tumor syndromes. *Adv Anat Pathol*. 2010 Nov;17(6):428-36.

Nosé V. Familial thyroid cancer: a review. *Mod Pathol*. 2011 Apr;24 Suppl 2:S19-33.

O

Ogasawara S, Maesawa C, Yamamoto M, Akiyama Y, Wada K, Fujisawa K, Higuchi T, Tomisawa Y, Sato N, Endo S, Saito K, Masuda T. Disruption of cell-type-specific methylation at the Maspin gene promoter is frequently involved in undifferentiated thyroid cancers. *Oncogene*. 2004 Feb 5;23(5):1117-24.

P

Packham EA, Brook JD. T-box genes in human disorders. *Hum Mol Genet*. 2003 Apr 1;12 Spec No 1:R37-44.

Palena C, Polev DE, Tsang KY, Fernando RI, Litzinger M, Krukovskaya LL, Baranova AV, Kozlov AP, Schlom J. The human T-box mesodermal transcription factor Brachyury is a

- candidate target for T-cell-mediated cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 15;13(8):2471-8.
- Papaioannou VE. T-box genes in development: from hydra to humans. *Int Rev Cytol.* 2001;207:1-70.
- Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, Esteller M. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 2003 Mar 1;63(5):1114-21.
- Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, Hinsch N, Hansmann ML, Selkinski I, Grünwald F, Vorländer C, Wahl RA, Bechstein WO, Zeuzem S, Holzer K, Badenhop K. Vitamin D receptor polymorphisms in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2009;19(6):623-8.
- Peres J, Davis E, Mowla S, Bennett DC, Li JA, Wansleben S, Prince S. The Highly Homologous T-Box Transcription Factors, TBX2 and TBX3, Have Distinct Roles in the Oncogenic Process. *Genes Cancer.* 2010 Mar;1(3):272-82.
- Porra V, Ferraro-Peyret C, Durand C, Selmi-Ruby S, Giroud H, Berger-Dutrieux N, Decaussin M, Peix JL, Bournaud C, Orgiazzi J, Borson-Chazot F, Dante R, Rousset B. Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 May;90(5):3028-35. Epub 2005 Feb 1.
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010 Oct;28(10):1057-68.
- Prince S, Carreira S, Vance KW, Abrahams A, Goding CR. Tbx2 directly represses the expression of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res.* 2004 Mar 1;64(5):1669-74.
- R
- Rainier S, Dobry CJ, Feinberg AP. Loss of imprinting in hepatoblastoma. *Cancer Res.* 1995 May 1;55(9):1836-8.
- Redmond KL, Crawford NT, Farmer H, D'Costa ZC, O'Brien GJ, Buckley NE, Kennedy RD, Johnston PG, Harkin DP, Mullan PB. T-box 2 represses NDRG1 through an EGR1-dependent mechanism to drive the proliferation of breast cancer cells. *Oncogene.* 2010 Jun 3;29(22):3252-62. Epub 2010 Mar 29.
- Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1089-93.
- Renard CA, Labalette C, Armengol C, Cougot D, Wei Y, Cairo S, Pineau P, Neuveut C, de Reyniès A, Dejean A, Perret C, Buendia MA. Tbx3 is a downstream target of the Wnt/beta-catenin pathway and a critical mediator of beta-catenin survival functions in liver cancer. *Cancer Res.* 2007 Feb 1;67(3):901-10.
- Rodriguez M, Aladowicz E, Lanfrancone L, Goding CR. Tbx3 represses E-cadherin expression and enhances melanoma invasiveness. *Cancer Res.* 2008 Oct 1;68(19):7872-81.
- Ron E, Lubin JH, Shore RE, Mabuchi K, Modan B, Pottern LM, Schneider AB, Tucker MA, Boice JD Jr. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res.* 1995 Mar;141(3):259-77.

BIBLIOGRAFÍA

Rosenbloom KR, Dreszer TR, Pheasant M, Barber GP, Meyer LR, Pohl A, Raney BJ, Wang T, Hinrichs AS, Zweig AS, Fujita PA, Learned K, Rhead B, Smith KE, Kuhn RM, Karolchik D, Haussler D, Kent WJ. ENCODE whole-genome data in the UCSC Genome Browser. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan;38(Database issue):D620-5. Epub 2009 Nov 17.

Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer.* 2003 Mar;3(3):179-92.

S

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989. 1: 1-62.

Sandelin A, Alkema W, Engström P, Wasserman WW, Lenhard B. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 1;32(Database issue):D91-4.

Sato N, Koinuma J, Fujita M, Hosokawa M, Ito T, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y. Activation of WD repeat and high-mobility group box DNA binding protein 1 in pulmonary and esophageal carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2010 Jan 1;16(1):226-39. Epub 2009 Dec 22.

