



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Facultad de Biociencias  
Departamento de Genética y de Microbiología  
Grupo de Mutagénesis

**SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL CÁNCER  
DE TIROIDES: ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN  
DE LAS REGIONES DEL GENOMA 1p12 Y 8q**

**TESIS DOCTORAL**

Abdelmounaim Akdi  
2011



# **SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL CÁNCER DE TIROIDES: ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE LAS REGIONES DEL GENOMA 1p12 Y 8q**

Memoria presentada por Abdelmounaim Akdi, para optar al  
grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Abdelmounaim Akdi  
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)  
2011

**VºBº**  
**Directores de la Tesis**

**Dr. Ricard Marcos Dauder**

**Dra. Antonia Velázquez Henar**



*À mi madre*





"وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا" طه 114

“And say: "My Lord! Increase me in knowledge."

The Noble Quran, Ta Ha 114

“Y di: ¡Señor! Concédeme más conocimiento”

El Noble Corán, Ta Ha 114





## AGRADECIMIENTOS

---

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte del autor y sus directores de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

Primero y antes que nada, dar gracias a **Dios**, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Agradecer hoy y siempre a mi familia porque a pesar de no estar presentes físicamente, se que procuran mi bienestar desde mi país, Marruecos, y esta claro que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mis estudios de tercer ciclo no hubiesen sido posibles. A mis sobrinos Nizar y Ziyad, porque a pesar de la distancia, el ánimo, apoyo y alegría que me brindan me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

De igual manera mi más sincero agradecimiento a los Doctores Antonia Velázquez y Ricard Marcos. Así también a todo el personal del Departamento de Genética y de Microbiología sobre todo a Glòria, Lourdes y Cristian.

A mis amigos en Barcelona Ihab, Fadi, Hamada, Majid, Tarik, Jawad, Laila, Amélie, Gaelle y Anne, personas que desde el primer momento me brindaron y me brindan todo el apoyo, colaboración y cariño sin ningún interés.

Un agradecimiento especial a Esteban, Wilser, Eli, Jessica, Susana, Arturo y Aida por su ayuda cuando más la necesitaba, por ser unas personas con las que puedo contar siempre, por el cariño que me brindan y los ánimos que me dan. A todos los miembros del Departamento por compartir conmigo muchos momentos tanto alegres como tristes, por ayudarme, en fin, por darme su amistad desde el día que me conocieron.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

# TABLA DE CONTENIDO

---

<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>V</b>
-------------------------	----------

---

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>VII</b>
--------------------------	------------

---

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>IX</b>
---------------------	-----------

---

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
-----------------------	----------

---

<b>1.1 LA GLÁNDULA TIROIDES</b>	<b>1</b>
---------------------------------	----------

<b>1.2 PATOLOGÍAS DE LA GLÁNDULA TIROIDES</b>	<b>3</b>
---	----------

1.2.1 HIPERTIROIDISMO	3
-----------------------	---

1.2.2 HIPOTIROIDISMO	4
----------------------	---

1.2.3 CÁNCER DE TIROIDES	4
--------------------------	---

1.2.3.1 Base genética del cáncer de tiroides	7
--	---

1.2.3.2 Diagnóstico y tratamiento del cáncer de tiroides	10
--	----

<b>1.3 SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL CÁNCER</b>	<b>14</b>
---	-----------

1.3.1 FACTORES GENÉTICOS IDENTIFICADOS POR ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN INTEGRAL DEL GENOMA	16
---	----

1.3.2 FACTORES EPIGENÉTICOS	19
-----------------------------	----

<b>1.4 FACTORES DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES</b>	<b>21</b>
--	-----------

1.4.1 FACTORES AMBIENTALES DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES	21
---	----

1.4.2 FACTORES GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES	23
---	----

<b>1.5 REGIONES DEL GENOMA ASOCIADAS AL CÁNCER DE TIROIDES</b>	<b>30</b>
--	-----------

1.5.1 LA REGIÓN 1p12	31
----------------------	----

1.5.2 LA REGIÓN 8q	32
--------------------	----

<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
--------------------	-----------

---

<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
-------------------------------	-----------

---

<b>3.1 MUESTRAS DE PACIENTES Y CONTROLES</b>	<b>39</b>
--	-----------

<b>3.2 LÍNEAS CELULARES</b>	<b>39</b>
-----------------------------	-----------

<b>3.3 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b>	<b>41</b>
---	-----------

3.3.1 EXTRACCIÓN DE DNA	41
-------------------------	----

3.3.2	EXTRACCIÓN DE RNA	42
<b>3.4</b>	<b>EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS</b>	<b>43</b>
<b>3.5</b>	<b>AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN <i>WDR3</i></b>	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>SÍNTESIS DE CDNA DEL GEN <i>WDR3</i> POR RT-PCR</b>	<b>44</b>
<b>3.7</b>	<b>SECUENCIACIÓN DEL DNA</b>	<b>45</b>
<b>3.8</b>	<b>WESTERN BLOT</b>	<b>46</b>
<b>3.9</b>	<b>ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL DNA</b>	<b>47</b>
<b>3.10</b>	<b>GENOTIPADO</b>	<b>48</b>
3.10.1	SELECCIÓN DE SNPs	49
3.10.2	MÉTODO DE GENOTIPADO	49
3.10.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>POBLACIÓN ESTUDIADA EN LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN CASO-CONTROL</b>	<b>53</b>
<b>4.2</b>	<b>ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LA REGIÓN 1p12 CON EL CÁNCER DE TIROIDES</b>	<b>54</b>
4.2.1	IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS POLIMORFISMOS EN EL GEN <i>WDR3</i>	54
4.2.1.1	Secuenciación de la región codificadora del gen <i>WDR3</i>	54
4.2.1.2	Secuenciación de la región promotora del gen <i>WDR3</i>	56
4.2.2	ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN <i>WDR3</i> CON EL CÁNCER DE TIROIDES	57
4.2.2.1	Primer estudio de asociación del gen <i>WDR3</i>	57
4.2.2.2	Segundo estudio de asociación del gen <i>WDR3</i>	63
4.2.3	ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE <i>WDR3</i> CON LA REGIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD MARCADA POR EL SNP rs2145418	66
4.2.4	EXPRESIÓN DEL GEN <i>WDR3</i> EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE TIROIDES	68
4.2.5	ANÁLISIS DE LA METILACIÓN EN EL PROMOTOR DEL GEN <i>WDR3</i>	70
<b>4.3</b>	<b>ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LA REGIÓN 8q CON CÁNCER DE TIROIDES</b>	<b>72</b>
4.3.1	GENOTIPADO DE SIETE POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN 8q Y ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN AL CÁNCER DE TIROIDES	72
4.3.2	INTERACCIÓN DEL GEN <i>TG</i> CON LOS GENES <i>THRA</i> Y <i>THRB</i>	80
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>83</b>
<b>5.1</b>	<b>ASOCIACIÓN DEL GEN <i>WDR3</i> CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES</b>	<b>85</b>
<b>5.2</b>	<b>ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE DISTINTAS REGIONES DEL CROMOSOMA 8q CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES</b>	<b>87</b>

6	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
7	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>93</b>

**ANEXO 1** Abdelmounaim Akdi, Esteban Giménez, Wilser García-Quispes, Susana Pastor, Juan Castell, Josefina Biarnés, Ricard Marcos, Antonia Velázquez (2010). WDR3 gene haplotype is associated with thyroid cancer risk in a spanish population. Thyroid 20, 803-809.

**ANEXO 2** Abdelmounaim Akdi, Gisselle Pérez, Susana Pastor, Juan Castell, Josefina Biarnés, Ricard Marcos, Antonia Velázquez (2011). Common variants of the thyroglobulin gene are associated with differentiated thyroid cancer risk. aceptado.



# INDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Alteraciones genéticas más comunes en carcinomas derivados de células foliculares (Giusti et al., 2010).....	7
Tabla 2. Sistema de estadificación TNM. T (tumor primario), N (nódulos linfáticos regionales) y M (metástasis a distancia) (Shaha, 2007). ....	13
Tabla 3. Grupos de riesgo bajo, intermedio y alto en pacientes de cáncer de tiroides, agrupados de acuerdo a factores pronóstico como edad de diagnóstico, metástasis a distancia, tamaño del tumor y tipo histológico (Shaha, 2007).....	14
Tabla 4. Loci comunes de susceptibilidad al cáncer de mama, próstata, colorrectal y de pulmón identificados a través de GWAS (Varghese y Easton 2010). ....	17
Tabla 5. Genes supresores de tumor con expresión silenciada por metilación de su promotor (Garinis et al., 2002).....	20
Tabla 6. Estudios de polimorfismos en genes de reparación en cáncer de tiroides (Adjadj et al., 2009).....	25
Tabla 7. Estudios de polimorfismos en genes que controlan el ciclo celular en cáncer de tiroides (Adjadj et al., 2009). ....	27
Tabla 8. Estudios de polimorfismos en genes de metabolismo en cáncer de tiroides (Adjadj et al., 2009). ....	29
Tabla 9. Características de las líneas celulares tumorales utilizadas en el estudio. Tabla extraída y combinada de Meireless et al, 2007; Schweppe et al, 2008; Pilli et al, 2009.....	40
Tabla 10. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar la región promotora del gen WDR3. ....	44
Tabla 11. Secuencia de los cebadores utilizados para la reacción de RT-PCR del gen WDR3.....	44
Tabla 12. Secuencia de los cebadores utilizados para la reacción de RT-PCR para el análisis de la expresión del gen WDR3. ....	45
Tabla 13. Cebadores utilizados para la secuenciación de la región promotora y la región codificadora del gen WDR3. ....	46
Tabla 14. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de la secuencia promotora del gen WDR3 después de su modificación con bisulfito.....	48
Tabla 15. Características de la población estudiada. ....	53
Tabla 16. Frecuencias alélicas y genotípicas y odds ratio ajustadas con el sexo y la edad según un modelo de herencia codominante de 10 SNPs en la región del gen WDR3.....	60
Tabla 17. Distribución de haplotipos en el gen WDR3 y su asociación con cáncer de.....	62
Tabla 18. Frecuencias alélicas y genotípicas y odds ratio ajustados con el sexo y la edad según un modelo de herencia codominante. ....	64

<i>Tabla 19. Análisis de haplotipos de los SNPs 3, 6 y 8, en controles, en el grupo total de pacientes de cáncer de tiroides y en pacientes de cáncer papilar y folicular.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 20. Relación de haplotipos del gen WDR3 con las características clínicopatológicas en pacientes de cáncer de tiroides.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 21. Análisis de la interacción entre los SNPs del gen WDR3 y los genotipos del marcador rs2145418. Odds ratio ajustadas con el sexo y la edad.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 22. Cuantificación de la señal de western blot para la proteína WDR3. Se muestra el cociente WDR3/Vinculina y la ratio de la expresión en función de la línea celular normal S11N.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 23. SNPs estudiados de la región 8q.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabla 24. Frecuencias alélicas, distribución de genotipos y odds ratio ajustadas con el sexo y la edad, según un modelo de herencia codominante de siete SNPs en cromosoma 8q.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabla 25. Distribución de genotipos y estimación del riesgo de los SNPs rs180223 y rs853326 de acuerdo con el modelo dominante.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 26. Distribución de haplotipos de la combinación de los SNPs rs180223 y rs853326 y estimación del riesgo.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 27. Los genotipos de los SNPs rs180223 y rs853326 y el riesgo del cáncer de tiroides en mujeres y hombres y según la edad del diagnóstico.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 28. Análisis de la interacción entre el SNP rs180223 del gen TG y los SNPs de THRA y THRB. Odds ratio ajustadas con sexo y edad.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabla 29. Análisis de la interacción entre el SNP rs20767740 del gen TG y los SNPs de THRA y THRB. Odds ratio ajustadas con sexo y edad.....</i>	<i>82</i>



# INDICE DE FIGURAS

---

<i>Figura 1. La glándula tiroides. Dos lóbulos situados en ambos lados de la parte superior de la tráquea, bajo el cartílago tiroideo y sobre el cartílago cricoides, unidos por un istmo.</i>	1
<i>Figura 2. Control de la función tiroidea por retroalimentación negativa. Adaptado de <a href="http://arbl.cvmb.colostate.edu/">http://arbl.cvmb.colostate.edu/</a>.</i>	3
<i>Figura 3. Incidencia del cáncer de tiroides en Inglaterra de 1987 a 2006 según Olaleye et al. (2010).</i>	5
<i>Figura 4. Frecuencia de los diferentes tipos de cáncer de tiroides (Giusti et al., 2010). ATC: cáncer anaplásico; FTC: cáncer folicular; MTC: cáncer medular; PTC: cáncer papilar.</i>	5
<i>Figura 5. La región 8q24 asociada con el riesgo de diferentes tipos de cánceres(Varghese y Easton 2010).</i>	18
<i>Figura 7. Pasos seguidos en la extracción de DNA con el método estándar cloroformo-etanol. TLE: Tampón de lisis de eritrocitos. TLL: Tampón de lisis de leucocitos.</i>	41
<i>Figura 8. Ejemplo de la visualización de la integridad del RNA en gel de agarosa teñido con Syber Green. Se observan las bandas correspondientes a los rRNA 18S y 28S. M: marcador <math>\lambda</math> digerido con BstEIII.</i>	42
<i>Figura 9. Conversión de la citosina no metilada a uracilo.</i>	47
<i>Figura 10. Posición del gen WDR3 en el cromosoma 1 y estrategia seguida en la secuenciación de la región promotora y codificadora del gen WDR3. Se muestran los cebadores de amplificación por PCR a partir de cDNA y DNA genómico con flechas azules y los cebadores de secuenciación con flechas rojas.</i>	59
<i>Figura 11. Localización de los microsatélites (T)<sub>n</sub> y (GT)<sub>n</sub> en la región 3'-UTR del gen WDR3. En la letra gris se señala la secuencia de la región 3'-UTR en el exón 27 del gen WDR3 y en negrita la secuencia de los microsatélites.</i>	56
<i>Figura 12. Posición relativa de los 10 SNPs estudiados de la región del gen WDR3. Los números indican el número asignado a cada SNP, de 5' a 3' relativo al gen WDR3.</i>	58
<i>Figura 13. Desequilibrio de ligamiento entre los diferentes SNPs estudiados utilizando nuestros datos de genotipado. Se señala los valores de <math>r^2</math> y la posición relativa de cada SNP.</i>	61
<i>Figura 14. Expresión de WDR3 en líneas celulares de cáncer de tiroides. (A) Análisis semicuantitativo por RT-PCR utilizando <math>\beta</math>-actina como control interno de la reacción (B) Análisis de la expresión de la proteína del WDR3 mediante western blot, utilizando la vinculina como control. PTC, líneas celulares de</i>	

<i>cáncer papilar. FTC, líneas celulares de cáncer folicular. ATC, líneas celulares de cáncer anaplásico. S11N, línea celular de tejido normal de tiroides.</i>	69
<i>Figura 15. Representación grafica de la expresión de WDR3 relativa a la línea celular normal S11N.</i>	70
<i>Figura 16. Las dos regiones analizadas del promotor del gen WDR3 para metilación. La región 1 de 34 islas CpG y la región 2 de 32 islas CpG.</i>	71
<i>Figura 17. Grado de metilación de la isla CpG en el promotor del gen WDR3.</i>	71

## ABREVIATURAS

---

<b>A</b>	Años
<b>AITD</b>	Enfermedad autoinmune del tiroides
<b>Arg</b>	Arginina
<b>Asn</b>	Asparagina
<b>ATC</b>	Carcinoma de tiroides anaplásico
<b>BC</b>	Cáncer de mama
<b>BCAC</b>	Consortio del cáncer de mama
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>cm</b>	Centímetro
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DL</b>	Desequilibrio de ligamiento
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>EndoIII</b>	Endonucleasa III
<b>FAP</b>	Poliposis adenomatosa familiar
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FTC</b>	Carcinoma de tiroides folicular
<b>GWA</b>	Estudios de asociación integral del genoma
<b>HNPCC</b>	Cáncer de colon hereditario no polipósico
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IR</b>	Infrarrojos
<b>kb</b>	Kilobase
<b>LBCL</b>	Línea celular linfoblastoide
<b>LMA</b>	Agarosa de bajo punto de fusión
<b>LOH</b>	Pérdida de heterocigosidad
<b>MAF</b>	Frecuencia del alelo menos frecuente
<b>Mb</b>	Megabase
<b>MEN</b>	Neoplasia múltiple endocrina
<b>mm</b>	Milímetros
<b>MTC</b>	Carcinoma de tiroides medular

<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OR</b>	Odds ratio
<b>PAAF</b>	Punción-aspiración con aguja fina
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBI</b>	Proteína transportadora de compuestos yodados
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PTC</b>	Carcinoma de tiroides papilar
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SCE</b>	Intercambios entre cromátidas hermanas
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>Ser</b>	Serina
<b>SI</b>	Sistema internacional
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un único nucleótido
<b>STR</b>	Repeticiones cortas en tandem
<b>Sv</b>	Sievert
<b>T3</b>	Triyodotirosina
<b>T4</b>	Tetrayodotirosina o tiroxina
<b>TBG</b>	Globulina fijadora de tiroxina
<b>TG</b>	Tiroglobulina
<b>THRA</b>	Receptor de la hormona tiroidea $\alpha$
<b>THRB</b>	Receptor de la hormona tiroidea $\beta$
<b>TNM</b>	Tumor, Nódulos, Metástasis
<b>TRHR</b>	Receptor de la hormona liberadora de tirotropina
<b>TSHR</b>	Hormona estimulante del tiroides
<b>UC</b>	Cáncer de cuello



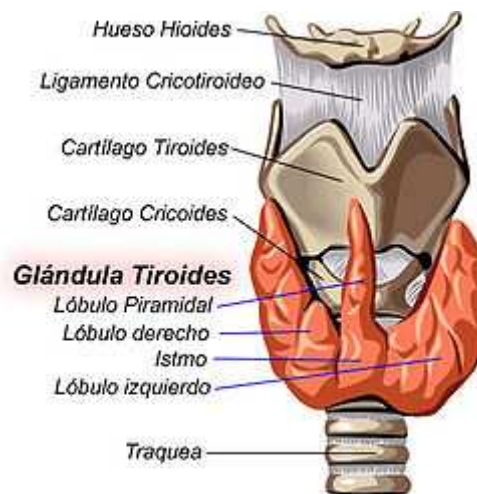
## **Introducción**



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 LA GLÁNDULA TIROIDES

En humanos, la glándula tiroidea (figura 1) es una de las mayores glándulas endocrinas del cuerpo con un peso de 15 a 20 gramos en individuos normales. Está situada en el cuello, por debajo del cartílago cricoideo, "la nuez de Adán". Tiene forma de mariposa, con dos lóbulos, unidos por una zona central que se llama istmo (Kratzsch y Pulzer, 2008). Los lóbulos miden en ecografía aproximadamente 55 mm de diámetro longitudinal y unos 15 mm de grosor. La simetría no es rigurosa, a veces el lóbulo derecho puede ser ligeramente mayor que el izquierdo (hasta 60 mm) y en algunas ocasiones más raras ocurre a la inversa. En el tiroides existen unas pequeñas glándulas que participan en el metabolismo del calcio y que son las paratiroides. Hay cuatro paratiroides, dos en cada lado.



**Figura 1.** La glándula tiroidea. Dos lóbulos situados en ambos lados de la parte superior de la tráquea, bajo el cartílago tiroideo y sobre el cartílago cricoideo, unidos por un istmo.

El tiroides se desarrolla muy pronto. Aproximadamente a los 30 días del desarrollo del embrión, el tiroides aparece como una estructura con dos lóbulos y a los 40 días se interrumpe la conexión que tenía con la base de la lengua, atrofiándose y desapareciendo este hilo de unión. En la 8ª semana empieza a reconocerse la estructura tubular que caracteriza al tejido glandular y entre la 11ª y la 12ª semana el tiroides del embrión ya concentra yodo y se puede decir que empieza a funcionar.

El tiroides produce y secreta las hormonas tiroideas, la triyodotironina (T3) y la tiroxina (T4), que tienen un amplio efecto sobre el desarrollo y el metabolismo (Bianco y Larsen, 2005). El tiroides también secreta la hormona calcitonina, que disminuye los niveles de calcio y fósforo en la sangre e inhibe la reabsorción ósea de estos iones.

Los componentes hormonales producidos por el tiroides tienen una característica única en el organismo y es que en su composición entra el yodo. Este es un hecho muy importante porque si el organismo no dispone de yodo el tiroides no puede producir hormonas.