Schubert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007 Apr;7(4):295-308.

Shapiro R, Braverman B, Louis JB, Servis RE. Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J Biol Chem.* 1973 Jun 10;248(11):4060-4.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010 Jan;31(1):27-36. Epub 2009 Sep 13.

Shen Z, Sathyan KM, Geng Y, Zheng R, Chakraborty A, Freeman B, Wang F, Prasanth KV, Prasanth SG. A WD-repeat protein stabilizes ORC binding to chromatin. *Mol Cell.* 2010 Oct 8;40(1):99-111.

Silva FP, Hamamoto R, Nakamura Y, Furukawa Y. WDRPUH, a novel WD-repeat-containing protein, is highly expressed in human hepatocellular carcinoma and involved in cell proliferation. *Neoplasia.* 2005 Apr;7(4):348-55.

Schagdarsurengin U, Gimm O, Hoang-Vu C, Dralle H, Pfeifer GP, Dammann R. Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2002 Jul 1;62(13):3698-701.

Schagdarsurengin U, Richter AM, Wöhler C, Dammann RH. Frequent epigenetic inactivation of RASSF10 in thyroid cancer. *Epigenetics.* 2009 Nov 16;4(8):571-6. Epub 2009 Nov 14.

Schlosser I, Hölzel M, Mürnseer M, Burtscher H, Weidle UH, Eick D. A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res.* 2003 Nov 1;31(21):6148-56.

Sinclair CS, Adem C, Naderi A, Soderberg CL, Johnson M, Wu K, Wadum L, Couch VL, Sellers TA, Schaid D, Slezak J, Fredericksen Z, Ingle JN, Hartmann L, Jenkins RB, Couch FJ. TBX2 is preferentially amplified in BRCA1- and BRCA2-related breast tumors. *Cancer Res.* 2002 Jul 1;62(13):3587-91.

- Singh MK, Petry M, Haenig B, Lescher B, Leitges M, Kispert A. The T-box transcription factor Tbx15 is required for skeletal development. *Mech Dev.* 2005 Feb;122(2):131-44.
- Skarie JM, Link BA. The primary open-angle glaucoma gene WDR36 functions in ribosomal RNA processing and interacts with the p53 stress-response pathway. *Hum Mol Genet.* 2008 Aug 15;17(16):2474-85. Epub 2008 May 10.
- Smiraglia DJ, Rush LJ, Frühwald MC, Dai Z, Held WA, Costello JF, Lang JC, Eng C, Li B, Wright FA, Caligiuri MA, Plass C. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet.* 2001 Jun 15;10(13):1413-9.
- Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Lee JY, Nam SW. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS.* 2005 Apr;113(4):264-8.
- Steilen-Gimbel H, Niedermayer I, Feiden W, Freiler A, Steudel WI, Zang KD, Henn W. Unbalanced translocation t(1;3)(p12-13;q11) in meningiomas as the unique feature of chordoid differentiation. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999 Nov;26(3):270-2.
- Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, Simon I, Yakhini Z, Cedar H. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 May;16(5):564-71. Epub 2009 Apr 19.
- Strezoska Z, Pestov DG, Lau LF. Bop1 is a mouse WD40 repeat nucleolar protein involved in 28S and 5. 8S rRNA processing and 60S ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug;20(15):5516-28.
- Strezoska Z, Pestov DG, Lau LF. Functional inactivation of the mouse nucleolar protein Bop1 inhibits multiple steps in pre-rRNA processing and blocks cell cycle progression. *J Biol Chem.* 2002 Aug 16;277(33):29617-25. Epub 2002 Jun 4.
- Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet.* 2008 Jun;9(6):465-76.
- T
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76. Epub 2006 Aug 10.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.
- Tallini G, Santoro M, Helie M, Carlomagno F, Salvatore G, Chiappetta G, Carcangiu ML, Fusco A. RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes. *Clin Cancer Res.* 1998 Feb;4(2):287-94.
- Tamimi Y, Ziebart K, Desaulniers N, Dietrich K, Grundy P. Identification of a minimal region of loss on the short arm of chromosome 1 in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007 Apr;46(4):327-35
- Tan Y, Sangfelt O, Spruck C. The Fbxw7/hCdc4 tumor suppressor in human cancer. *Cancer Lett.* 2008 Nov 18;271(1):1-12. Epub 2008 Jun 9.

BIBLIOGRAFÍA

Teoh SS, Whisstock JC, Bird PI. Maspin (SERPINB5) is an obligate intracellular serpin. *J Biol Chem*. 2010 Apr 2;285(14):10862-9. Epub 2010 Feb 1.

The UniProt Consortium. **Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt).** *Nucleic Acids Res*. 40: D71-D75 (2012).

Thompson RF, Suzuki M, Lau KW, Greally JM. A pipeline for the quantitative analysis of CG dinucleotide methylation using mass spectrometry. *Bioinformatics*. 2009 Sep 1;25(17):2164-70. Epub 2009 Jun 26.

Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2265-75.

Tremplus CS, Wei SJ, Humble MM, Dang H, Bortner CD, Sifre MI, Kissling GE, Sunman JA, Akiyama SK, Roberts JD, Tucker CJ, Chun KS, Tennant RW, Langenbach R. A novel role for the T-box transcription factor Tbx1 as a negative regulator of tumor cell growth in mice. *Mol Carcinog*. 2011 Dec;50(12):981-91. doi: 10.1002/mc.20768. Epub 2011 Mar 22.

Turner AJ, Knox AA, Prieto JL, McStay B, Watkins NJ. A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4. *Mol Cell Biol*. 2009 Jun;29(11):3007-17. Epub 2009 Mar 30.

V

Vance KW, Carreira S, Brosch G, Goding CR. Tbx2 is overexpressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas. *Cancer Res*. 2005 Mar 15;65(6):2260-8.

Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB. Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I⁻symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Jul;84(7):2449-57.

Vostrov AA, Quitschke WW. The zinc finger protein CTCF binds to the APBbeta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation. *J Biol Chem*. 1997 Dec 26;272(52):33353-9.

W

Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, Johnson DC, Gonzalez D, Dagrada GP, Protheroe RK, Konn ZJ, Stockley DM, Gregory WM, Davies FE, Ross FM, Morgan GJ. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*. 2010 Oct 14;116(15):e56-65. Epub 2010 Jul 8.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004 Mar 19;116(6):855-67.

Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res*. 1980 Oct 24;8(20):4777-90.

Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ, Zhao K. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet*. 2008 Jul;40(7):897-903. Epub 2008 Jun 15.

Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jan;1775(1):138-62. Epub 2006 Sep 1.

Wilson V, Conlon FL. The T-box family. *Genome Biol*. 2002;3(6):REVIEWS3008. Epub 2002 May 31.

Wingender E, Chen X, Hehl R, Karas H, Liebich I, Matys V, Meinhardt T, Prüss M, Reuter I, Schacherer F. TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jan 1;28(1):316-9.

X

Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Jun;12(2):245-62.

Xing M, Tokumaru Y, Wu G, Westra WB, Ladenson PW, Sidransky D. Hypermethylation of the Pendred syndrome gene SLC26A4 is an early event in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res*. 2003a May 1;63(9):2312-5.

Xing M, Usadel H, Cohen Y, Tokumaru Y, Guo Z, Westra WB, Tong BC, Tallini G, Udelsman R, Califano JA, Ladenson PW, Sidransky D. Methylation of the thyroid-stimulating hormone receptor gene in epithelial thyroid tumors: a marker of malignancy and a cause of gene silencing. *Cancer Res*. 2003b May 1;63(9):2316-21.

Y

Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet*. 2003 Oct 25;362(9393):1366-73.

Yarosh W, Barrientos T, Esmailpour T, Lin L, Carpenter PM, Osann K, Anton-Culver H, Huang T. TBX3 is overexpressed in breast cancer and represses p14 ARF by interacting with histone deacetylases. *Cancer Res*. 2008 Feb 1;68(3):693-9.

Yu J, Ma X, Cheung KF, Li X, Tian L, Wang S, Wu CW, Wu WK, He M, Wang M, Ng SS, Sung JJ. Epigenetic inactivation of T-box transcription factor 5, a novel tumor suppressor gene, is associated with colon cancer. *Oncogene*. 2010 Dec 9;29(49):6464-74. Epub 2010 Aug 30.

Yu TW, Mochida GH, Tischfield DJ, Sgaier SK, Flores-Sarnat L, Sergi CM, Topçu M, McDonald MT, Barry BJ, Felie JM, Sunu C, Dobyns WB, Folkert RD, Barkovich AJ, Walsh CA. Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. *Nat Genet*. 2010 Nov;42(11):1015-20. Epub 2010 Oct 3.

Z

Zhang J, Glatfelter AA, Taetle R, Trent JM. Frequent alterations of evolutionarily conserved regions of chromosome 1 in human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999 Jun;111(2):119-23.

Zuo H, Gandhi M, Edreira MM, Hochbaum D, Nimgaonkar VL, Zhang P, Dipaola J, Evdokimova V, Altschuler DL, Nikiforov YE. Downregulation of Rap1GAP through epigenetic silencing and loss of heterozygosity promotes invasion and progression of thyroid tumors. *Cancer Res*. 2010 Feb 15;70(4):1389-97. Epub 2010 Feb 2.