Los efectos más destacados del déficit de las hormonas tiroideas (T3 y T4) ocurren durante el desarrollo fetal y en los primeros meses que siguen al nacimiento, produciendo un menor desarrollo intelectual y retraso del crecimiento del niño. Sin embargo, en el adulto el déficit de las hormonas tiroideas se manifiesta por alteraciones del metabolismo. Estos efectos incluyen cambios en el consumo de oxígeno y en el metabolismo de las proteínas, hidratos de carbono, grasas y vitaminas. Entre las funciones más importantes de las hormonas tiroideas podemos citar las siguientes:

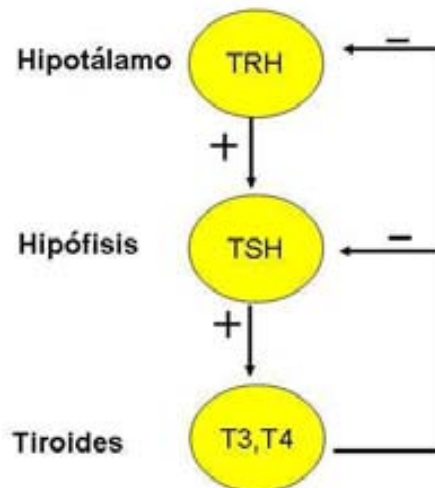
- Son necesarias para un correcto crecimiento y desarrollo.
- Tienen acción calorígena y termorreguladora.
- Aumentan el consumo de oxígeno.
- Estimulan la síntesis y degradación de las proteínas.
- Regulan las mucoproteínas y el agua extracelular.
- Actúan en la síntesis y degradación de las grasas.
- Intervienen en la síntesis del glucógeno y en la utilización de la glucosa.
- Son necesarias para la formación de la vitamina A, a partir de los carotenos.
- Estimulan el crecimiento y la diferenciación.
- Imprescindibles para el desarrollo del sistema nervioso, central y periférico.
- Intervienen en los procesos de la contracción muscular y motilidad intestinal.
- Participan en el desarrollo y la erupción dental.

La hormona que regula la función tiroidea, se produce en la hipófisis y se denomina hormona estimulante del tiroides TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*). La TSH incrementa o disminuye la actividad del tiroides mediante un mecanismo muy simple: cuando el nivel de hormonas tiroideas baja en sangre, la hipófisis lo detecta y aumenta la producción de TSH que estimula al tiroides para que produzca y libere más



hormona tiroidea; cuando el nivel de hormonas tiroideas es alto, la hipófisis se frena, disminuyendo la secreción de TSH, y por lo tanto, el tiroides ralentiza su actividad (Eng et al., 1999).

A su vez, la hipófisis está controlada por el hipotálamo, mediante la hormona liberadora de tirotropina (TRH). De tal forma que el control consiste en un mecanismo de retroalimentación negativa desencadenado por las hormonas tiroideas (figura 2).



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

## 1.2 PATOLOGÍAS DE LA GLÁNDULA TIROIDES

La enfermedad tiroidea incluye condiciones asociadas a la excesiva liberación de las hormonas tiroideas (hipertiroidismo), aquellas asociadas a la deficiencia de las mismas (hipotiroidismo) y la presencia de masas tiroideas (cáncer de tiroides).

### 1.2.1 HIPERTIROIDISMO

El hipertiroidismo o enfermedad de la tiroides hiperactiva consiste en una producción y liberación de hormona tiroidea en exceso (Wemeau, 2005). El hipertiroidismo puede afectar al metabolismo, puede causar nerviosismo, aumento de la transpiración (sudoración), latidos acelerados del corazón, temblores en las manos, dificultad para dormir y pérdida de peso. La causa del hipertiroidismo, en más del 70% de casos, es un trastorno autoinmune llamado enfermedad de Graves. Los anticuerpos que el sistema inmunitario produce estimulan la glándula tiroides, por lo que aumenta la cantidad de hormona tiroidea. Dos causas adicionales y menos comunes de

hipertiroidismo incluyen: nódulos tiroideos hiperactivos (uno o más nódulos del tiroides crecen y aumentan su nivel de actividad de tal manera que producen demasiada hormona) y tiroiditis (un problema del sistema inmunitario o una infección viral hace que la glándula tiroidea se inflame y produzca hormona tiroidea en exceso) (Cooper et al., 2006; Nayak y Hodak, 2007).

### **1.2.2 HIPOTIROIDISMO**

El hipotiroidismo o actividad tiroidea deficiente, significa que la glándula tiroides no está produciendo suficientes hormonas (Surks et al., 2004). Las mujeres, especialmente aquellas mayores de 50 años de edad, tienen mayor probabilidad de padecer hipotiroidismo que los hombres (Vaidya y Pearce, 2008). Si no se trata, el hipotiroidismo puede causar obesidad, dolor en las articulaciones, infertilidad y enfermedad del corazón.

La causa más común de hipotiroidismo es una enfermedad autoinmune llamada tiroiditis de Hashimoto (Ott et al., 1985; Zardo et al., 1999; Pino Rivero et al., 2004).

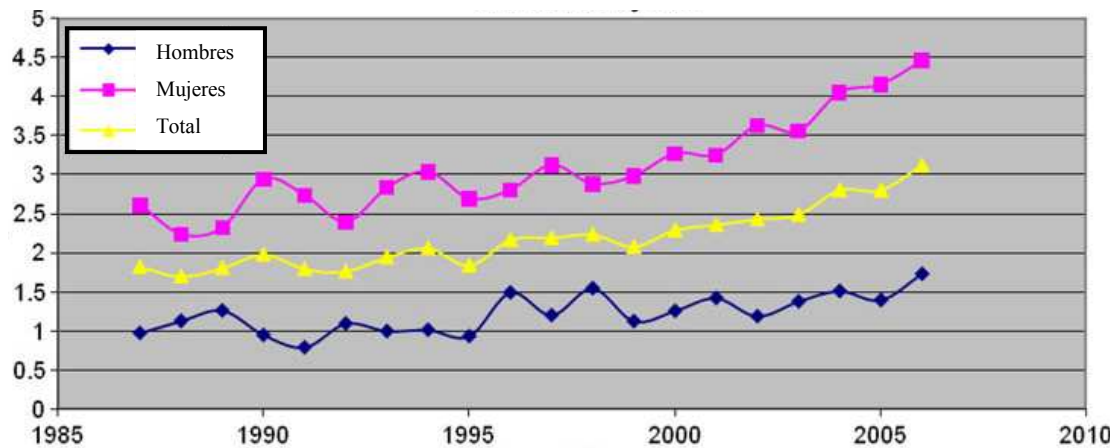
Otras causas del hipotiroidismo pueden ser:

- **Enfermedad congénita:** aproximadamente 1 de cada 3.000 lactantes en Estados Unidos nacen con un defecto en la tiroides o sin tiroides.
- **Trastorno de la hipófisis:** Un trastorno de la glándula de la hipófisis puede impedir que esta glándula produzca la cantidad correcta de TSH.
- **Embarazo:** algunas mujeres desarrollan hipotiroidismo durante o después del embarazo debido a la producción de anticuerpos que atacan la glándula tiroidea.
- **Deficiencia de yodo:** el yodo es un oligoelemento necesario para producir las hormonas tiroideas. La deficiencia de yodo puede impedir que el cuerpo produzca suficiente hormona tiroidea.

### **1.2.3 CÁNCER DE TIROIDES**

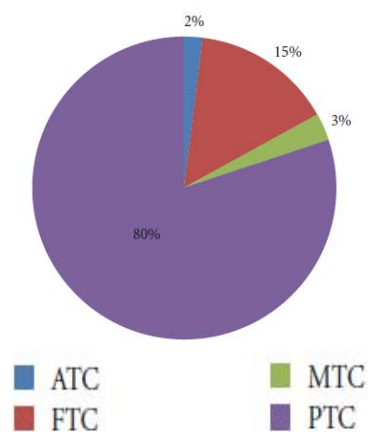
Epidemiológicamente el cáncer de tiroides es la patología endocrina maligna más frecuente y la que determina la mayoría de muertes por cáncer endocrino (Sherman, 2003). En la actualidad representa el octavo tipo de cáncer más frecuente en mujeres (Al-Brahim y Asa, 2006), presentando una incidencia de 2,13 en hombres y 5,87 en mujeres por cada 100.000 personas por año en España, frente a los valores de 2,37 y 6,24 de la Unión Europea. La mortalidad en España es de 0,54 en hombres y 0,91 en mujeres por cada 100.000 personas, frente a los valores de 0,60 y 1,12 de la Unión

Europea. La tasa de la incidencia del cáncer de tiroides ha aumentado constantemente en las últimas décadas (Olaleye et al., 2010) (figura 3).



**Figura 3.** Incidencia del cáncer de tiroides en Inglaterra de 1987 a 2006 según Olaleye et al. (2010).

Más del 95% del cáncer de tiroides deriva de las células foliculares. Una minoría de tumores (3%), denominado cáncer medular de tiroides, se origina de las células parafoliculares (figura 4). La mayoría de los carcinomas que derivan de las células epiteliales foliculares son tumores que se pueden controlar con eficacia mediante intervención quirúrgica. Sin embargo, un subgrupo de estos tumores se pueden comportar agresivamente y, actualmente, no existe una forma efectiva de tratamiento.



**Figura 4.** Frecuencia de los diferentes tipos de cáncer de tiroides (Giusti et al., 2010). ATC: cáncer anaplásico; FTC: cáncer folicular; MTC: cáncer medular; PTC: cáncer papilar.

### **Carcinomas derivados de células foliculares**

Solamente el 3-5% de los pacientes que desarrollan carcinomas que se originan del epitelio folicular tienen una historia familiar positiva. Así, la mayoría de los cánceres de tiroides son esporádicos. Los carcinomas se dividen en diferenciados, poco diferenciados e indiferenciados, basándose en parámetros clínicos y patológicos. El cáncer de tiroides bien diferenciado incluye los tipos papilar y folicular. El tipo anaplasico se corresponde con carcinomas poco diferenciados o indiferenciados.

El **cáncer papilar (*papillary thyroid carcinoma, PTC*)**: es el tipo más frecuente de cáncer de tiroides (85-90% de los carcinomas de tiroides). Presenta un crecimiento lento y puede extenderse fuera del tiroides, afectando los ganglios linfáticos locales. Tiene un excelente pronóstico, con un índice de supervivencia del 95%. La edad media de aparición del tumor es de 45 años (Mazzaferri y Kloos, 2001).

El **cáncer folicular (*follicular thyroid carcinoma, FTC*)**: representa el 10-15% de los cánceres de tiroides (Grebe y Hay, 1995), con un predominio de aparición a los 55 años, siendo muy raro en niños. La mayoría de los tumores son encapsulados, con una gran tendencia a extenderse por medio del torrente sanguíneo y formar metastasis (Al-Brahim y Asa, 2006; Schmid y Farid, 2006; Vasko et al., 2007). Algunos estudios consideran que el cáncer folicular tiene peor pronóstico que el papilar (Lundgren et al., 2006), aunque otros estudios no han encontrado esta diferencia (Steinmuller et al., 2000).

El **cáncer anaplásico (*anaplastic thyroid carcinoma, ATC*)**: es un carcinoma indiferenciado poco frecuente que actúa de una forma agresiva (Nix et al., 2006), la esperanza de vida después de su diagnóstico es de 6 meses, suele aparecer entre los 50 y los 70 años.

### **Carcinomas derivados de células parafoliculares**

El **cáncer medular (*medullary thyroid carcinoma, MTC*)**: es un carcinoma que se origina a partir de las células parafoliculares o células C, que producen hormonas, en particular, la calcitonina (Giuffrida et al., 2000). Es un carcinoma raro que representa entre el 5-10% de los cánceres de tiroides (Negri et al., 2002), el pronóstico es peor que el de los carcinomas diferenciados. El MTC es generalmente esporádico (75%), el resto lo comprenden tres síndromes familiares: el síndrome familiar neoplásico hereditario 2A (MEN 2A), el síndrome familiar neoplásico hereditario 2B (MEN 2B) y carcinoma medular familiar no-MEN (FMTC) (Nix et al., 2006).

### 1.2.3.1 Base genética del cáncer de tiroides

En los últimos años, nuestra comprensión de la base molecular del cáncer de tiroides ha aumentado de forma espectacular. Este conocimiento ha empezado a ser traducido a la práctica clínica, ofreciendo un mejor diagnóstico del cáncer de tiroides y un mejor pronóstico del tumor.

A pesar del avance en la identificación de las alteraciones genéticas características del cáncer de tiroides, en la actualidad todavía no entendemos la etiología de este tipo de cáncer.

Cuatro tipos de mutaciones constituyen la mayoría de las alteraciones genéticas que ocurren en el cáncer de tiroides; son mutaciones en los genes *BRAF* y *RAS* y las reordenaciones *RET/PTC* y *PAX8/PPAR $\gamma$*  (tabla 1). Los carcinomas papilares pueden tener mutaciones puntuales en los genes *BRAF* y *RAS* y reordenaciones cromosómicas *RET/PTC*. Estas mutaciones se encuentran en más del 70% de los casos de carcinomas papilares de tiroides (Kimura et al., 2003; Soares et al., 2003; Frattini et al., 2004; Adeniran et al., 2006). En los carcinomas foliculares se encuentran mutaciones en el gen *RAS* y reordenaciones *PAX8/PPAR $\gamma$* . Estas mutaciones se identifican en aproximadamente el 80% de los carcinomas folicular (Nikiforova et al., 2003a). Las mutaciones más frecuentes en carcinomas poco diferenciados y anaplásicos implican los genes *TP53* y *CTNNB1* (Kondo et al., 2006). En el carcinoma medular de tiroides (familiar y esporádico) se encuentran mutaciones puntuales en el gen *RET* (de Groot et al., 2006).

**Tabla 1.** Alteraciones genéticas más comunes en carcinomas derivados de células foliculares (Giusti et al., 2010).

<b>Genes</b>	<b>PTC</b>	<b>FTC</b>	<b>ATC</b>
<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/PPAR<math>\gamma</math></i>	—	35%	—

### **BRAF**

Las mutaciones del gen *BRAF* son las alteraciones genéticas más comunes en el carcinoma papilar y se encuentran en un 45% de estos tumores (Cohen et al., 2003; Kimura et al., 2003; Xing, 2005). Alrededor del 95% de todas las mutaciones implican al nucleótido 1799 de la región codificadora del gen, dando lugar a una sustitución de valina por ácido glutámico en el residuo 600 de la proteína (V600E). Esta mutación conduce a la activación constitutiva de *BRAF*, lo que provoca la fosforilación de MEK (Wan et al., 2004; Knauf et al., 2005). Otras mutaciones de *BRAF*, menos frecuentes en el cáncer de tiroides papilar, son la mutación K601E (Chiosea et al., 2009) y la reordenación *AKAP9/BRAF*, que es la más común en los carcinomas papilares asociados con la exposición a la radiación (Ciampi et al., 2005).

Como se ha indicado, la mutación V600E se encuentra típicamente en el carcinoma papilar, y es menos común en la variante folicular de carcinoma papilar (Xing, 2005; Adeniran et al., 2006). Esta mutación también se observa en el carcinoma anaplásico y carcinomas diferenciados derivados de carcinoma papilar (Grieco et al., 1990; Namba et al., 2003; Nikiforova et al., 2003b; Begum et al., 2004). Sin embargo, la mutación V600E no se describió en el cáncer folicular.

### **RET/PTC**

Las reordenaciones cromosómicas *RET/PTC* son alteraciones genéticas que se encuentran en los carcinomas papilares (Santoro et al., 1992). Consisten en la fusión de la región 3' del gen *RET* y la región 5' de varios genes no relacionados. Las dos reordenaciones más comunes son *RET/PTC1* y *RET/PTC3*, son inversiones paracéntricas que incluyen el gen *RET* y *H4* o *NCOA4*, respectivamente, (Grieco et al., 1990; Bongarzone et al., 1994; Santoro et al., 1994). *RET/PTC2* y otras nueve reordenaciones *RET/PTC* identificadas recientemente son translocaciones intercromosómicas (Ciampi et al., 2007). En resumen las reordenaciones, *RET/PTC* se encuentran en aproximadamente el 20% de los carcinomas papilares, pero su prevalencia es muy variable debido, en gran parte, a la diferencia de sensibilidad de los métodos de detección y también a cierta variabilidad geográfica (Tallini y Asa, 2001; Nikiforov, 2002).

*RET/PTC* se presenta con mayor incidencia en pacientes con historia de exposición a la radiación ionizante (50-80%) y en los carcinomas papilares de los niños

y adultos jóvenes (40-70%) (Nikiforov et al., 1997; Soares et al., 1998; Fenton et al., 2000; Rabes et al., 2000).

Entre los diferentes tipos de reordenaciones, *RET/PTC1* suele ser la más común y comprende hasta el 60-70% de los casos, *RET/PTC3* representa el 20-30% y el resto de reordenaciones *RET/PTC* un 5% (Bongarzone et al., 1998; Tallini et al., 1998). Sin embargo, después del accidente de Chernobyl, en los carcinomas papilares de los niños expuestos a la radiación, *RET/PTC3* fue la reordenación más frecuentemente observada (Nikiforov et al., 1997).

### RAS

Las mutaciones puntuales en los genes *RAS* no se limitan a un tipo particular de tumor de tiroides y se encuentran en carcinomas foliculares, papilares, anaplásicos y adenomas foliculares. Las mutaciones en los genes *RAS* (*HRAS*, *KRAS*, y *NRAS*) en los tumores del tiroides, involucran al codón 61 de *NRAS* y al codón 61 de *HRAS*, aunque se han encontrado mutaciones en varios puntos de los tres genes. En los carcinomas papilares, las mutaciones que se producen en *RAS* representan el 10-20% de los tumores (Namba et al., 1990; Karga et al., 1991; Hara et al., 1994; Ezzat et al., 1996; Basolo et al., 2000; Vasko et al., 2004). Los carcinomas papilares que tienen la mutación *RAS* casi siempre tienen histológicamente la variante folicular. Mutaciones *RAS* también se encuentran en el 40-50% de carcinomas folicular (Lemoine et al., 1988; Lemoine et al., 1989; Suarez et al., 1990; Esapa et al., 1999; Basolo et al., 2000; Motoi et al., 2000) y en el 20-40% de los adenomas foliculares (Lemoine et al., 1989; Namba et al., 1990; Suarez et al., 1990; Esapa et al., 1999; Motoi et al., 2000).

Mutaciones de *RAS* se han descrito también en el 50-60% de los carcinomas anaplásicos. Es probable que las mutaciones de *RAS* faciliten una inestabilidad genómica (Asakawa y Kobayashi, 2002).

### PAX8/PPAR $\gamma$

La reordenación cromosómica *PAX8/PPAR $\gamma$*  es el resultado de la translocación (2q13;3p25) que conduce a la fusión entre el gen *PAX8* y el gen *PPAR $\gamma$* . La reordenación *PAX8/PPAR $\gamma$*  permite la sobreexpresión de la proteína *PPAR $\gamma$* , pero los mecanismos de la transformación celular inducida por este evento genético aún no se entienden completamente.

*PAX8/PPAR $\gamma$*  se encuentra en el 30-40% de los carcinomas foliculares, esta reordenación también se puede encontrar con menor frecuencia (20-10%) en los

adenomas foliculares y en ocasiones en la variante folicular de carcinoma papilar (Marques et al., 2002; Dwight et al., 2003; Nikiforova et al., 2003a; Castro et al., 2006).

### **miRNAs**

Los miRNAs son RNAs de una longitud entre 21 y 25 nucleótidos, que tienen la capacidad de regular la expresión de otros genes. La expresión de los miRNAs varía en los diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de tiroides, lo que sugiere que la expresión alterada de los miRNA puede ser un factor importante en la formación de tumores (Nikiforova et al., 2009). Diversos estudios ponen de manifiesto que ciertos miRNAs, incluyendo miR-146b, miR-221, miR-222, miR-181b, miR-155 y miR-224, son significativamente sobreexpresados en los carcinomas papilares (He et al., 2005; Pallante et al., 2006; Tetzlaff et al., 2007; Visone et al., 2007; Chen et al., 2008; Nikiforova et al., 2008). Curiosamente, la regulación de algunos de estos miRNAs se correlaciona con el estado mutacional de carcinomas papilares (Nikiforova et al., 2008). Por ejemplo, miR-187 se expresa en niveles más altos en los tumores con reordenaciones *RET/PTC*; sin embargo, miR-221 y miR-222 se encuentran más expresados en tumores con mutaciones BRAF-RAS.

#### *1.2.3.2 Diagnóstico y tratamiento del cáncer de tiroides*

El primer síntoma del cáncer de tiroides es la aparición de un nódulo palpable que se encuentra hasta en el 7% de la población adulta (Hegedus, 2004; Delbridge, 2006). En la mayoría de casos, los nódulos tiroideos son benignos, con una incidencia de malignidad de entre el 3,4 y el 29% (Castro y Gharib, 2000; Cohen y Salter, 2008). El riesgo de malignidad aumenta si el paciente ha sido irradiado en el área de la cabeza o del cuello durante la infancia, lo que supone un riesgo de malignidad del 35 al 40%; también aumenta el riesgo si el paciente tiene historia familiar de cáncer o si ha padecido enfermedades endocrinas (Nix et al., 2005).

Posterior al hallazgo clínico del nódulo palpable, el paciente debe realizar una evaluación ecográfica de la glándula tiroides. A través de la ecografía se determina el tamaño y la composición del nódulo, además de determinar si el nódulo es solitario o múltiple. Los pacientes que tienen un nódulo solitario tienen el mismo riesgo de malignidad que aquellos que tienen nódulos múltiples (Marqusee et al., 2000; Papini et al., 2002). Hasta el momento, ni el tamaño del nódulo ni algún parámetro ultrasonográfico aislado se considera un factor predictivo del cáncer de tiroides (Frates



et al., 2005). El diagnóstico se complementa con una gammagrafía que permite medir la actividad funcional del nódulo al administrar un trazador y la captación del mismo por el nódulo. De acuerdo al patrón de captación del isótopo, los nódulos se clasifican como: nódulos hiperfuncionales (nódulos calientes) que son aproximadamente el 5% de los casos y tienen una incidencia de cáncer del 5%, los nódulos hipofuncionales (nódulos fríos) son del 80 al 85% de los casos, de los cuales el 15% son malignos y los nódulos funcionales (nódulos tibios) que son del 10 al 15% de los casos, en los que el 9% son nódulos malignos (Wong y Wheeler, 2000; Meier y Kaplan, 2001).

El siguiente paso en el manejo del paciente con un nódulo tiroideo es la biopsia mediante aspiración con aguja fina. Éste se considera el método más efectivo para la diferenciación entre nódulos malignos y benignos del tiroides (Feld et al., 1996; Oertel, 2007). A través de este procedimiento es posible conocer la composición celular del nódulo, con una tasa de falsos negativos menor al 5%. De la información obtenida de la biopsia se clasifica aproximadamente al 70% de los casos en nódulo benigno, el 5% en nódulo maligno, el 10% en indeterminado y un 15% sin diagnóstico (Suen, 2002).

El resultado positivo para malignidad a través de la biopsia mediante aspiración con aguja fina tiene una sensibilidad próxima al 100% (Gharib y Goellner, 1993; Ko et al., 2003). Sin embargo, esta prueba por si sola no es capaz de diferenciar entre el carcinoma folicular y el adenoma folicular de la glándula tiroidea, ya que son necesarios criterios histológicos de invasión capsular y vascular para su completa diferenciación (Boyd et al., 1998; Layfield, 2007; Carpi et al., 2008).

Al obtener un resultado positivo para malignidad en la biopsia mediante aspiración con aguja fina, se propone la ablación quirúrgica de la glándula tiroides utilizando preferentemente la tiroidectomía total, debido a que este procedimiento tiene un nivel menor de recurrencia (Bilimoria et al., 2007; Schlumberger et al., 2007).

Seguidamente, el abordaje terapéutico del cáncer diferenciado del tiroides se sustenta en la estructura y cinética fisiológica de la glándula (Spitzweg y Morris, 2002). Tras la ablación quirúrgica del tiroides, se realiza un rastreo utilizando  $I^{131}$  a una dosis entre 3 y 5 mCi para comprobar la ausencia de restos de tejido de la glándula. En los pacientes con captación positiva se administra una dosis ablativa de  $I^{131}$  a una dosis entre 30 y 100 mCi (Pacini et al., 2002; Rosario et al., 2005). La radiación  $\beta$  que emite el  $I^{131}$  es la responsable del 90 % de los efectos terapéuticos.

El propósito de la estadificación del paciente con cáncer es dividir a los pacientes en grupos para categorizar el pronóstico y definir el plan terapéutico. La estadificación del paciente utilizando el sistema TNM (tumor, nódulos, metástasis) es una práctica establecida desde hace 65 años por Pierre Denoix y luego adoptada en el año 1977 en su primera versión por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), para aproximadamente 23 tumores primarios de distinto origen histológico (Sobin, 2001; Iwase, 2007). Desde entonces, la estadificación del paciente con cáncer utilizando el sistema TNM es el sistema habitual de clasificación clínico patológico (Sobin, 2003).

La asamblea del Comité Americano del Cáncer (AJCC) y el Comité de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) han estandarizado el sistema de estadificación para cada tumor maligno (Yarbro et al., 1999). En pacientes con diagnóstico de cáncer de tiroides, el sistema de estadificación TNM se define según lo indicado en la tabla 2.

El sistema TNM está basado en la evaluación clínica durante el periodo inicial del manejo del nódulo tiroideo y se transforma en TNMp al obtener el informe histopatológico después de la ablación quirúrgica de la glándula tiroides, donde el parámetro “p” hace referencia al tipo histológico del tumor (Loh et al., 1997).

Una variación importante en la estadificación de pacientes con diagnóstico de cáncer de tiroides utilizando el sistema TNM, es la inclusión de la edad de diagnóstico. Éste es el único tipo de cáncer donde se realiza esta distinción. Así, para la elaboración del pronóstico de los pacientes con cáncer de tiroides, éstos se dividen en dos grupos, el primero con más de 45 años de edad y el segundo con menos de 45 años (Duntas y Grab-Duntas, 2006; Gulcelik et al., 2007).

Factores como la edad, grado del tumor, extensión extratiroidea, tamaño del tumor y la presencia de metástasis a distancia han mostrado ser factores con una influencia importante en el pronóstico y en las decisiones terapéuticas a seguir en el manejo del paciente con cáncer de tiroides. Por el contrario, otros factores como la multicentricidad del tumor y la metástasis nodal se consideran de poca importancia (Coburn y Wanebo, 1992; Lin et al., 1999; Shaha, 2004). Basados en los factores pronóstico, los pacientes con cáncer de tiroides se dividen en grupos de bajo, intermedio y alto riesgo. El grupo de bajo riesgo incluye pacientes con una edad menor de 45 años, con un tumor menor de 4 cm limitado a la glándula tiroidea y con un tipo histopatológico papilar. Por otro lado, el grupo de alto riesgo incluye pacientes mayores de 45 años con un tumor mayor de 4 cm, con un diagnóstico histopatológico de cáncer

**Tabla 2.** Sistema de estadificación TNM. T (tumor primario), N (nódulos linfáticos regionales) y M (metástasis a distancia) (Shaha, 2007).

---

<b>TUMOR PRIMARIO</b>	
TX	El tumor primario no ha podido valorarse
T0	No hay evidencia de tumor primario
T1	Tumor de <2 cm limitado a la glándula
T2	Tumor entre 2 y 4 cm limitado a la glándula
T3	Tumor >4 cm con extensión extratiroidea mínima
T4a	Tumor de cualquier tamaño y con extensión a tejido subcutáneo, laringe, tráquea o esófago.
T4b	Tumor de cualquier tamaño y con extensión a la fascia paravertebral, a la arteria carótida o a los vasos mediastinales.
<b>NÓDULOS LINFÁTICOS REGIONALES</b>	
NX	Los nódulos no han podido valorarse
N0	No hay evidencia de metástasis
N1	Metástasis de nódulos linfáticos regionales
N1a	Metástasis pretraqueal, paratraqueal y faríngea.
N1b	Metástasis unilateral, bilateral o contralateral cervical.
<b>METÁSTASIS A DISTANCIA</b>	
MX	La metástasis a distancia no pudo valorarse
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

---

folicular y extensión extratiroidea. El grupo de riesgo intermedio se divide en dos, el primero es un grupo de pacientes mayor de 45 años de edad, sin metástasis a distancia, con un diagnóstico histopatológico de cáncer papilar de tiroides y una masa no mayor de 4 cm; el segundo grupo, reúne a pacientes con un cáncer agresivo, una edad menor de 45 años, una masa mayor de 4 cm, con un diagnóstico histopatológico de cáncer folicular y metástasis a distancia. La división de los pacientes con cáncer de tiroides en grupos de riesgo bajo, intermedio y alto, permite estimar la conducta terapéutica y su sobrevivencia. Así, los pacientes clasificados en el grupo de riesgo bajo tienen una expectativa de vida a los 5 años del 100%, los pacientes con riesgo intermedio del 96% y los pacientes del grupo de alto riesgo un 72% (Shaha, 2007) (tabla 3).

**Tabla 3.** Grupos de riesgo bajo, intermedio y alto en pacientes de cáncer de tiroides, agrupados de acuerdo a factores pronóstico como edad de diagnóstico, metástasis a distancia, tamaño del tumor y tipo histológico (Shaha, 2007).

	<b>Bajo</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Alto</b>
Edad de diagnóstico	< 45	< 45	> 45	> 45
Metástasis a distancia	MO	M1	MO	M1
Tamaño del tumor	T1, T2	T3, T4	T1, T2	T3, T4
Tipo histológico	Papilar	Folicular	Papilar	Folicular

### 1.3 SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL CÁNCER

Hasta hace unos años se consideraba que el principal y casi único factor causal de la mayoría de los cánceres se hallaba en el ambiente, por lo que el riesgo se relacionaba de manera directa y proporcional a la potencia genotóxica del xenobiótico y a los niveles de exposición. Esta asociación sigue siendo asumida como válida, pero cada vez se da más relevancia al papel que juega la variabilidad genética individual en la modulación del riesgo frente a una exposición y en la susceptibilidad a desarrollar diversas patologías (Taningher et al., 1999). Se sabe que el 5-10% de los casos de cáncer están causados por mutaciones heredadas y el catálogo de enfermedades hereditarias de la OMIM tiene 310 entradas que contienen la palabra clave “*inherited cancer*” (datos de septiembre 2010).

La etiología multigénica del cáncer incluye genes de **alta** y de **baja penetrancia**. Los genes de **alta penetrancia** incluyen genes que causan síndromes de cáncer familiar poco frecuentes, como la neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (Mulligan et al., 1993), *CDKN2A* en el melanoma familiar (Holland et al., 1999), *BRCA1* en el cáncer de mama familiar y el cáncer de ovario (Hall et al., 1990; Narod et al., 1991; Miki et al., 1994) *BRCA2* en el cáncer de mama familiar (Wooster et al., 1994; Wooster et al., 1995), *MLH1* y *MSH2* en el cáncer colorrectal hereditario (Fishel et al., 1993; Lindblom et al., 1993; Peltomaki et al., 1993; Bronner et al., 1994; Nystrom-Lahti et al., 1994). Sin embargo, estas excepciones tienden a representar sólo una pequeña porción de las enfermedades hereditarias. Por ejemplo, en la susceptibilidad al cáncer de mama, los genes *BRCA1* y *BRCA2* explican menos de 30% de los cánceres de mama familiar y una insignificante proporción de los cánceres de mama esporádico (Diez et al., 2003;

Thompson y Easton, 2004). Es decir, la base genética de la mayoría de los cánceres sigue siendo poco clara.

Parece que las variantes genéticas con efectos modestos sobre la susceptibilidad al cáncer (**genes de baja penetrancia**) son responsables de la mayor parte del riesgo (Botstein y Risch, 2003; Houlston y Peto, 2004; Zondervan y Cardon, 2004). Estudios de asociación que comparan las distribuciones de genotipos entre individuos con cáncer (casos) e individuos sin cáncer (controles) son considerados la mejor estrategia para detectar estos efectos (Risch y Merikangas, 1996; Cardon y Bell, 2001). Existen varios tipos de variantes polimórficas en el genoma humano, pero los más frecuentes y útiles para el genotipado son los polimorfismos de una sola base (SNPs). Los SNPs son loci genómicos donde dos bases alternativas están presentes con una frecuencia superior al 1%. Se trata de las variaciones más comunes en el genoma humano, se producen cada cientos de pares de bases y se han identificado hasta la fecha casi diez millones de SNPs. Los estudios de asociación siguen dos aproximaciones complementarias: análisis en genes candidatos y análisis integral del genoma. El estudio de asociación en genes candidatos se basa en el genotipado de un número pequeño de SNPs en genes que intervienen en vías biológicas relacionadas con el tumor objeto de estudio; por ejemplo, la vía de reparación del DNA, seleccionando los SNPs que se encuentran principalmente en exones, la región 3'UTR (sitios de unión de miRNA) y la región 5'UTR (sitios de unión de factores de transcripción). El genotipado de los SNPs seleccionados en el grupo de casos y controles permite estimar el riesgo (OR) (Carlson et al., 2004; Neale y Sham, 2004). Este tipo de análisis se denomina el enfoque directo (*direct approach*) (Carlson et al., 2004). El análisis integral del genoma (enfoque indirecto) se basa en el argumento de que las variantes genéticas de efecto modesto asociadas con las enfermedades pueden estar distribuidas en regiones codificantes y no codificantes del genoma (Carlson et al., 2004; Hirschhorn y Daly, 2005). Por lo tanto, se analizan los SNPs situados en sitios de unión de factores de transcripción y promotores, y microRNAs (Beohar y Kawamoto, 1998; Kawada et al., 1999; Abelson et al., 2005; Clop et al., 2006). Además, recientemente se incluyen las secuencias conservadas ya que pueden desempeñar un papel en la variabilidad fenotípica en humanos (Dermitzakis et al., 2005; Hirschhorn y Daly, 2005; Drake et al., 2006). Si se opta por un estudio indirecto se deberán estudiar un gran número de regiones genómicas para buscar las áreas concretas ligadas a la enfermedad, es decir, los SNPs se utilizan para captar

variación en un gen candidato o en una región del genoma. La idea en la que se basa este análisis es que las asociaciones serán detectadas ya sea directamente con variantes causales o indirectamente si los marcadores están en desequilibrio de ligamiento con variantes causales (Carlson et al., 2004; Neale y Sham, 2004).

Una serie de plataformas de genotipado, como Illumina Affymetrix permiten el genotipado de matrices de hasta 1.000.000 SNPs en una única reacción múltiple. Estas plataformas permiten combinar tanto el enfoque directo como el enfoque indirecto para ser adoptados a escala de todo el genoma. Estos estudios denominados estudios masivos de todo el genoma o **estudios de asociación integral del genoma (*genome-wide association; GWA*)** están comenzando a ser aplicados a la búsqueda de genes de baja penetrancia en un número de enfermedades complejas.

### ***1.3.1 FACTORES GENÉTICOS IDENTIFICADOS POR ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN INTEGRAL DEL GENOMA***

El desarrollo de la tecnología de análisis masivo utilizando las plataformas de genotipado permite el estudio de cientos, miles, o cientos de miles de SNPs al mismo tiempo. Estos estudios requieren la utilización de un tamaño poblacional muy grande para reducir la probabilidad de falsos positivos. El tamaño grande de población requerido se consigue mediante Consorcios Internacionales que aportan un elevado número de casos y controles para este tipo de estudios.

Gracias a esta estrategia se han empezado a identificar loci responsables de las enfermedades complejas, entre las que se encuentra el cáncer. Actualmente hay alrededor de 40 genes de susceptibilidad al cáncer ya identificados, cada uno de ellos confiriendo un riesgo no superior a 1,3. Este riesgo es menor de lo esperado, lo que sugiere la existencia de cientos de genes de susceptibilidad que deben interaccionar entre sí para facilitar el desarrollo tumoral.

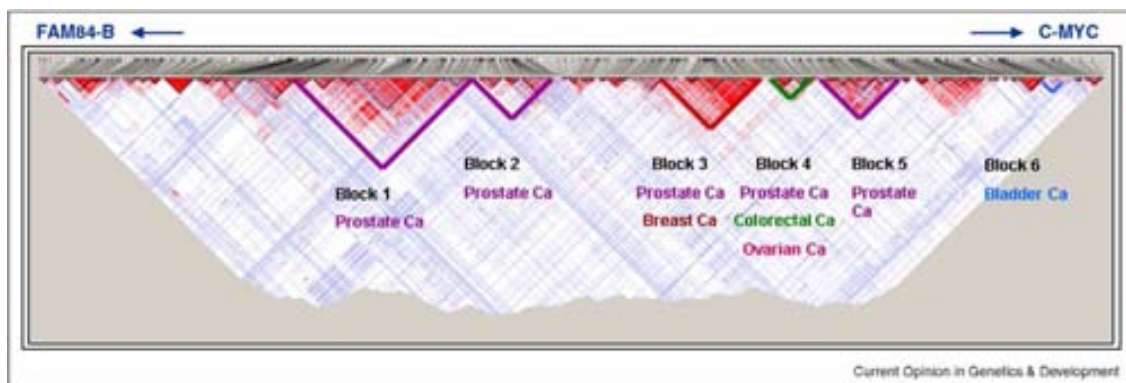
Los estudios GWAs realizados en muchos tipos de cánceres han generado muchas asociaciones interesantes en el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer colorrectal y el cáncer de pulmón (tabla 4); asimismo, estudios similares se han realizado en páncreas, estomago, esófago, vejiga, testículo, ovario y tiroides.

**Tabla 4.** Loci comunes de susceptibilidad al cáncer de mama, próstata, colorrectal y de pulmón identificados a través de GWAS (Varghese y Easton 2010).

<b>Locus</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>SNP</b>	<b>MAF</b>	<b>OR</b>
<b>Cáncer de mama</b>				
1p11.2	1	rs11249433	0,39	1,16
2q35	2	rs13387042	0,50	1,20
NEK10/SLC4A7	3	rs4973768	0,46	1,11
MAP3K1	5	rs889312	0,28	1,13
MRPS30	5	rs10941679	0,24	1,19
ESR1	6	rs2046210	0,36	1,29
8q24	8	rs13281615	0,40	1,08
FGFR2	10	rs2981582	0,38	1,26
LSP1	11	rs3817198	0,30	1,07
RAD51L1	14	rs999737	0,76	1,06
TOX3	16	rs3803662	0,25	1,20
COX11	17	rs6504950	0,73	1,05
<b>Cáncer de próstata</b>				
ITGA6	2	rs12621278	0,94	1,3
2p15	2	rs721048	0,19	1,15
THADA	2	rs1465618	0,23	1,08
3p12	3	rs2660753	0,11	1,18
3q21.3	3	rs10934853	0,28	1,12
TET2	4	rs7679673	0,55	1,09
PDLIM5	4	rs17021918	0,66	1,1
PDLIM5	4	rs12500426	0,46	1,08
6q25	6	rs9364554	0,29	1,17
7q21	7	rs6465657	0,46	1,12
JAZF1	7	rs10486567	0,77	1,12
8p21	8	rs2928679	0,42	1,05
NKX3.1	8	rs1512268	0,45	1,18
8q24	8	rs620861	0,61	1,28
8q24	8	rs10086908	0,70	1,25
8q24	8	rs445114	0,64	1,14
8q24	8	rs16902094	0,15	1,21
8q24	8	rs6983267	0,50	1,26
8q24	8	rs1447295	0,10	1,62
8q24	8	rs16901979	0,03	2,1
CTBP2	10	rs4962416	0,27	1,17
MSMB	10	rs10993994	0,40	1,25
11p15	11	rs7127900	0,20	1,22
11q13	11	rs7931342	0,51	1,16
HNF1B	17	rs4430796	0,49	1,24
HNF1B	17	rs11649743	0,80	1,28
17q24.3	17	rs1859962	0,46	1,25
KLK2/KLK3	19	rs2735839	0,85	1,2
19q13.2	19	rs8102476	0,54	1,12
22q13	22	rs5759167	0,53	1,16
Xp11	X	rs5945619	0,36	1,19
<b>Cáncer colorrectal</b>				
8q24	8	rs6983267	0,50	1,17
EIF3H	8	rs16892766	0,07	1,25
10p14	10	rs10795668	0,67	1,12
11q23	11	rs3802842	0,29	1,12
BMP4	14	rs4444235	0,46	1,11
CRAC1	15	rs4779584	0,19	1,26
CDH1	16	rs9929218	0,71	1,10
SMAD7	18	rs4939827	0,53	1,15
RHPN2	19	rs10411210	0,90	1,15
BMP2	20	rs961253	0,35	1,12
<b>Cáncer de pulmón</b>				
CLPTM1L	5	rs401681	0,57	1,13
BAT3	6	rs3117582	0,13	1,24

El cáncer de mama es un buen ejemplo del éxito de esta nueva estrategia. El primer estudio se publicó en el año 2007 y fue realizado por el consorcio BCAC (*Breast Cancer Association Consortium*) que agrupa a 21 grupos europeos (Easton et al., 2007). El estudio se realizó estudiando más de 30.000 casos y otros tantos controles. A lo largo de tres etapas se fueron filtrando los 250.000 SNPs distribuidos a lo largo del genoma hasta finalmente seleccionar 8 SNPs candidatos. Estos SNPs han sido validados en otros tres estudios masivos indicando la robustez y fiabilidad de los análisis de todo el genoma aplicando la nueva estrategia.

Los resultados de los GWAs han mostrado dos regiones del genoma asociadas a varios tipos de cáncer. Por una parte, la región 8q24 que es de particular interés porque, por primera vez, se encuentra una región que no contiene genes asociada con cáncer de próstata, vejiga, mama y cáncer colorrectal, y la asociación se ha reproducido con éxito en estudios independientes (figura 5). Es posible suponer que la variación genómica en este locus marca un camino cancerígeno común a muchos tipos de cáncer y la evidencia reciente sugiere un papel en la regulación del oncogén *MYC* (Darcy et al., 2009; Dimova et al., 2009; Komiya et al., 2010). Un segundo locus es el 5p15.33, también asociado con varios tipos de cánceres como pulmón, vejiga, próstata y cuello (Rafnar et al., 2009).



**Figura 5.** La región 8q24 asociada con el riesgo de diferentes tipos de cánceres (Varghese y Easton 2010).

Las claras ventajas de este enfoque es que no depende de nuestro conocimiento relativamente limitado de la biología de la enfermedad, reduce los falsos positivos y maximiza el poder estadístico del análisis. La desventaja de los GWAs es su alto coste.



### 1.3.2 FACTORES EPIGENÉTICOS

Las alteraciones de la expresión génica, potencialmente hereditarias, que no se acompañan de ninguna modificación en la secuencia del DNA se denominan alteraciones epigenéticas y también están implicadas en la susceptibilidad al cáncer (Jones y Baylin, 2007).

La potencial heredabilidad de estos cambios implica que pueden participar en el desarrollo del cáncer y sufrir los mismos procesos selectivos que las alteraciones genéticas. En este sentido, está bien establecido que las alteraciones epigenéticas aparecen en estadios precoces del cáncer (Suzuki et al., 2004) sin necesidad de mutaciones previas a su desarrollo, aunque tampoco es incompatible la existencia de ambos procesos simultáneamente.

Las consecuencias de los cambios epigenéticos incluyen la alteración de la transcripción del DNA (Cadieux et al., 2006), la activación aberrante de determinados genes (Bestor, 1998; Bird, 2002), la predisposición a la inestabilidad génica a través de la alteración en el control de la replicación cromosómica (Narayan et al., 1998; Okano et al., 1999; Xu et al., 1999; Tuck-Muller et al., 2000) y el silenciamiento de genes cuyo papel es importante en la cascada de iniciación y progresión del cáncer (Jones y Laird, 1999; Jones y Baylin, 2002; Herman y Baylin, 2003). Esta última consecuencia tiene una especial relevancia ya que puede afectar a múltiples genes, entre los que destacan los supresores de tumores, los factores de transcripción, los genes encargados de la remodelación de tejidos, los de reparación del DNA, los que controlan el ciclo celular y los que previenen la activación anómala del desarrollo tumoral.

Entre las diversas alteraciones epigenéticas que comportan una expresión génica alterada, la metilación está considerada por muchos autores como el principal mecanismo epigenético implicado en el cáncer, ya sea a través de un fenómeno de hipometilación global o de hipermetilación localizada en el promotor de determinados genes (tabla 5) (Baylin y Ohm, 2006; Feinberg et al., 2006).

Las regiones ricas en secuencias CG constituyen las islas CpG, en las que la citosina puede estar metilada. El 40% de los genes de mamíferos contienen islas CpG en sus promotores, llegando al 70% en el caso de promotores de genes humanos.

El fenómeno de **hipometilación** es una disminución en el número de citosinas metiladas, conduciendo directamente a una inestabilidad génica (Ji et al., 1997; Qu et al., 1999). La hipometilación génica es responsable de la activación de oncogenes, como

**Tabla 5.** Genes supresores de tumor con expresión silenciada por metilación de su promotor (Garinis et al., 2002).

<b>Gen</b>	<b>Tipo de tumor</b>	<b>Función</b>
<i>p14</i>	Cáncer colorrectal	Inhibidor de ciclina dependiente de cinasa
<i>p15</i>	Hematológicos	Inhibidor de ciclina dependiente de cinasa
<i>p16</i>	Tumores sólidos	Inhibidor de ciclina dependiente de cinasa
<i>BRCA-1</i>	Mama, ovario	Reparación del DNA
<i>E-Cad</i>	Mama, gástrico	Adhesión intercelular
<i>APC</i>	Cáncer colorrectal, gástrico	Interacciona con betacatenina
<i>MLH1</i>	Cáncer colorrectal, gástrico	Reparación del DNA
<i>VHL</i>	Renal	Angiogénesis
<i>p73</i>	Linfoma	Ciclo celular
<i>MGMT</i>	Cáncer colorrectal, gástrico	Reparación del DNA
<i>pRb</i>	Glioblastoma	Ciclo celular
<i>TIMP3</i>	Cáncer colorrectal, renal	Inhibe las metaloproteinasas de tejido
<i>DAPK1</i>	Cérvix	Apoptosis por IFN
<i>ER</i>	Vejiga urinaria	Receptor
<i>p53</i>	Hígado	Inhibidor del ciclo celular
<i>RASSF1A</i>	Nasofaríngeo, ovario, riñón	Homólogo del efector RAS
<i>RARB2</i>	Nasofaríngeo	Receptor de ácido retinoico
<i>COX-2</i>	Gastrointestinal	Síntesis de prostaglandinas
<i>CASP</i>	Meduloblastoma	Proteasa proapoptótica
<i>EDN1</i>	Pulmón	Vasoconstrictor

*SI00A4* en el cáncer colorrectal o *ciclina D2* en el carcinoma gástrico (Oshimo et al., 2003) y del fenómeno de pérdida de la impronta genómica (*loss of imprinting*), responsable del desarrollo de cáncer tras la hipometilación de una determinada región génica como, por ejemplo, la del gen *IGF2A* en el cáncer colorrectal (Cui et al., 2002).

En la última década ha sido posible establecer dos tipos diferentes de **hipermetilación** en el genoma humano (Toyota et al., 1999). La metilación tipo A que se da de forma fisiológica a lo largo de todo el genoma, sin asociarse estrictamente con la aparición de cáncer y, por tanto, está presente en el tejido sano. Característicamente aumenta con la edad y, en algún momento, puede volverse aberrante y afectar a genes

que intervienen en el ciclo celular, conduciendo al desarrollo de cáncer. Se desconoce el mecanismo desencadenante, pero se postula que está relacionado con progresivos ciclos de replicación del DNA. El máximo exponente de ello es la metilación de la región promotora del gen que codifica para el receptor de estrógenos (Issa et al., 1994), aunque afecta a otros, como *MyoD*, *CSPG2*, *IGF2*, *N33* o *PAX6*.

La metilación considerada como específica del cáncer, o tipo C, es la que afecta selectivamente a genes implicados en la carcinogénesis, por lo que no está presente en el tejido sano y es menos frecuente. Este fenómeno se relaciona con el fenotipo metilador de islas CpG o CIMP (*CpG island methylator phenotype*) (Toyota et al., 1999).

### **1.4 FACTORES DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES**

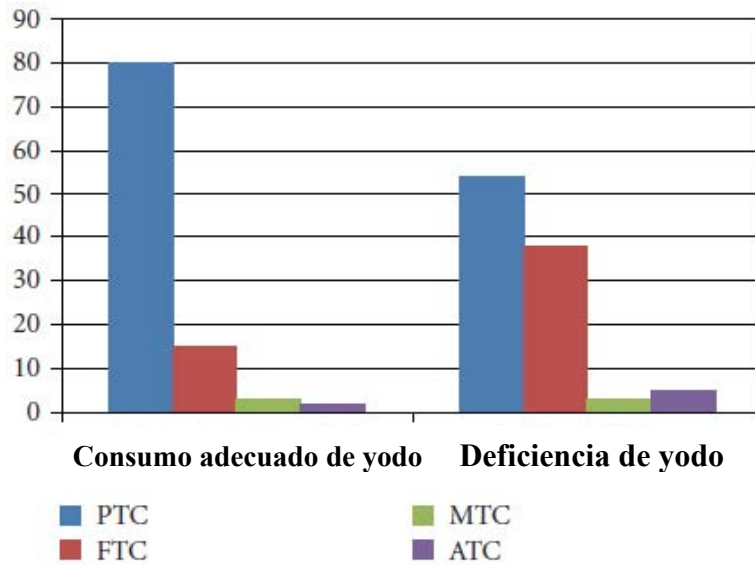
El cáncer de tiroides es un proceso modulado por factores tanto genéticos como ambientales. Así, la exposición a la radiación, el consumo de yodo, factores hormonales y los antecedentes familiares son supuestos factores de riesgo del carcinoma de tiroides.

#### ***1.4.1 FACTORES AMBIENTALES DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES***

La exposición a la radiación se asocia con el carcinoma papilar, como lo demuestran las secuelas de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki (1945), los ensayos nucleares en las Islas Marshall (1954) y en Nevada (1951-1962) y el accidente nuclear más reciente de Chernobyl (1986) (Kazakov et al., 1992). Después del desastre de Chernobyl el efecto de la exposición a la radiación fue más marcado en los niños. No está claro si esto se debe a que la tiroides es más susceptible a la radiación en la infancia, si es un reflejo del hecho de que los niños bebieron más leche contaminada, aumentando su exposición a la radiación, o a ambos factores (Williams, 2002). La radiación de la cabeza y el cuello durante la infancia, para el tratamiento de lesiones benignas también aumenta el riesgo de carcinoma papilar (Ron et al., 1995).

El yodo es necesario para la glándula tiroidea. Una dieta deficiente en yodo resulta en la proliferación de la tiroides, conocida como bocio. La incidencia del carcinoma folicular en áreas con deficiencia de yodo es mayor que en las áreas con una dieta rica en yodo (figura 6). Por el contrario, el carcinoma papilar es el tipo de cáncer de tiroides más frecuente en regiones con dieta abundante en yodo (Harach et al., 2002). Curiosamente, en modelos animales la suplementación de yodo resulta en un cambio de

la morfología folicular a papilar, lo que indica que en la carcinogénesis tiroidea una de las funciones del yodo es modular la morfología del tumor, en lugar de iniciar la



**Figura 6.** Contribución del yodo de los alimentos en la tumorigénesis del tiroides (Giusti et al. 2010). ATC: cáncer anaplásico; FTC: cáncer folicular; MTC: cáncer medular; PTC: cáncer papilar.

carcinogénesis (Yamashita et al., 1990). A pesar de estas relaciones bien documentadas, el papel del yodo en la carcinogénesis tiroidea sigue siendo poco claro.

La mayoría de los carcinomas de tiroides bien diferenciados se manifiestan en pacientes de 20-50 años de edad, y la enfermedad es 2-4 veces más frecuente en mujeres que en hombres. Estas distribuciones por sexo y edad sugieren que la incidencia de hormonas femeninas podrían regular la carcinogénesis tiroidea. De hecho, el receptor de estrógeno se expresa en las células foliculares y el estrógeno promueve la proliferación de estas células (Kawabata et al., 2003; Lee et al., 2005). Sin embargo, no existe una relación clara entre el cáncer de tiroides y el embarazo o el uso de hormonas sexuales (Haselkorn et al., 2003).

Aunque el tabaco se considera como el principal factor de riesgo externo del cáncer en general, en el caso del cáncer de tiroides, se ha observado que los fumadores tienen un 40% menos riesgo de desarrollar cáncer de tiroides que los no fumadores (Rossing et al., 2000; Negri et al., 2002; Mack et al., 2003). Se proponen diversos mecanismos para explicar esta relación inversa entre el consumo de tabaco y el riesgo a desarrollar cáncer de tiroides. El primero se relaciona con la secreción de TSH, se considera que los niveles elevados de TSH incrementan el riesgo de cáncer de tiroides, y estos niveles son más bajos en los fumadores. La segunda explicación descarta que la

asociación esté mediada por alteraciones en el tamaño del tiroides, considerando los efectos bociogénicos del tabaco sobre el tamaño glandular (debido al tiocianato que tiene). Finalmente, se plantea que los fumadores tienen una mayor capacidad metabólica para inactivar los estrógenos hepáticos, con lo cual disminuye la biodisponibilidad de estas hormonas en los sitios dianas (Mack et al., 2003).

De la misma forma, algunos estudios muestran también una relación inversa entre el alcohol y la tendencia a desarrollar un cáncer de tiroides, aunque otros estudios no han encontrado esta relación (Meinhold et al., 2009).

### ***1.4.2 FACTORES GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES***

La considerable variación étnica de la prevalencia del cáncer de tiroides (más frecuente en los judíos y población indígena de Hawai) puede ser un indicador de que el riesgo de padecerlo está regulado genéticamente. Se acepta que la historia familiar es el segundo riesgo más conocido para desarrollar esta enfermedad (3-5% de los pacientes que desarrollan el cáncer papilar y 20-25% que desarrollan cáncer medular). Con respecto al cáncer medular las causas genéticas están bien establecidas y resultan del desorden conocido como neoplasia múltiple endocrina de tipo IIA (MEN 2A) (Patocs et al., 2003; Robledo et al., 2003).

En el 3-5% de los pacientes con cáncer de tiroides existe una historia familiar positiva de tumores de tiroides en familiares de primer grado. De hecho, en las familias con cáncer papilar de tiroides, este tipo de cáncer se encuentra en varios miembros del árbol genealógico y se hereda como una enfermedad autosómica dominante con una penetrancia incompleta. Se ha indicado que los miembros de la familia afectados muestran mayor agresividad del tumor que en la población general (la alta frecuencia de la forma multifocal en comparación a los pacientes con PTC esporádico), aunque esta observación no ha sido confirmada en otros estudios (Malchoff y Malchoff, 2004).

Está bien establecido que existen factores genéticos son responsables de algunos síndromes familiares asociados con la alta prevalencia de la enfermedad de tiroides, como el FAP (*Familial adenomatous polyposis*), la CD (*Cowden disease*) y el CNC (*Carney complex*).

En el caso de FAP (OMIM # 175100), el riesgo de desarrollar el PTC multicéntrico es alrededor de 100 veces mayor que el observado en la población general (Harach et al., 1994) y hombres menores de 35 años son frecuentemente afectados.

LA CD (OMIM # 158350), se comporta como una enfermedad autosómica dominante donde el riesgo de PTC o FTC también es mayor que lo observado en la población general (Pilarski, 2009).

Por último, el CNC (OMIM # 160980) es una neoplasia endocrina que se hereda como una enfermedad autosómica dominante. La enfermedad se caracteriza por la pigmentación de la piel con manchas y neoplasias de tiroides, ya sea folicular o papilar (Casey et al., 2000; Kirschner et al., 2000; Bertherat et al., 2009).

De acuerdo con las dos estrategias generales seguidas en los estudios de susceptibilidad indicados anteriormente, el análisis de la susceptibilidad al cáncer de tiroides se ha basado principalmente en genes candidatos: genes de reparación del DNA y genes que controlan el ciclo celular, genes del metabolismo y genes implicados en la función tiroidea. Asimismo, estudios de asociación con todo el genoma también han permitido la identificación de regiones en el genoma implicados en el riesgo al cáncer de tiroides, involucrando diversos genes.

### **Genes de reparación del DNA**

Un resumen de los estudios de asociación del cáncer de tiroides con los genes de reparación recogidos en la revisión de Adjadj et al 2009, se especifican en la tabla 6. Solo tres estudios mostraron suficiente poder estadístico para detectar unas *odds ratio* de dos o más, en todos los estudios realizados. El mayor riesgo de cáncer de tiroides se encontró con el gen *CHEK2* (OR 4,9; P = 0,0006), (Cybulski et al., 2004) y *XRCC3* (OR 2,1; P = 0,004) (Sturgis et al., 2005). No se ha encontrado asociación con los polimorfismos analizados de los genes *XRCC7*, *RAD51*, *RAD52*, *BRCA1* y *BRCA2* y el riesgo de desarrollar el cáncer de tiroides (Sturgis et al., 2005). Otros trabajos más recientes implican los genes *XRCC1*, *ADPRT* y *RAD52*, observándose que dos polimorfismos (Arg194Trp y Arg399Gln) del gen *XRCC1* aumentan el riesgo de desarrollar el cáncer de tiroides (Ho et al., 2009). Por otra parte, La interacción del alelo (194Trp) del gen *XRCC1* con el alelo (762Ala) del gen *ADPRT* causa un aumento sustancial de la susceptibilidad al cáncer de tiroides (Chiang et al., 2008). Según el trabajo de Siraj et al. (2008) varios polimorfismos del gen *RAD52* mostraron asociación con el PTC en una población de Arabia Saudí.

**Tabla 6.** Estudios de polimorfismos en genes de reparación en cáncer de tiroides (Adjadj et al., 2009).

<b>Polimorfismo</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>OR</b>	<b>P</b>	<b>Referencia</b>
<i>CHEK2</i> 1G→A	6/173	29/4000	4,9 (1,6–12,3)	0,0006	(Cybulski et al., 2004)
<i>CHEK2</i> 430T→C (Ile157Thr)	15/173	193/4000	1,9 (1,0–3,3)	0,04	(Cybulski et al., 2004)
<i>XRCC3</i> 18067C→T (Thr241Met)	89/134	78/166	2,1 (1,3–3,4)	0,004	(Sturgis et al., 2005)
<i>XRCC7</i> 6721T→G (intron)	85/134	99/166	1,2 (0,7–1,9)	----	(Sturgis et al., 2005)
<i>RAD51</i> 135G→C (5' UTR)	19/129	22/166	1,5 (0,7–3,0)	----	(Sturgis et al., 2005)
<i>RAD52</i> 38207T→C (intron)	73/116	107/165	1,0 (0,6–1,6)	----	(Sturgis et al., 2005)
<i>BRCA1</i> 2731C→T (Pro871Leu)	63/131	88/163	0,9 (0,5–1,4)	----	(Sturgis et al., 2005)
<i>BRCA1</i> 3232A→G (Glu1038Gly)	65/134	88/165	0,9 (0,6–1,5)	----	(Sturgis et al., 2005)
<i>BRCA1</i> 3667A→G (Ser1613Gly)	61/129	91/165	0,8 (0,5–1,3)	----	(Sturgis et al., 2005)
<i>BRCA1</i> 4956A→G (Ser1613Gly)	64/134	87/165	0,9 (0,6–1,5)	----	(Sturgis et al., 2005)
<i>BRCA2</i> 1342A→C (Asn372His)	57/129	82/165	0,9 (0,6–1,5)	----	(Sturgis et al., 2005)
<i>BRCA2</i> 3199A→G (Asn991Asp)	13/127	12/165	1,3 (0,5–3,0)	----	(Sturgis et al., 2005)
<i>ERCC2</i> 23591G→A (Asp312Asn)	63/108	110/213	1,3 (0,8–2,2)	----	(Silva et al., 2005a)
<i>ERCC2</i> 23591G→A	17/108	19/213	2,0 (0,9–4,3)	----	(Silva et al., 2005a)
<i>ERCC2</i> 3593191A→C (Lys751Gln)	68/108	120/213	1,3 (0,8–2,2)	----	(Silva et al., 2005a)
<i>ERCC2</i> 3593191A→C	20/108	28/213	1,6 (0,8–3,2)	----	(Silva et al., 2005a)

### Genes del ciclo celular

Los distintos estudios de polimorfismos en genes que controlan el ciclo celular y su asociación con el cáncer de tiroides incluyen: *P53*, *FAS*, *CDKN2A* y *VEGF* (tabla 7).

El polimorfismo que produce la sustitución Pro72 por Arg72 en el gen *P53* incrementa la inducción de la apoptosis, lo que podría afectar el riesgo de desarrollar el cáncer (Dumont et al., 2003). Así, el papel del alelo Pro72 de *P53* en el riesgo del cáncer de tiroides se ha evaluado en dos estudios, encontrándose una asociación con el riesgo de cáncer de tiroides (Granja et al., 2004a; Rogounovitch et al., 2006).

Por lo que respecta al gen *CDKN2A*, se han descrito mutaciones en el gen en tejidos de cáncer folicular y anaplásico de tiroides, pero no en el cáncer papilar (Tung et al., 1996). Sin embargo, no se ha encontrado asociación del cáncer de tiroides y el polimorfismo Thr148 del gen *CDKN2* (Debniak et al., 2006). Sin embargo, habría que señalar que el resultado negativo podría deberse a la frecuencia baja de esta variante en la población (3% en controles).

El gen *FAS* (también llamado *Apo-1* o *CD95*) juega un papel importante en la apoptosis. Los estudios de asociación de varios polimorfismos de este gen con el cáncer de tiroides son contradictorios. La variante 988C → T (exón 7) está asociada significativamente con el cáncer papilar (Basolo et al., 2004). Sin embargo, otros autores no encontraron asociación en el análisis de los polimorfismos del promotor 37G → A, 670A → G y 744A → G, en el exón 3 18272A → G, y en el exón 7 22628C → T (Erdogan et al., 2007; Ho et al., 2008).

El gen *VEGF* está implicado en la angiogénesis normal y anormal. La expresión de *VEGF* aumenta en la mayoría de los tumores (Carmeliet y Jain, 2000) y se ha demostrado su correlación directa con el tamaño y la agresividad del tumor de tiroides (Bunone et al., 1999). Asimismo, se ha descrito la asociación del polimorfismo 2578C → A, que se encuentra en el promotor, y un aumento del riesgo del cáncer de tiroides (Hsiao et al., 2007).



**Tabla 7.** Estudios de polimorfismos en genes que controlan el ciclo celular en cáncer de tiroides (Adjadj et al., 2009).

<b>Polimorfismo</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>OR</b>	<b>P</b>	<b>Referencia</b>
<i>P53</i> G→C (Arg72Pro)	92/169	154/313	1,2 (0,8–1,8)	----	(Rogounovitch et al., 2006)
<i>P53</i> G→C (Arg72Pro)	17/169	24/313	1,3 (0,7–2,6)	----	(Rogounovitch et al., 2006)
<i>P53</i> G→C (Arg72Pro)	61/98	102/153	0,8 (0,5–1,4)	----	(Granja et al., 2004a)
<i>P53</i> G→C (Arg72Pro)	12/98	3/153	7,0 (1,9–25,6)	<0,001	(Granja et al., 2004a)
<i>CDKN2A</i> 442G→A (Ala148Thr)	3/173	105/3000	0,5 (0,1–1,6)	----	(Debniak et al., 2006)
<i>FAS</i> 988C→T	9/21	24/64	0,8 (0,3–2,2)	----	(Basolo et al., 2004)
<i>FAS</i> 988C→T	29/45	61/100	1,2 (0,6–2,4)	----	(Erdogan et al., 2007)
<i>FASL</i> 843C→T21	23/45	55/100	0,9 (0,4–1,7)	----	(Erdogan et al., 2007)
<i>FAS</i> 988C→T	66/279	110/510	1,1 (0,8–1,5)	----	(Ho et al., 2008)
<i>FAS</i> 988C→T	213/279	365/510	1,2 (0,9–1,7)	----	(Ho et al., 2008)
<i>FAS</i> 988C→T (Thr74Thr)	41/279	61/510	1,2 (0,7–1,8)	----	(Ho et al., 2008)
<i>FAS</i> 988C→T (Thr74Thr)	126/279	230/510	1,1 (0,8–1,5)	0,04	(Ho et al., 2008)
<i>VEGFA</i> 2578C→A23	141/296	101/248	1,4 (1,0–1,8)	<0,001	(Hsiao et al., 2007)

## **Genes del metabolismo**

Las enzimas de la fase I del metabolismo (CYP) degradan productos xenobióticos, produciendo intermediarios que serán eliminados por las enzimas de la fase II (GST). Los distintos estudios de asociación del cáncer de tiroides con genes del metabolismo se resumen en la tabla 8. Como se observa, un aumento de riesgo de cáncer de tiroides se observó en variantes alélicas de *CYP1A1* y *CYP2D6* (Bufalo et al., 2006; Lemos et al., 2007).

Los estudios de asociación de las enzimas de la fase II con cáncer de tiroides son numerosos mostrando resultados contradictorios, incluyendo tres estudios de Brasil con los mismos pacientes (Morari et al., 2002; Canbay et al., 2003; Hernández et al., 2003; Gaspar et al., 2004; Granja et al., 2004a; Granja et al., 2005; Bufalo et al., 2006; Ho et al., 2006).

## **Genes implicados en la función tiroidea**

La incidencia del cáncer de tiroides es mayor en mujeres que en hombres, lo que sugiere la implicación de genes del metabolismo hormonal en la aparición del cáncer de tiroides.

Polimorfismos del gen *TSHR* fueron investigados en dos estudios (Matakidou et al., 2004; Lonn et al., 2007), el polimorfismo 2281C → G fue investigado en ambos estudios y mostró asociación con el riesgo del cáncer de tiroides.

El gen *TG* tiene un papel clave en la hormonogénesis del tiroides. Las anomalías en *TG* fueron reportadas en los individuos con bocio. Diversos estudios muestran la asociación del gen *TG* con enfermedades autoinmunes del tiroides (Tomer et al., 2002; Tomer y Greenberg, 2004). Sin embargo, solamente existe un solo trabajo en la bibliografía que muestra la asociación de una variante del gen *TG* (Gln2511Arg) con el cáncer de tiroides (Matakidou et al., 2004).

Por lo que respecta al gen *THRA* se une con las dos hormonas tiroideas, un microsatélite que se encuentra en una parte no codificante del exón 9 del *THRA*, muestra una alta frecuencia de inestabilidad observada en cáncer de tiroides (Onda et al., 2002). Otro estudio encontró un microsatélite (D17S2189) del gen *THRA* asociado con el cáncer de tiroides (P=0,034), sugiriendo un efecto protector de los alelos con menos de 20 repeticiones (Rebai et al., 2009).

Finalmente el gen *FOXE1* es un factor de transcripción específico de tiroides, juega un papel crucial en la morfogénesis de la tiroides. El único estudio GWA en

**Tabla 8.** Estudios de polimorfismos en genes de metabolismo en cáncer de tiroides (Adjadj et al., 2009).

<b>Polimorfismo</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>OR</b>	<b>P</b>	<b>Referencia</b>
<i>CYP1A1</i>	48/168	104/277	0,7 (0,4–1,0)	0,06	(Bufalo et al., 2006)
<i>GSTM1</i>	55/142	90/204	0,8 (0,5–1,3)	----	(Bufalo et al., 2006)
<i>GSTT1</i>	23/117	47/204	0,8 (0,4–1,5)	----	(Bufalo et al., 2006)
<i>GSTP1</i> 313A→G (Ile105Val)	46/111	82/203	1,0 (0,6–1,7)	----	(Bufalo et al., 2006)
<i>GSTO1</i> 419C→A (Ala140Asp)	14/73	25/184	1,5 (0,7–3,3)	----	(Bufalo et al., 2006)
<i>CYP2D6</i>	47/187	97/256	0,6 (0,4–0,8)	0,002	(Lemos et al., 2007)
<i>GSTP1</i> 313A→G (Ile105Val)	27/98	9/157	6,2 (2,7–15,8)	----	(Granja et al., 2004b)
<i>GSTM1</i> + <i>GSTT1</i>	8/69	15/300	2,6 (1,0–6,3)	0,05	(Morari et al., 2002)
<i>GSTM1</i>	33/67	116/300	1,5 (0,9–2,7)	----	(Morari et al., 2002)
<i>GSTT1</i>	17/67	67/300	1,2 (0,6–2,2)	----	(Morari et al., 2002)
<i>GSTM1</i> + <i>GSTT1</i>	32/201	64/680	2,1 (1,3–3,5)	0,03	(Ho et al., 2006)
<i>GSTM1</i>	111/201	358/680	1,1 (0,8–1,5)	----	(Ho et al., 2006)
<i>GSTT1</i>	51/201	140/680	1,4 (0,9–2,0)	----	(Ho et al., 2006)
<i>GSTM1</i>	22/32	19/44	2,9 (1,0–8,5)	0,05	(Canbay et al., 2003)
<i>GSTM1</i>	16/19	12/25	4,8 (1,3–7,1)	0,03	(Canbay et al., 2003)
<i>GSTM1</i> + <i>GSTT1</i> + <i>GSTP146</i>	11/103	11/204	2,9 (1,0–8,4)	<0,05	(Gaspar et al., 2004)
<i>GSTM1</i>	63/103	117/204	1,2 (0,7–1,9)	----	(Gaspar et al., 2004)
<i>GSTT1</i>	24/103	39/204	1,3 (0,7–2,3)	----	(Gaspar et al., 2004)
<i>GSTP1</i> 313A→G (Ile105Val)	43/103	97/204	0,8 (0,5–1,3)	----	(Gaspar et al., 2004)
<i>GSTM1</i> + <i>GSTT1</i>	15/134	12/116	1,1 (0,5–2,4)	----	(Hernández et al., 2003)
<i>GSTM1</i>	73/134	54/116	1,4 (0,8–2,3)	----	(Hernández et al., 2003)
<i>GSTT1</i>	26/134	19/116	1,2 (0,6–2,4)	----	(Hernández et al., 2003)
<i>GSTP1</i> 313A→G (Ile105Val)	60/134	57/116	0,8 (0,5–1,4)	----	(Hernández et al., 2003)
<i>GSTO1</i> 419C→A (Ala140Asp)	19/93	27/173	1,6 (0,8–3,28)	----	(Granja et al., 2005)

cáncer de tiroides realizado hasta la fecha ha implicado al gen *FOXEI* en la susceptibilidad al cáncer de tiroides (Gudmundsson et al., 2009). Estudios más recientes confirmaron los resultados del GWA, implicando el gen *FOXEI* en la susceptibilidad al cáncer de tiroides (Landa et al., 2009 ; Takahashi et al., 2010).

Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes implicados en muchos procesos como la proliferación, el desarrollo, la apoptosis y el metabolismo. La expresión de miRNAs se incrementa en los tumores en comparación con el tejido sano (Israel et al., 2009). El análisis de la expresión de miRNAs por microarrays, ha detectado una expresión aberrante de varios miRNAs en el PTC (Jazdzewski et al., 2009). La sobreexpresión de miR-221, miR-222 y miR-181 ha sido también demostrada en líneas celulares de tiroides de rata y de ratón. Los estudios funcionales, realizados mediante la inhibición y la sobreexpresión de miR-221 en humanos, han sugerido un papel crítico de la sobreexpresión del miR-221 en la carcinogénesis tiroidea (Pallante et al., 2006). La sobreexpresión de miR-221 en PTC puede afectar a la expresión de numerosos genes, incluyendo *HOXB5* (Nikiforova et al., 2009). Cuyo producto es una proteína nuclear implicada en el desarrollo de varios tejidos (Galang y Hauser, 1992). Sin embargo, solamente existe un solo trabajo en la literatura que muestra la asociación de una variante de un miRNA (miR-146a) con el cáncer de tiroides. El heterocigoto GC fue encontrado significativamente asociado con un aumento de la incidencia de PTC (OR = 1,6 IC 95% 1,3 -2,0; P <0,001) (Jazdzewski et al., 2008).

### 1.5 REGIONES DEL GENOMA ASOCIADAS AL CÁNCER DE TIROIDES

Recientes estudios de asociación han permitido identificar varias regiones del genoma relacionadas con el cáncer de tiroides 1p12, 8q24, 9q22.33 y 14q13.3. Estos estudios se llevan a cabo analizando todo el genoma o regiones concretas del genoma. así, 9q22.33 y 14q13.3 se identificaron en un estudio de GWA (Gudmundsson et al., 2009). En estas regiones se encuentran los genes *FOXEI* y *NKX2-1*, respectivamente. Ambos genes están implicados en la diferenciación de la glándula tiroidea. Posteriormente, se ha confirmado la implicación del *FOXEI* en la susceptibilidad al cáncer de tiroides (Landa et al., 2009; Takahashi et al., 2010). Asimismo, He et al. (2009) identificó un locus de susceptibilidad al cáncer de tiroides en la región 8q24. Por último, los estudios de asociación realizados previamente en nuestro grupo indican que

la región 1p12 está implicada en la susceptibilidad al cáncer de tiroides (Baida et al., 2005; Baida et al., 2008)

### **1.5.1 LA REGIÓN 1p12**

Se conocen que existen diversas alteraciones cromosómicas muestran varias regiones del genoma están relacionadas con el cáncer de tiroides, entre estas regiones los dos brazos del cromosoma 1 (Tung et al., 1997; Kitamura et al., 2000; Roque et al., 2001; Stoler et al., 2002; Wreesmann et al., 2002). En concreto la región 1p12 presenta distintos tipos de aberraciones (Rudolph et al., 1988; Vernole et al., 1989; Bieche et al., 1994; Zhang et al., 1999), incluyendo reordenaciones cromosómicas (Mitelman et al., 1997; Jin et al., 1998). Este cromosoma no solamente está implicado en el cáncer de tiroides sino en varios tipos de cáncer (Zhang et al., 1999; Smedley et al., 2000). En nuestro laboratorio se ha encontrado la asociación del cromosoma 1 con la susceptibilidad al cáncer de tiroides mediante un estudio de asociación del microsatélite BAT-40 (A)<sub>n</sub> (Baida et al., 2005). Con posterioridad se localizó la región de susceptibilidad en 1p12 donde los marcadores rs4658973 y rs2145418 mostraron asociación con el cáncer de tiroides (Baida et al., 2008). Ambos marcadores están separados por 377 kb y no muestran desequilibrio de ligamiento por lo que su relación con el cáncer de tiroides es independiente. El SNP rs4658973 está situado en el intrón 25 del gen *WDR3*, sin embargo el polimorfismo rs2145418 corresponde a una región vacía de genes, por lo tanto podría tratarse de una región reguladora.

### **El gen *WDR3***

El gen *WDR3* (*WD repeat domain 3*) fue clonado y mapeado en el cromosoma 1 humano (1p12) (Claudio et al., 1999). Su tamaño es de 30,8 kb, consta de 27 exones y codifica para una proteína de 943 aminoácidos. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas WDR, que están muy conservadas. Las proteínas WDR presentan repeticiones WD que son unidades de aproximadamente 40 aminoácidos que comienza por el dipéptido Gly-His (extremo amino terminal) y finaliza con un dipéptido Trp-Asp (extremo carboxilo terminal). Las proteínas WDR están implicadas en muchos procesos celulares, como la progresión del ciclo celular, traducción de señales, apoptosis y regulación génica (van der Voorn y Ploegh, 1992; Neer et al., 1994; Smith et al., 1999).

Un papel de *WDR3* sobre la biogénesis de ribosomas acaba de ser publicado (McMahon et al., 2010). Los autores de este trabajo proponen que el incremento de la

expresión del *WDR3* promueve la proliferación celular mediante la interrupción de la vía de síntesis de ribosomas. Estudios previos también demostraron que la expresión de las proteínas WDR están alteradas en algunos tipos de cáncer (Honore et al., 2002; Silva et al., 2005b). En general, estos estudios sugieren que los genes WDR podrían contribuir al desarrollo del cáncer. Por otra parte, se han encontrado mutaciones en al menos 4 genes que pertenecen a esta familia en una serie de enfermedades, como en el síndrome de Cockayne (Li y Roberts, 2001).

### **1.5.2 LA REGIÓN 8q**

En la región 8q se encuentran genes relacionados con la función tiroidea, como *TRHR* (receptor de la hormona liberadora de la tirotropina) en 8q23 y el *TG* (tiroglobulina) en 8q24. Además, la región 8q24 ha despertado interés recientemente debido a su asociación con diferentes tipos de cáncer, aunque los polimorfismos de interés no están ligados a genes que puedan ser los causantes de la susceptibilidad. En concreto en la región 8q24 se han identificado tres regiones independientes relacionadas con el riesgo de cáncer, incluyendo el cáncer de tiroides, pero se trata de regiones vacías de genes (Yeager et al., 2007; Wokolorczyk et al., 2008).

Es importante mencionar que antes de los estudios de susceptibilidad ya se había descrito la amplificación de 8q24 en varios tipos de cáncer (Cher et al., 1996; Nupponen et al., 1998). Además, utilizando el análisis de ligamiento He et al. (2009) se identificó un locus de susceptibilidad al cáncer de tiroides en 8q24 (AK023948). Este locus se encuentra dentro de un intrón del gen de la tiroglobulina (*TG*).

El cromosoma 8q se relacionó también con la enfermedad tiroidea autoinmune (AITD), incluyendo la enfermedad de Graves y la tiroiditis de Hashimoto (Tomer et al., 2002; Tomer y Greenberg, 2004; Adeniran et al., 2006). Anteriormente ya se había descrito que el cáncer de tiroides es más frecuente en la tiroiditis de Hashimoto (Di et al., 2001).

### **El gen de la tiroglobulina (*TG*)**

La tiroglobulina es la proteína más expresada en la glándula tiroidea y funciona como armazón para la hormonogénesis y almacenamiento de hormonas y yodo. Con lo cual, alteraciones en el gen *TG*, afectan la correcta fisiología tiroidea e incrementan el riesgo de padecer enfermedades benignas del tiroides. Es también conocido que estos desórdenes son importantes factores de riesgo para el desarrollo de carcinomas tiroideos, sobre todo no medulares (Matakidou et al., 2004).

El gen *TG* humano está ubicado en 8q24, cerca de los oncogenes *C-MYC* y *C-MOS*, y posee 270 kb de longitud (van de Graaf et al., 2001). La información codificada para la síntesis de la proteína está comprendida en un mRNA de 8,7 kb, lo que indica que el 97 % de la secuencia del gen corresponde a intrones (47 intrones) (Targovnik et al., 2001).

La expresión del gen *TG* está regulada por tres factores de transcripción específicos del tiroides: *TTF-1*, *TTF-2* y *Pax 8*. El factor *TTF-1* tiene el papel regulador más importante en la transcripción de *TG*. Este proceso está mediado, fundamentalmente, por *TTF-2/FOXE1* vía TSH/cAMP. Además, *IGF-1* actúa con la TSH induciendo la expresión de este gen (Santisteban, 2006). La tiroglobulina es una glicoproteína de alto peso molecular, 660 kDa, conformada por 5496 aminoácidos y estructurada en dos subunidades idénticas de 300 kDa con un 10 % de azúcares (manosa, N acetil glucosamina, galactosa, fructuosa, condroitín sulfato y ácido siálico) y 1% de yodo. La tiroglobulina pertenece a una superfamilia de serina hidrolasas. Gran parte de la proteína está organizada en 19 repeticiones agrupadas en 3 dominios diferentes, repeticiones de tipo 1, tipo 2 y tipo 3. El extremo amino terminal contiene repeticiones ricas en cisteína (tipo 1). Los elementos de tipo 1 regularían la degradación de la TG madura por una selectiva y reversible inhibición de las proteasas lisosomales (Targovnik et al., 2001). La región carboxilo terminal no presenta zonas de homología interna y tiene características constitutivas diferentes a la región amino terminal, lo que sugiere distintos orígenes evolutivos de las dos regiones. Este extremo, sin embargo, tiene similitud con la acetilcolinesterasa y contiene repeticiones tipo 3 (Park y Arvan, 2004). La organización proteica repetitiva de la TG es un ejemplo de evolución génica por eventos de duplicación intragénica y de fusión.

La integridad de la estructura de *TG* es esencial para la síntesis de las hormonas tiroideas y, por ello, variaciones en el gen *TG* contribuyen a la patología de la glándula tiroidea. La primera mutación identificada en el gen *TG* fue la delección del exón 4 debida a una transversión de citosina a guanina. Otros estudios indican que las sustituciones de cisteínas C1245R y C1977S en los exones 17 y 33, respectivamente, causan defectos en el transporte intracelular de *TG* (Targovnik et al., 2001). Por otra parte, estudios recientes han proporcionado evidencias de que diversos polimorfismos del gen *TG* están asociados con susceptibilidad a enfermedades autoinmunes del tiroides (Sakai et al., 2001; Ban et al., 2004). SNPs en este gen se han asociado con

tiroiditis autoinmune, tanto en ratones como en humanos (Tomer et al., 2002; Tomer y Greenberg, 2004). SNPs en la región exón 10-12 y otro en el exón 33 muestran una asociación significativa con la tiroiditis autoinmune; por tanto, se considera que *TG* es un buen marcador de susceptibilidad para enfermedades autoinmunes del tiroides (Ban et al., 2004).

El hipotiroidismo también se ha correlacionado con mutaciones de diversa índole en el gen *TG*, tanto deleciones de un pequeño segmento del gen como cambios en un único par de bases (Caron et al., 2003).

La sustitución de G por T en el nucleótido 2610 (His870Gln), es la alteración más frecuente en el gen. Este cambio modifica la conformación tridimensional de la tiroglobulina y su disponibilidad para la hormonogénesis, con lo cual se favorece la aparición de desórdenes tiroideos benignos (Vono-Toniolo et al., 2005).

Son varios los polimorfismos de *TG* que se han asociado con la incidencia de bocio. Además, el bocio presenta con frecuencia una asociación con casos de cáncer tiroideo no medular y se considera un factor de riesgo para el desarrollo de estos tumores, lo cual sustenta la correlación entre la variabilidad genética de *TG* y la enfermedad benigna-cáncer tiroideo (Corral et al., 1993; Matakidou et al., 2004). De igual modo, se ha descrito que variaciones sutiles en la actividad de *TG*, como consecuencia de una variación polimórfica, pueden incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de tiroides no medular (Ieiri et al., 1991; Matakidou et al., 2004). La asociación entre ciertas enfermedades benignas del tiroides y el cáncer de tiroides ha sido observado en múltiples estudios y, aunque la fortaleza de esta asociación varía en los estudios, el análisis conjunto de casi una veintena de ellos demostró que, además de la radiación ionizante en la infancia, los nódulos benignos y el bocio son los factores de riesgo más relevantes para el desarrollo del cáncer de tiroides con una OR de 38,3 y 5,9; respectivamente (Preston-Martin et al., 2003).

### **El gen receptor de la hormona liberadora de tirotropina (*TRHR*)**

El *TRHR* es un receptor acoplado a la proteína G que activa la transducción de la inositol-fosfolipido-calcio proteína quinasa C mediante la unión a la hormona liberadora de tirotropina (TRH). El gen *TRHR* se expresa en las células de la hipófisis anterior.

En 1993 se aisló el cDNA humano del gen *TRHR* (Matre et al., 1993). La secuencia de aminoácidos de la proteína humana TRHR mostró una alta homología con



la rata y ratón, con la excepción la región carboxilo terminal. El gen *TRHR* contiene dos exones (Matre et al., 1993).

El gen *TRHR* humano está ubicado en la región 8q23 y posee 32,9 kb de longitud. Contiene dos exones y codifica para un mRNA de 1,3 kb.

Se conoce que alteraciones del gen *TRHR* producen hipotiroidismo. Así, se ha descrito el hipotiroidismo caracterizado por la ausencia de TSH con una deleción de 9 pb en el gen *TRHR*, conduciendo a la eliminación de los aminoácidos Ser115, Ile116 y Thr117 (Collu et al., 1997). En otros casos, el hipotiroidismo es causado por la transición homocigota (Arg17Ter) (Bonomi et al., 2009).

Recientemente, un estudio de asociación integral del genoma mostró una asociación de los SNPs rs16892496 y rs7832552, que se encuentran en el gen *TRHR*, con la massa corporal (*Lean Body Mass*) (Liu et al., 2009).





## **Objetivos**



## **2 OBJETIVOS**

---

El cáncer de tiroides es la patología oncológica más común en el estudio de la morbilidad endocrina. Se ha demostrado que la exposición a la radiación ionizante es un factor ambiental de riesgo al cáncer de tiroides. Asimismo, en la etiología de la enfermedad juegan un papel importante los factores genéticos.

En este contexto, el objetivo principal de este trabajo es estudiar la susceptibilidad genética al cáncer de tiroides asociada a las regiones cromosómicas 1p12 y 8q, siguiendo un diseño epidemiológico caso-control. Para ello, nos propusimos los siguientes objetivos:

- Estudiar de asociación de diversas variantes genéticas de la región 1p12 con el cáncer de tiroides, analizando específicamente el papel del gen *WDR3*.
- Análisis de la expresión y la metilación del gen *WDR3*, en líneas celulares provenientes de cáncer de tiroides en comparación con líneas de tiroides normales.
- Estudiar de la asociación de la región 8q con el cáncer de tiroides, analizando los SNPs rs1447295, rs6983267 y el papel de los genes *TRHR* y *TG*.





## **Materiales Y Métodos**





### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

---

#### **3.1 MUESTRAS DE PACIENTES Y CONTROLES**

En el presente trabajo se utilizaron 402 pacientes con diagnóstico de cáncer de tiroides y 479 individuos controles sin diagnóstico de patología tiroidea. Los pacientes con cáncer de tiroides se reclutaron en colaboración con el hospital Vall d'Hebron (Barcelona) y el hospital Josep Trueta (Girona), mientras que los individuos controles se escogieron dentro del área de Barcelona teniendo en cuenta que el grupo fuera lo más similar posible a los pacientes, en cuanto al sexo y la edad. El DNA genómico usado en el estudio se obtuvo fundamentalmente, a partir de linfocitos de sangre, aunque en algunos controles se obtuvo a partir de la saliva.

Al mismo tiempo que se colectaban las muestras de los participantes en el estudio (pacientes y controles), se realizó un cuestionario con el fin de caracterizar algunos hábitos, antecedentes médicos, antecedentes médico-familiares, exposiciones peligrosas y aspectos demográficos (edad y sexo). Además, a partir de las historias clínicas del grupo de pacientes con diagnóstico de cáncer de tiroides se obtuvo información clínico-patológica y el diagnóstico histopatológico. Todos los donantes dieron su consentimiento informado del estudio, que fue aprobado tanto por el Comité de Ética del hospital Vall d'Hebron, como por el del hospital Josep Trueta.

#### **3.2 LÍNEAS CELULARES**

Se utilizaron 10 líneas celulares tumorales en cultivo, 9 de las cuales correspondían a diferentes tipos de tumores tiroideos y HeLa como referencia tumoral no tiroidea.

Además, se estudió una línea no tumoral de tejido tiroideo como control de células no transformadas. Las líneas celulares fueron las siguientes:

Línea de tiroides no transformada: S11N

Línea tumoral no tiroidea: HeLa

Líneas de cáncer de tiroides:

Tipo papilar: TPC-1 y B-CPAP

Tipo folicular: ML-1, WRO y CGTH-W-1

Tipo anaplásico: FRO, 8305C, 8505C y CAL-62

Las características de las líneas celulares se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Características de las líneas celulares tumorales utilizadas en el estudio. Tabla extraída y combinada de Meireless et al., 2007; Schweppe et al., 2008; Pilli et al., 2009.

Línea celular	Tipo de cáncer	Género	Edad	Mutaciones genéticas	Referencia <sup>a</sup>
HeLa	UC	F	31	----	Gey et al., 1952
TPC-1	PTC	F	----	RET/PTC1 y HRAS	Tanaka et al., 1987
B-CPAP	PTC	F	76	BRAF (V600E) y TP53	Fabien et al., 1994
ML-1	FTC	F	50	----	Schönberger et al., 2000
WRO	FTC	F	----	BRAF(V600E) y TP53	Estour et al., 1989
CGTH-W-1	FTC	F	70	----	Lin et al., 1995
FRO	ATC	----	----	BRAF	Nishihara et al., 1997
8305C	ATC	F	67	----	Ito et al., 1992
8505C	ATC	F	78	BRAF, RAS y TP53	Ito et al., 1992
CAL-62	ATC	F	70	----	Gioanni et al., 1991

<sup>a</sup>Primera referencia; UC: cáncer de cuello de útero. PTC: cáncer de tiroides tipo papilar. FTC: cáncer de tiroides tipo folicular. ATC: cáncer de tiroides tipo anaplásico. F: femenino.

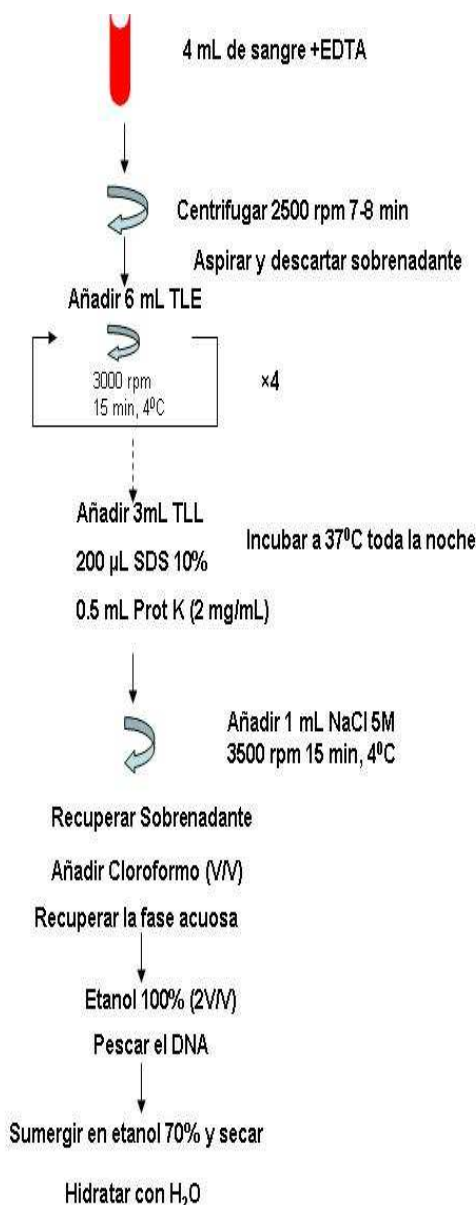
La línea celular S11N fue suministrada por el Dr. Ludwig Hieber (*German Research Center for Environmental Health*, Neuherberg, Alemania). TPC-1 y CAL-62 fueron provistas por los Dres. R Melillo y M Santoro de la *Università Degli Studi Di Napoli* (Nápoles, Italia). Las líneas celulares FRO y WRO fueron provistas por el Dr. R Ciampi de la *Università Di Pisa* (Pisa, Italia). ML-1, B-CPAP, CGTH-W-1, 8305C y 8505C fueron adquiridas de DSMZ (Braunschweig, Alemania).

Las líneas TPC-1, ML-1, CAL-62 y HeLa fueron crecidas y mantenidas en medio de cultivo DMEM (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (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). Finalmente, las líneas S11N, B-CPAP, CGTH-W-1, 8305C y 8505C, en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 20% de suero fetal bovino (Gibco®) y 2,5 µg/mL de Plasmocin™ (InvivoGen). Las células fueron colocadas en frascos de cultivo e incubadas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

#### 3.3.1 EXTRACCIÓN DE DNA

El método estándar de cloroformo-etanol (figura 7) se utilizó para la extracción de DNA a partir de 4 mL de sangre periférica o a partir de 10 a 15 millones de células de las líneas celulares utilizadas en el estudio. El método se divide en tres fases: el aislamiento de los linfocitos o las células, la digestión proteica y la precipitación del DNA.



**Figura 7.** Pasos seguidos en la extracción de DNA con el método estándar cloroformo-etanol. TLE: Tampón de lisis de eritrocitos. TLL: Tampón de lisis de leucocitos.

El *kit Orage DNA Self-Collection kit* (DNA Genotek, Canada) se utilizó para la extracción del DNA genómico a partir de saliva.

El DNA se resuspendió en 50-80  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , se cuantificó en el espectrofotómetro *NanoDrop* y se guardó a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3.3.2 EXTRACCIÓN DE RNA

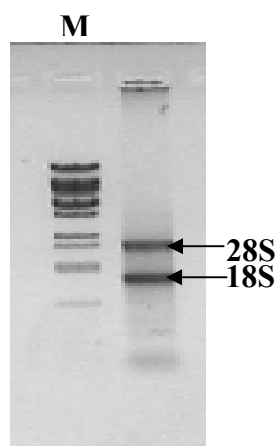
Se utilizó el kit *LeuKoLoCK<sup>TM</sup> Total RNA Isolation System* (Invitrogen) para la extracción de RNA a partir de 9 a 10 mL de sangre periférica, el RNA extraído se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de la solución de elución.

Se analizó la concentración y la calidad del RNA espectrofotométricamente. Para ello, se midió la absorbancia a 260 y 280 nm añadiendo 1  $\mu\text{L}$  de muestra en 49  $\mu\text{L}$  de TE (Tris 10 mM/EDTA 0,2 mM, pH= 7,5). La concentración se calculó de la siguiente forma:

$$\mu\text{g}/\mu\text{L RNA} = A_{260} \times 40 \times \text{factor de dilución (en este caso = 50)}$$

En las distintas muestras se obtuvieron concentraciones entre 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con una media de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

La calidad del RNA se analizó mediante la proporción  $A_{260}/A_{280}$ . Nuestras muestras analizadas mostraron ratios aceptables de 1,7 a 1,9. Además, se analizó la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa, observando las bandas correspondientes a los rRNA 18S y 28S al teñir con *Syber Green* (figura 8).



**Figura 8.** Ejemplo de la visualización de la integridad del RNA en gel de agarosa teñido con *Syber Green*. Se observan las bandas correspondientes a los rRNA 18S y 28S. M: marcador  $\lambda$  digerido con *BstEIII*.

El *TRIZOL<sup>®</sup> Reagent* (Invitrogen) se utilizó para la extracción de RNA a partir de las líneas celulares utilizadas en el estudio. El RNA fue tratado con DNAsa I (Ambion), cuantificado en el espectrofotómetro *NanoDrop*, resuspendido en 80  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y conservado a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La extracción de proteínas se realizó a partir de los cultivos de líneas celulares. A cada *pellet* celular obtenido por centrifugación se le agregaron 200  $\mu$ L de solución de lisis RIPA 1 X (Millipore) y la endonucleasa *Benzonase*<sup>®</sup> (Novagen) (1:500) para degradar todas las formas de DNA y RNA, el cóctel inhibidor de proteasas *Complete Mini, EDTA-free* (Roche) y el cóctel inhibidor de fosfatasas *phosSTOP* (Roche). La cuantificación de proteínas fue realizada por el método Bradford (Bradford, 1976), utilizando 99  $\mu$ L del reactivo de Bradford a los tubos estándar y muestras problema. Se realiza la curva estándar a partir de los tubos estándar y a partir de esta curva se calcularon las concentraciones de las muestras problema. Este método se basa en la unión del Comassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante, en solución ácida, presenta dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15  $\mu$ g), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación.

### 3.5 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *WDR3*

Se amplificó por PCR una secuencia de 1,9 kb del extremo 5' de gen *WDR3* (-387 hasta +1576) utilizando los cebadores indicados en la tabla 10. A la reacción de PCR se añadió DMSO para evitar la formación de estructuras secundarias, debido a la concentración elevada de CG en esta región. La amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización de 40 seg a 94 °C, 30 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 65 °C y 1 min a 72 °C; y un paso final de 5 min a 72 °C. Las reacciones, con un volumen final de 25  $\mu$ L, se prepararon añadiendo: 100 ng de DNA, tampón de PCR 1 X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada cebador, 0,1 mM de cada nucleótido, 10% de DMSO y 1 unidad de *Taq* polimerasa. Finalmente el producto de PCR se visualizó en geles de agarosa al 1% mediante *Syber green*.

La secuencia amplificada se analizó posteriormente por secuenciación.

**Tabla 10.** Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar la región promotora del gen *WDR3*.

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Producto de PCR (pb)</b>
PR1	F 5'-ACCTTGTTCAAGAAGCGCCG-3'	1963
PR4	R 5'-GCCTCAGCCAGAATCTGCAA-3'	

### 3.6 SÍNTESIS DE CDNA DEL GEN *WDR3* POR RT-PCR

La reacción de RT-PCR se utilizó para amplificar el mRNA del gen *WDR3* con doble finalidad: a) amplificación de la secuencia completa del mRNA para posterior secuenciación y b) análisis de la expresión del gen *WDR3*.

Mediante el *kit Super Script™ One-step RT-PCR For Long Templates* (Invitrogen), se amplificó un fragmento de 3,1 kb a partir del mRNA del gen *WDR3*, utilizando los cebadores indicados en la tabla 11 y las siguientes condiciones de amplificación: un paso inicial de síntesis de cDNA de 30 min a 45 °C, desnaturalización durante 2 min a 94 °C, 35 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 48 °C y 4 min a 68 °C; y un paso final de 10 min a 72 °C.

El producto de la reacción RT-PCR se analizó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% teñido con *Syber Green*.

**Tabla 11.** Secuencia de los cebadores utilizados para la reacción de RT-PCR del gen *WDR3*.

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Producto de PCR (pb)</b>
RT1	F 5'-TGGTATCAGACATCACAACA-3'	3100
RT2	R 5'-TCCCTGCTAGAATATAAAGG-3'	

Para el análisis de la expresión de *WDR3* se utilizó el *kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Los cebadores fueron diseñados en diferentes exones para evitar amplificaciones de DNA. Se analizaron dos regiones del mRNA del gen *WDR3* en sendas reacciones: la región 1, correspondiente a los exones 3 y 4; y la región 2, correspondiente a los exones 13 y 15. La secuencia de los cebadores utilizados se muestra en la tabla 12. Las condiciones de la transcripción inversa seguida de la amplificación por PCR son las siguientes: un paso inicial de síntesis de cDNA de 30 min a 45 °C, desnaturalización de 2 min a 94 °C, 40

**Tabla 12.** Secuencia de los cebadores utilizados para la reacción de RT-PCR para el análisis de la expresión del gen *WDR3*.

Gen	Cebador	Secuencia	Producto de PCR (pb)
<i>WDR3</i>			
1	W1-F	F 5'- TCGATCCGAATCTTCAGTCT-3'	209
	W1-R	R 5'- AACAAATGCTTGTGTGATGGC -3'	
2	W2-F	F 5'- TGACACACAGAACATCTTCA -3'	210
	W2-R	R 5'- AATCTGCTGGAGACAATAGA -3'	
$\beta$ -actina			
1	$\beta$ -actin 1	F 5'- CCAGAGCAAGAGAGGCATCC -3'	298
	$\beta$ -actin 2	R 5'- AATCTGCTGGAGACAATAGA -3'	

ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C y 1 min a 68 °C; y un paso final de 5 min a 68 °C. En todas las reacciones se incluye un control interno que consiste en la amplificación de mRNA de  $\beta$ -actina utilizando los cebadores que se muestran en la tabla 12.

El producto de la reacción RT-PCR se analizó electroforéticamente en un gel de agarosa al 2,5% teñido con *Syber Green*.

### 3.7 SECUENCIACIÓN DEL DNA

La secuencia de fragmentos de DNA obtenidos por PCR o por RT-PCR se realizó en el Servicio de Secuenciación de MacroGen (MacroGen Inc, Corea).

Cada fragmento se secuenció por duplicado utilizando un cebador directo y otro inverso. Los cebadores utilizados para la secuenciación en este trabajo se indican en la tabla 13. El fragmento de 1,9 kb del promotor del gen *WDR3* se secuenció a partir de dos fragmentos solapados, mientras que para secuenciar la región codificadora se utilizaron siete fragmentos solapados.

**Tabla 13.** Cebadores utilizados para la secuenciación de la región promotora y la región codificadora del gen *WDR3*.

<b>Fragmento</b>	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>
Promotor		
1	PR1	F 5'-ACCTTGTTCAAGAAGCGCCG-3'
	PR2	R 5'-CTCTTGAAGAACGAGCCTGG-3'
2	PR3	F 5'-ACTTCTCGTAGAGACGGCGT-3'
	PR4	R 5'-GCCTCAGCCAGAATCTGCAA-3'
Codificante		
1	RT1	F 5'-TGGTATCAGACATCACAACA-3'
	RT5	R 5'-TTAGACGGTACAGACCACTT-3'
2	RT6	F 5'-TACCTTGAAGTATGATCAGC-3'
	RT7	R 5'-TAGCACAGAGTCAGTTCCAT-3'
3	RT8	F 5'-GGAAGGAAGAGACAGAGTTG-3'
	RT9	R 5'-GAACAGCAATATTGTCTGAG-3'
4	RT10	F 5'-TGACTTGATTCATTCACCTC-3'
	RT11	R 5'-TGACACACAGAACATCTTCA-3'
5	RT12	F 5'-AATCTGCTGGAGACAATAGA-3'
	RT13	R 5'-CCTCATATTCTGCTTCTCTT-3'
6	RT14	F 5'-ACTATGTTGTATCATCGTCC-3'
	RT15	R 5'-TTGATTGCTAGTGATCTGTC-3'
7	RT16	F 5'-TAACGAATTCATTCAGCTGG-3'
	RT2	R 5'-TCCCTGCTAGAATATAAAGG-3'

### 3.8 WESTERN BLOT

Un total de 30 µg de proteína de cada línea celular fue desnaturalizada en presencia de β-mercaptoetanol durante 5 min a 95 °C. 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.

Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario (1:2000) durante toda la noche a 4 °C, se utilizó el anticuerpo monoclonal de conejo anti-WDR3 (Bethyl Laboratories, Inc). Como control se utilizó un anticuerpo primario (1:5000) contra vinculina (Abcam) para verificar la cantidad de proteína cargada y transferida.



La detección se realizó con inmunoglobulinas anti-conejo 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 GeneGenome© 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 se pueden comparar los valores de intensidad de las bandas obtenidas.

### 3.9 ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL DNA

El grado de la metilación en la región promotora del gen *WDR3* se analizó mediante la secuenciación del DNA modificado con bisulfito sódico. El DNA extraído de cada línea celular se modificó con bisulfito sódico para diferenciar las citosinas metiladas de las no metiladas, utilizando el *kit MethylDetector™ Bisulfite Modification Kit* (Active Motif).

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. La posterior amplificación por PCR hace que el uracilo pase a timina, mientras que la citosina queda intacta (figura 9).



**Figura 9.** Conversión de la citosina no metilada a uracilo.

Para verificar el éxito de la modificación del DNA con bisulfito se realizó una amplificación por PCR utilizando los cebadores de control positivo específicos de DNA modificado provistos por el *kit* comercial antes mencionado.

Seguidamente se amplificó por PCR la región promotora del gen *WDR3* que contiene una alta frecuencia de sitios CpG. Para ello se diseñaron cebadores que se unen específicamente a secuencias modificadas por bisulfito, independientemente de su estado de metilación, utilizando el programa Methprimer (Li y Dahiya, 2002). Se amplificaron

dos regiones: la región 1 que abarca 34 sitios CpG y la región 2 que abarca 32 sitios CpG. La secuencia de los cebadores utilizados se muestra en la tabla 14.

**Tabla 14.** Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de la secuencia promotora del gen *WDR3* después de su modificación con bisulfito.

Región	Sitios CpG	Secuencia	Producto de PCR (pb)
1	34	F 5'- GGGAAAGAATTTAATTAATAT-3' R 5'- AATTCCCTTTACCTTCTAAAAA-3'	423
2	32	F 5'- TTAGAAGGTAAAGGGAATTT-3' R 5'- ATATTTCCAAAATACTACTAAA -3'	482

Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: un paso inicial desnaturalización de 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 35 seg a 95 °C, 30 seg a 52 °C y 1 min a 72 °C; y un paso final de 10 min a 72 °C. Las reacciones, con un volumen final de 25 µL, se prepararon añadiendo: 100 ng de DNA modificado con bisulfito sódico, tampón de PCR 1 X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada cebador, 0,1 mM de cada nucleótido y 1 unidad de *Taq* polimerasa. Finalmente el producto de PCR se visualizó en geles de agarosa al 2% mediante *Syber green*.

Los productos de la amplificación se purificaron utilizando el *kit* comercial *Nucleospin* (Machery-Nagel) y fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación de Macrogen (Macrogen Inc, Corea).

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 aparecerán como timina y las 5-metilcitosinas como citosinas.

### 3.10 GENOTIPADO

En una primera fase del estudio de genotipado se incluyeron 275 individuos, de los cuales 157 eran pacientes con diagnóstico de cáncer de tiroides y 118 individuos controles sin diagnóstico de patología tiroidea. En una segunda fase del estudio se aumentó el tamaño de la muestra inicial a 881 individuos 402 pacientes con diagnóstico de cáncer de tiroides y 479 individuos controles sin diagnóstico de patología tiroidea.

### 3.10.1 SELECCIÓN DE SNPs

El genotipado de los individuos se realizó para el gen *WDR3* (región 1p12) y para la región 8q.

El genotipado del gen *WDR3* se realizó en dos fases. Primeramente se genotiparon 10 SNPs que abarcan el gen *WDR3* y sus regiones 5' y 3'. Esto se llevó a cabo en el primer grupo de 275 individuos (118 controles y 157 pacientes). Los SNP 1-10 fueron: rs4233455, rs2208375, rs3754127, rs1321665, rs6680844, rs3765501, rs1321666, rs4658973, rs6685906 y rs6678671, respectivamente. La selección de estos SNPs se basó en la información disponible en las bases de datos, teniendo en cuenta una frecuencia del alelo menos frecuente superior a 0,2. Todos estos marcadores se encuentran en el mismo bloque de ligamiento de acuerdo con la información de HapMap (HapMap CEU) y el software Haploview (Barrett et al, 2005), y se distribuyen a lo largo del gen con un densidad de un SNP por 4-5 kb. Posteriormente, el genotipado del gen *WDR3* se realizó en una población mayor de 881 individuos (479 controles y 402 pacientes) analizando tres de los diez SNPs seleccionados inicialmente, rs3754127, rs3765501 y rs4658973 (SNPs 3, 6 y 8, respectivamente).

En la segunda fase del estudio de genotipado también se genotipó la región 8q utilizando siete SNPs que abarcan los genes del metabolismo del tiroides, *TRHR* y *TG* y otros dos polimorfismos de susceptibilidad al cáncer. Así, los SNPs rs4129682 y rs7823804 se encuentran en el gen *TRHR*; los SNPs rs180223 (exón 10, Ser734Ala), rs853326 (exón 12, Met1028Val) y rs2076740 (exón 33, Arg1999Trp) son variantes genéticas comunes del gen *TG* y fueron relacionados anteriormente con la enfermedad autoinmune del tiroides (AITD) (Ban et al., 2003). Por último, los SNPs rs1447295 y rs6983267 fueron anteriormente analizados en varios estudios de asociación con el riesgo a diferentes tipos de cánceres, dando resultados positivos.

### 3.10.2 MÉTODO DE GENOTIPADO

La identificación de los polimorfismos seleccionados para los genes en estudio se realizó en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen), utilizando el ensayo iPLEX con una extensión de base única y nucleótidos de masa modificada. El protocolo seguido para el genotipado consta de 5 fases. Una primera amplificación por PCR de aproximadamente 100 pb seguida por un tratamiento con fosfatasa alcalina para desfosforilar los nucleótidos no incorporados y evitar interferencia en la lectura de los datos. A continuación se utilizan cebadores específicos, donde la siguiente base, que es la

primera en la fase de extensión, corresponde a la base polimórfica en estudio. Seguidamente el producto de PCR se purifica con resina para eliminar los cebadores y los dinucleótidos no utilizados y finalmente se utiliza el nanodispensador para colocar el producto de la reacción de extensión en un Spectro-CHIP Bioarray (SEQUENOM 00601) para la lectura y la interpretación del espectro de masas múltiples obtenido, que se basa en los cebadores de diferente longitud y los nucleótidos de masa modificada utilizados en la reacción de amplificación.

### 3.10.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó la descriptiva de la población estudiada (media + desviación típica y frecuencia) para las variables continuas (edad) y categóricas (sexo) que son factores potenciales de confusión en este estudio (edad y sexo). La distribución de la variable continua se analizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Dado que nuestra población no sigue una distribución normal, se utilizó el test Mann-Whitney para el análisis. El test de independencia  $\chi^2$  se utilizó para comparar las variables categóricas. Todos los análisis de los datos se ejecutaron con el paquete estadístico SPSS para Windows (Versión 17; SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Las frecuencias alélicas entre casos y controles para cada locus, se compararon por análisis de  $\chi^2$  cuando en la población la distribución de los alelos era independiente (equilibrio Hardy-Weinberg en la población de controles). En el caso de no cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg en la población control, se utilizó el test de tendencia de Armitage para comparar las frecuencias alélicas. El equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó usando las frecuencias genotípicas observadas y las frecuencias genotípicas esperadas (calculadas a partir de las frecuencias alélicas) y un test de  $\chi^2$  con un grado de libertad.

El grado de asociación de un polimorfismo con el riesgo de desarrollar el cáncer de tiroides se analizó a partir de las frecuencias genotípicas mediante el cálculo de las *odds ratio* (OR), con ajuste al sexo y la edad (con un intervalo de confianza del 95%). Este análisis se llevó cabo por regresión logística. El programa Haploview (Barrett et al., 2005) se utilizó para examinar el desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos estudiados. La frecuencia de los haplotipos se estimó mediante el algoritmo esperanza-maximización y la asociación de los haplotipos con la susceptibilidad a desarrollar el cáncer de tiroides se estimó mediante regresión logística. Los estudios de interacción se llevaron a cabo mediante regresión logística tomando como referencia el genotipo

formado por el doble homocigoto de los alelos más frecuentes. Todos los estudios de asociación se hicieron con el programa SNPStats (Solé et al., 2006). La asociación de las características clínicopatológicas y los genotipos se llevó cabo mediante el test  $\chi^2$ .





## **Resultados**





## 4 RESULTADOS

### 4.1 POBLACIÓN ESTUDIADA EN LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN CASO-CONTROL

El estudio de asociación caso-control se inició con una población española de 157 casos y 118 controles. Posteriormente, este estudio se amplió incrementando el tamaño de muestra inicial y así obtener un poder estadístico mayor en el estudio. Para ello, la muestra inicial fue aumentada a 402 casos y 479 controles de una población española.

En la tabla 15 se resumen la características de la población estudiada correspondiente a la muestra ampliada.

**Tabla 15.** Características de la población estudiada.

		Controles N (%) N=479	Pacientes N (%) N=402	<i>P</i> <sup>a</sup>
Sexo				
	Mujeres	283 (59,1)	312 (77,6)	< 0,0001
	Hombres	196 (40,9)	90 (22,4)	
Edad media				
	Media ± DS	45,9 ± 17,2	47,1 ± 15,5	0,09
Diagnostico				
	Papilar	---	339 (84,3)	
	Folicular	---	59 (14,7)	
	Otros	---	4 (1,0)	

<sup>a</sup> El valor de *P* se corresponde con el test de  $\chi^2$  para la variable sexo y el test de Mann-Whitney para la variable edad

La edad media de 45,99 y 47,06 en el grupo de controles y pacientes respectivamente, no difiere significativamente (*P*= 0,09). Sin embargo, cuando se comparan los grupos en relación con el género, se observa que en la población control las mujeres representan aproximadamente el 59% de la muestra, mientras que en el grupo de pacientes la frecuencia es del 77%, siendo esta diferencia significativa (*P*< 0,0001). Esto se corresponde con lo que está descrito en la literatura sobre el predominio del cáncer de tiroides en mujeres (Blanco et al., 2005). Las variables sexo y edad se incluyeron en el ajuste del modelo de regresión logística utilizado para la estima de la asociación genotípica con el cáncer de tiroides.

## **4.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LA REGIÓN 1p12 CON EL CÁNCER DE TIROIDES**

Nuestros trabajos previos de análisis de la asociación del microsatélite BAT-40 (A)<sub>n</sub> sugieren la asociación de la región 1p12 con la susceptibilidad al cáncer de tiroides (Baida *et al.*, 2005). Recientemente hemos relacionado la región de susceptibilidad en 1p12 con dos polimorfismos (rs4658973 y rs2145418) (Baida *et al.*, 2008). En este estudio se analizaron seis polimorfismos que comprenden 2,4 Mb en la región 1p12. Cuatro de los seis polimorfismos analizados no mostraron asociación con el cáncer tiroides. Sin embargo, los dos polimorfismos restantes, rs2145418 y rs4658973, sí que presentaron una asociación estadísticamente significativa. En ambos casos se encontró diferencias significativas en las frecuencias génicas y en la distribución de genotipos entre pacientes y controles. La distancia entre ambos marcadores es de 377 kb. El SNP rs4658973 se encuentra en el intrón 25 del gen *WDR3*, mientras que el polimorfismo rs2145418 reside en una región vacía de genes.

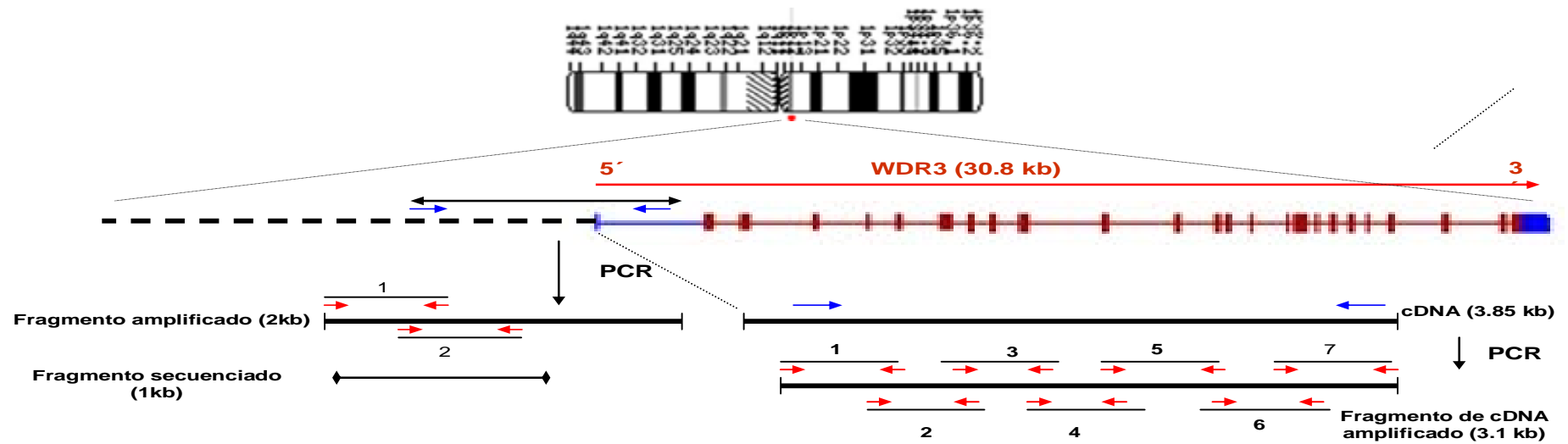
### **4.2.1 IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS POLIMORFISMOS EN EL GEN *WDR3***

Basado en los estudios previos sobre la región 1p12 se propuso estudiar la variabilidad del gen *WDR3*, ya que al comienzo del trabajo existía poca información existente en las bases de datos sobre polimorfismos en el gen *WDR3*. Así, se realizó un análisis previo para identificar polimorfismos en el gen *WDR3* y, posteriormente, estudiar la posible implicación de este gen en la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Para ello se secuenció la región codificadora y la región promotora del gen *WDR3*, utilizando muestras de RNA y DNA, respectivamente, de 20 individuos sanos de la población española. Este número de individuos nos garantiza identificar polimorfismos que presentan una frecuencia del alelo menos frecuente superior al 10%.

En la figura 10 se señala la estrategia de amplificación por PCR del cDNA y del DNA genómico del gen *WDR3*. También se indican los fragmentos secuenciados a partir de los segmentos amplificados, la región promotora y la región codificadora del gen *WDR3*.

#### **4.2.1.1 Secuenciación de la región codificadora del gen *WDR3***

El gen *WDR3* tiene un tamaño de 30,8 kb con 27 exones que codifica para un mRNA de 3,85 kb. Así, a partir del cDNA amplificado por RT-PCR se



**Figura 10.** Posición del gen *WDR3* en el cromosoma 1 y estrategia seguida en la secuenciación de la región promotora y codificadora del gen *WDR3*. Se muestran los cebadores de amplificación por PCR a partir de cDNA y DNA genómico con flechas azules y los cebadores de secuenciación con flechas rojas.



La comparación de la secuencia promotora de los 20 individuos analizados nos reveló un polimorfismo A/G no identificado anteriormente. Este polimorfismo corresponde al nucleótido -118 del promotor (posición 118184467 según la anotación de HapMap). A partir de nuestro análisis estimamos la frecuencia de alelo variante (G) de 0,075 (se encontraron 3 heterocigotos en 20 individuos analizados). La baja frecuencia de este polimorfismo no permitió utilizarlo en nuestro posterior estudio de asociación.

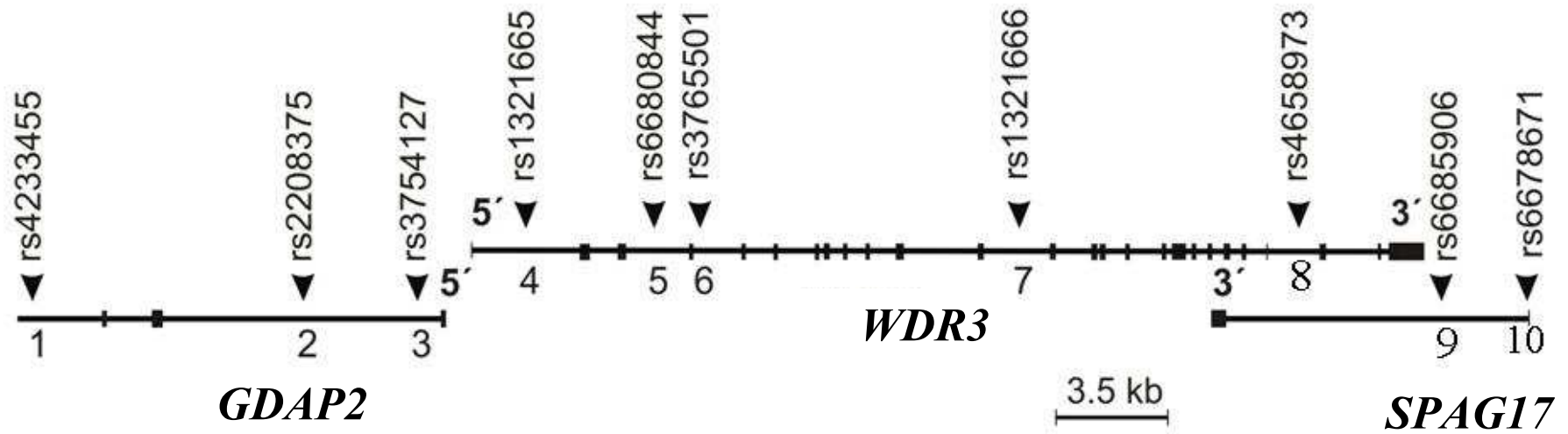
Durante la realización de este trabajo inicial incrementó considerablemente el número de polimorfismos descritos en las bases de datos. Así, en el estudio posterior de asociación del gen *WDR3* con la susceptibilidad al cáncer de tiroides, se seleccionaron una serie de SNPs recientemente descritos en las bases de datos.

### **4.2.2 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN *WDR3* CON EL CÁNCER DE TIROIDES**

Para estudiar la implicación del gen *WDR3* en la susceptibilidad al cáncer de tiroides hemos realizado un estudio de asociación caso-control en dos etapas. En la primera etapa, se genotiparon diez SNPs que abarcan el gen *WDR3* y sus región adyacente 5' y 3'. La población española estudiada consistió en 157 casos con una edad media de  $44,44 \pm 14,52$ , de los cuales 118 eran mujeres (75,1%) y 39 eran hombres (24,9%). Los controles fueron 118 individuos de una edad media de  $39,7 \pm 13,44$ , siendo 78 mujeres (66,1%) y 40 hombres (33,9%). En la segunda etapa del estudio, se seleccionaron 3 SNPs de los 10 SNPs genotipados inicialmente y se incrementó la muestra inicial a 402 casos y 479 controles. Las características de la población total se describen en el apartado 4.1 de esta sección de Resultados (tabla 15).

#### *4.2.2.1 Primer estudio de asociación del gen *WDR3**

El gen *WDR3* solapa en su extremo 5' con el extremo 5' del gen *GDAP2* y en su extremo 3' con el extremo 3' del gen *SPAG17* (ver la figura 12). Para delimitar la región de susceptibilidad se seleccionaron diez SNPs que comprenden una región de aproximadamente 50 kb y que se encuentran en el gen *WDR3*, y los regiones solapantes en 5' y 3' con los genes *GDAP2* y *SPAG17*, respectivamente. Todos los polimorfismos estudiados están en intrones ya que la frecuencia de los pocos polimorfismos descritos en exones es muy baja. La posición relativa de estos polimorfismos en la región



**Figura 12.** Posición relativa de los 10 SNPs estudiados de la región del gen *WDR3*. Los números indican el número asignado a cada SNP, de 5' a 3' relativo al gen *WDR3*.

estudiada se muestra en la figura 12. La elección de estos SNPs se basó en la frecuencia del alelo variante ( $>0,4$ ). El grupo de 157 casos y 118 controles genotipado presentó una frecuencia de sexos diferente, 75,1% y 66,1% de mujeres, respectivamente. Por lo tanto, en los controles se analizó la distribución de genotipos en función del sexo, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. En la población control, el análisis de las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas calculadas a partir de las frecuencias alélicas, mostró que todos los polimorfismos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias alélicas en controles fueron similares a las encontradas en las bases de datos, con un rango de 0,43 a 0,47 del alelo menos frecuente. En la tabla 16 se indican las frecuencias alélicas del alelo menos frecuente o variante (MAF) para cada uno de los polimorfismos. También se muestran las frecuencias genotípicas en la población control y de pacientes con cáncer de tiroides y la estima del riesgo mediante los valores de *odds ratio* (OR) ajustadas con el sexo y la edad. Las frecuencias alélicas no muestran diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas de controles y de pacientes en los 10 polimorfismos estudiados. A partir de las frecuencias genotípicas se analizó la posible asociación de cada polimorfismo con la susceptibilidad al cáncer de tiroides, mediante una regresión logística y siguiendo un modelo de herencia codominante. Ninguno de los polimorfismos estudiados mostró asociación con la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Sin embargo, se observa, para todos los SNPs, un aumento de la frecuencia del genotipo homocigoto del alelo variante en el grupo de pacientes respecto al control, aunque las ORs no alcanzan la significación estadística.

El análisis del desequilibrio de ligamiento entre los diferentes SNPs en estudio reveló que todos los SNPs estudiados están en el mismo bloque de ligamiento (figura 13). De la misma forma, la base de datos de HapMap muestra un solo bloque de ligamiento en la región que abarca los SNPs estudiados.

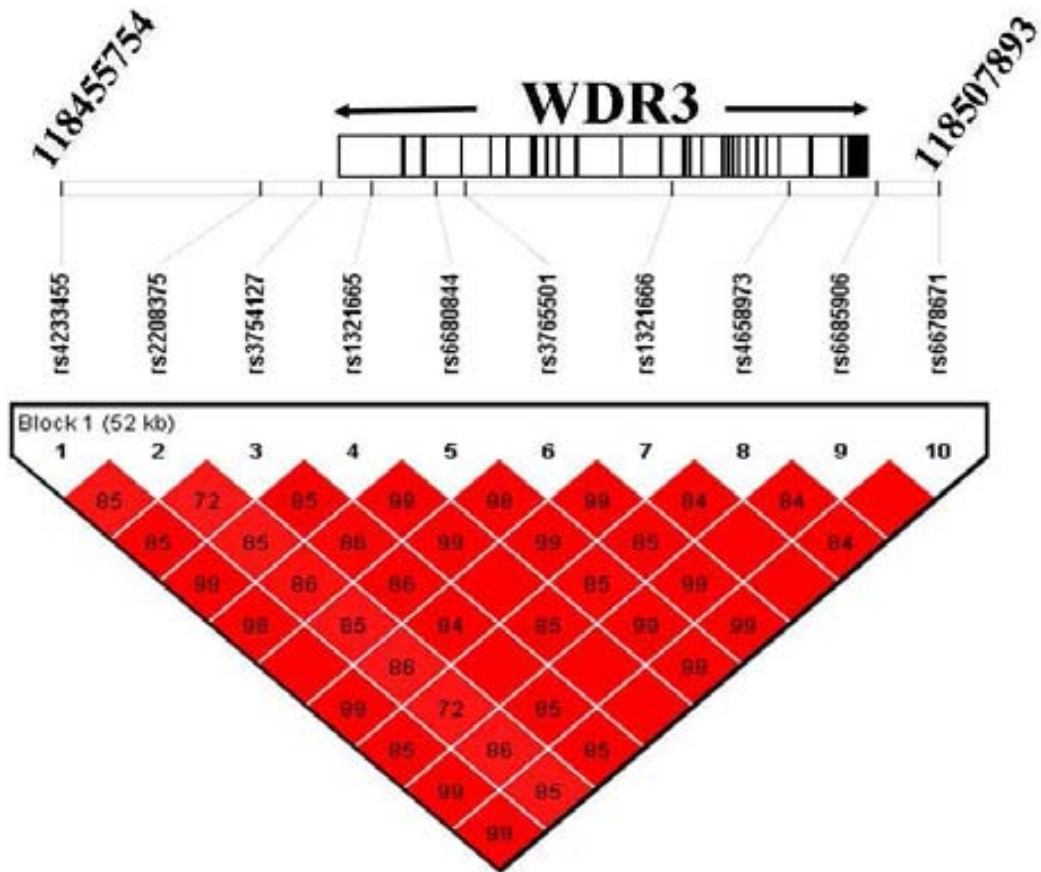
Teniendo en cuenta que todos los SNPs estudiados están en desequilibrio de ligamiento se realizó un análisis de haplotipos combinando los diez SNPs estudiados y se estimó el riesgo asociado a dichos haplotipos. Cuatro de los haplotipos representaron más de 95% de los individuos, el resto de haplotipos con frecuencia menor a 1% se designaron como otros. Los resultados se recogen en la tabla 17. En la estima del riesgo, se formó el haplotipo I como referencia por su mayor frecuencia.

**Tabla 16.** Frecuencias alélicas y genotípicas y odds ratio ajustadas con el sexo y la edad según un modelo de herencia codominante de 10 SNPs en la región del gen *WDR3*.

SNP	MAF		Genotipo	Controles N (%)	Pacientes N (%)	Odds Ratio (IC 95%)	P
	Controles	Pacientes					
	N=118	N=157					
1 rs4233455	0,45	0,50	C/C	33 (29,2)	40 (26,3)	1,00	0,57
			C/T	58 (51,3)	71 (46,7)	1,05 (0,50-2,22)	
			T/T	22 (19,5)	41 (27,0)	1,54 (0,63-3,78)	
2 rs2208375	0,47	0,51	G/G	31 (27,2)	38 (25,0)	1,00	0,70
			G/A	58 (50,9)	72 (47,4)	1,05 (0,49-2,24)	
			A/A	25 (21,9)	42 (27,6)	1,42 (0,58-3,50)	
3 rs3754127	0,44	0,45	C/C	35 (29,7)	48 (32,0)	1,00	0,50
			C/T	63 (53,4)	68 (45,3)	0,78 (0,38-1,61)	
			T/T	20 (16,9)	34 (22,7)	1,29 (0,51-3,26)	
4 rs1321665	0,45	0,5	A/A	33 (28,9)	38 (26,2)	1,00	0,58
			A/C	60 (52,6)	68 (46,9)	1,30 (0,61-2,79)	
			C/C	21 (18,4)	39 (26,9)	1,63 (0,64-4,14)	
5 rs6680844	0,45	0,5	C/C	33 (28,9)	40 (26,9)	1,00	0,33
			C/T	60 (52,6)	68 (45,6)	1,05 (0,50-2,20)	
			T/T	21 (18,4)	41 (27,5)	1,81 (0,74-4,44)	
6 rs3765501	0,46	0,5	G/G	33 (28,4)	41 (26,4)	1,00	0,56
			G/A	60 (51,7)	73 (47,1)	1,10 (0,53-2,31)	
			A/A	23 (19,8)	41 (26,4)	1,59 (0,65-3,89)	
7 rs1321666	0,45	0,5	T/T	33 (28,9)	40 (27,2)	1,00	0,60
			T/C	59 (51,8)	68 (46,3)	1,02 (0,48-2,15)	
			C/C	22 (19,3)	39 (26,5)	1,49 (0,61-3,64)	
8 rs4658973	0,43	0,45	T/T	35 (30,7)	47 (32,4)	1,00	0,58
			T/G	60 (52,6)	65 (44,8)	0,86 (0,41-1,78)	
			G/G	19 (16,7)	33 (22,8)	1,36 (0,53-3,54)	
9 rs6685906	0,45	0,51	T/T	33 (29,2)	40 (26,3)	1,00	0,54
			T/G	58 (51,3)	70 (46,0)	1,08 (0,51-2,29)	
			G/G	22 (19,5)	42 (27,6)	1,59 (0,65-3,89)	
10 rs6678671	0,46	0,51	T/T	33 (28,4)	40 (26,1)	1,00	0,43
			T/C	60 (51,7)	71 (46,4)	1,08 (0,51-2,28)	
			C/C	23 (19,8)	42 (27,4)	1,70 (0,69-4,17)	

MAF: Frecuencia del alelo menos frecuente.





**Figura 13.** Desequilibrio de ligamiento entre los diferentes SNPs estudiados utilizando nuestros datos de genotipado. Se señala los valores de  $r^2$  y la posición relativa de cada SNP.

**Tabla 17.** Distribución de haplotipos en el gen *WDR3* y su asociación con cáncer de tiroides.

Haplotipo	SNPs										Frecuencia de haplotipos		Odds ratio (IC 95%)	P
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Controles N=118	Pacientes N=157		
I	C	G	C	A	C	G	T	T	T	T	0,5203	0,4672	1	---
II	T	A	T	C	T	A	C	G	G	C	0,4231	0,4398	1,18 (0,74 - 1,87)	0,49
III	T	A	C	C	T	A	C	T	G	C	0,0254	0,0464	3,23 (0,90 - 11,61)	0,073
IV	C	A	C	A	C	G	T	T	T	T	0,0178	0,0296	1,48 (0,34 - 6,44)	0,61
Otros											0,0134	0,017	---	---

Se observa que el haplotipo III muestra una frecuencia mayor en pacientes que en controles, con un incremento de riesgo al cáncer de tiroides aunque no alcanza la significación estadística (OR = 3,23, IC 95% = 0,90-11,61,  $P = 0,073$ ). Cabe destacar que el haplotipo III presenta el mismo alelo que el haplotipo I para los SNPs 3 y 8, mientras que contiene el alelo variante para los SNPs 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 y 10 y apuesto a los alelos del haplotipo I en estas posiciones, haplotipo III: T-A-C-C-T-A-C-T-G-C y haplotipo I: C-G-C-A-C-G-T-T-T.

Teniendo en cuenta la información anterior, se seleccionó la combinación de los SNPs 3-6-8 y se analizó de nuevo para ver la asociación de éstos haplotipos con el cáncer de tiroides. Los resultados fueron idénticos a los obtenidos con la combinación de los diez SNPs. A partir de esta observación, se seleccionaron los SNPs 3, 6 y 8 como SNPs marcadores para los análisis de asociación de haplotipos del gen *WDR3* con el cáncer de tiroides.

#### 4.2.2.2 Segundo estudio de asociación del gen *WDR3*

Para confirmar el posible papel de *WDR3* en la incidencia del cáncer de tiroides se aumentó el poder del estudio inicial incrementando el tamaño de la muestra de nuestra población estudiada a 402 casos y 479 controles. En esta nueva población la distribución de sexos era de 77,6% y 59,1% de mujeres en el grupo de pacientes y controles, respectivamente ( $P < 0,0001$ ). Sin embargo, la distribución de genotipos dentro de sexos para el grupo control no mostró diferencias significativas. Por lo tanto, la diferente proporción de sexos entre pacientes y controles no afecta al análisis de asociación. Se genotiparon los polimorfismos: rs3754127, rs3765501 y rs4658973, correspondientes a los SNPs 3, 6 y 8, respectivamente, seleccionados como SNPs marcadores para el análisis de asociación de haplotipos del gen *WDR3* con el cáncer de tiroides (ver apartado 4.2.2.1).

En la tabla 18 se muestran los resultados del estudio de asociación de los tres polimorfismos con la susceptibilidad al cáncer de tiroides y la frecuencia del alelo menos frecuente en casos y controles.

En el grupo control el análisis de las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas calculadas a partir de las frecuencias alélicas mostró que todos los SNPs están en equilibrio de Hardy-Weinberg. Como en el estudio inicial de asociación, al examinar las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas, no se observaron

diferencias estadísticamente significativas entre controles y pacientes, en cada uno de los polimorfismos analizados.

**Tabla 18.** Frecuencias alélicas y genotípicas y odds ratio ajustados con el sexo y la edad según un modelo de herencia codominante.

SNP	MAF		Geno- tipo	Controles N (%)	Pacientes N (%)	Odds Ratio (IC 95%)	P
	Controles N=479	Pacientes N=402					
3 rs3754127	0,43	0,43	C/C	156 (32,8)	131 (33,0)	1	0,87
			C/T	230 (48,3)	190 (47,9)	1,01 (0,72-1,42)	
			T/T	90 (18,9)	76 (19,1)	1,12 (0,72-1,73)	
6 rs3765501	0,45	0,47	G/G	138 (32,2)	112 (31,2)	1	0,15
			G/A	194 (45,3)	154 (42,9)	0,99 (0,68-1,44)	
			A/A	96 (22,4)	93 (25,9)	1,45 (0,94-2,25)	
8 rs4658973	0,42	0,43	T/T	154 (34,0)	131 (33,9)	1	0,74
			T/G	213 (47,0)	180 (46,6)	1,02 (0,72-1,44)	
			G/G	86 (19,0)	75 (19,4)	1,18 (0,76-1,83)	

MAF: Frecuencia del alelo menos frecuente.

En el grupo de controles el análisis de las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas calculadas a partir de las frecuencias alélicas mostró que todos los SNPs están en equilibrio de Hardy-Weinberg. Como en el estudio inicial de asociación, al examinar las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre controles y pacientes, en cada uno de los polimorfismos analizados.

Dado que los polimorfismos estudiados forman parte del mismo bloque de ligamiento como se muestra en la figura 13 y confirmado también en esta segunda fase del análisis, se realizó el estudio de haplotipos de los tres SNPs estudiados. En la tabla 19 se muestra la distribución de haplotipos en controles y pacientes. De acuerdo con nuestros resultados iniciales, se observa que el haplotipo C-A-T (se corresponde con el haplotipo III del primer estudio) muestra una distribución diferente en casos y controles. El riesgo de cáncer de tiroides estimado para este haplotipo casi alcanzó la significación estadística (OR = 1,85, IC 95% = 0,97-3,55, P = 0,063). La estratificación de los datos de haplotipos por tipo de cáncer de tiroides papilar o folicular, reveló una asociación

**Tabla 19.** Análisis de haplotipos de los SNPs 3, 6 y 8, en controles, en el grupo total de pacientes de cáncer de tiroides y en pacientes de cáncer papilar y folicular.

Haplotipo			Frecuencia del haplotipo				PTC			FTC		
SNPs			Controles	Pacientes	Odds ratio		PTC	Odds ratio		FTC	Odds ratio	
3	6	8	N=479	N=402	(IC 95%)	<i>P</i>	N=339	(IC 95%)	<i>P</i>	N=59	(IC 95%)	<i>P</i>
C	G	T	0,5428	0,527	1	---	0,5268	1	---	0,5127	1	---
T	A	G	0,4295	0,4303	1,08 (0,87 - 1,34)	0,49	0,4307	1,09 (0,86 - 1,37)	0,48	0,4407	1,11 (0,69 - 1,78)	0,68
C	A	T	0,0255	0,0401	1,85 (0,97 - 3,55)	0,063	0,0395	2,00 (1,02 - 3,92)	0,044	0,0466	1,44 (0,38 - 5,45)	0,59
Otros			0,0022	0,0026	---	---	0,0030	---	---	0,0000	---	---

PTC. Pacientes con cáncer papilar.

FTC. Pacientes con cáncer folicular.

significativa entre el haplotipo C-A-T y el cáncer papilar (OR = 2,00, IC 95% = 1,05-3,92,  $P = 0,044$ ). Esta asociación seguramente es un reflejo de los datos no estratificados, ya que la falta de asociación de haplotipo C-A-T con el cáncer folicular probablemente es debida al número bajo de pacientes con cáncer folicular (N=59).

A continuación se estudió si existe relación entre los haplotipos de *WDR3* con las características clínicopatológicas en el grupo de pacientes. Las frecuencias de los distintos haplotipos para cada una de las características edad, sexo y tipo de cáncer se comparó mediante test  $\chi^2$  y los resultados se muestran en la tabla 20. No se observaron diferencias en la distribución de haplotipos por género o por tipo de cáncer de tiroides, papilar y folicular. Sin embargo, la distribución de haplotipos fue diferente entre los pacientes con edad de diagnóstico  $\leq 45$  años y  $> 45$  años ( $P = 0,0192$ ).

**Tabla 20.** Relación de haplotipos del gen *WDR3* con las características clínicopatológicas en pacientes de cáncer de tiroides.

	Frecuencia de los haplotipos			<i>P</i>
	CGT	TAG	CAT	
<b>Edad</b>				
>45 (N=205)	0,5779	0,3852	0,0343	
$\leq 45$ (N=194)	0,4783	0,4728	0,0465	0,0192
<b>Sexo</b>				
Hombres (N=90)	0,4872	0,4722	0,0406	
Mujeres (N=312)	0,5384	0,4183	0,0400	0,4654
<b>Tipo de cáncer</b>				
Folicular (N=59)	0,5127	0,4407	0,0466	
Papilar (N=339)	0,5268	0,4307	0,0395	0,9387

#### **4.2.3 ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE *WDR3* CON LA REGIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD MARCADA POR EL SNP *rs2145418***

Como se ha mencionado anteriormente, en un estudio previo de asociación caso-control, se mostró la relación de la región 1p12 con el cáncer de tiroides, donde los SNPs *rs4658973* y *rs2145418* marcan dos regiones de susceptibilidad independientes: el gen *WDR3* y la región donde reside el SNP *rs2145418* vacía de genes. Ambas regiones no muestran desequilibrio de ligamiento, lo que indica que su relación con la susceptibilidad al cáncer de tiroides es independiente. Por lo tanto, se decidió genotipar el SNP *rs2145418* en la segunda fase del estudio de genotipados. En el presente trabajo, después del análisis de la asociación del gen *WDR3* con el cáncer de tiroides, nos preguntamos si podría existir interacción entre el gen *WDR3* y la región

**Tabla 21.** Análisis de la interacción entre los SNPs del gen *WDR3* y los genotipos del marcador rs2145418. Odds ratio ajustadas con el sexo y la edad.

		<b>Controles</b> N=479 N (%)	<b>Pacientes</b> N= 402 N (%)	<b>Odds Ratio</b> <b>(IC 95%)</b>
rs2145418	rs3754127 ( <i>WDR3</i> )			
T/T	C/C	117 (24,4)	89 (22,1)	1,00
	C/T	144 (30,1)	122 (30,3)	1,14 (0,78-1,66)
	T/T	62 (12,9)	41 (10,2)	1,04 (0,63-1,71)
T/G	C/C	38 (7,9)	35 (8,7)	1,27 (0,73-2,19)
	C/T	74 (15,4)	61 (15,1)	1,14 (0,73-1,78)
	T/T	24 (5,0)	32 (7,9)	1,78 (0,97-3,27)
G/G	C/C	1 (0,2)	6 (1,4)	7,34 (0,85-63,32)
	C/T	7 (1,4)	7 (1,7)	1,40 (0,47-4,23)
	T/T	3 (0,6)	3 (0,7)	1,41 (0,27-7,44)
<i>P</i> de Interacción: 0,34				
rs2145418	rs3765501 ( <i>WDR3</i> )			
T/T	G/G	104 (21,7)	75 (18,6)	1,00
	G/A	121 (25,2)	93 (23,1)	1,09 (0,73-1,65)
	A/A	69 (14,4)	53 (13,1)	1,31 (0,80-2,12)
T/G	G/G	33 (6,8)	30 (7,4)	1,37 (0,76-2,47)
	G/A	66 (13,7)	54 (13,4)	1,20 (0,75-1,94)
	A/A	23 (4,8)	37 (9,2)	<b>2,28 (1,24-4,21)</b>
G/G	G/G	1 (0,2)	6 (1,4)	7,88 (0,91-68,39)
	G/A	6 (1,2)	7 (1,7)	1,70 (0,54-5,39)
	A/A	3 (0,6)	3 (0,7)	1,52 (0,28-8,10)
<i>P</i> de Interacción: 0,41				
rs2145418	rs4658973 ( <i>WDR3</i> )			
T/T	T/T	115 (24,0)	90 (22,3)	1,00
	T/G	135 (28,1)	115 (28,6)	1,12 (0,77-1,64)
	G/G	60 (12,5)	39 (9,7)	1,00 (0,60-1,65)
T/G	T/T	38 (7,9)	34 (8,4)	1,20 (0,69-2,09)
	T/G	69 (14,4)	58 (14,4)	1,13 (0,71-1,77)
	G/G	23 (4,8)	33 (8,2)	<b>1,87 (1,01-3,45)</b>
G/G	T/T	1 (0,2)	6 (1,4)	7,14 (0,83-61,65)
	T/G	6 (1,2)	7 (1,7)	1,53 (0,49-4,82)
	G/G	3 (0,6)	3 (0,7)	1,37 (0,26-7,28)
<i>P</i> de Interacción: 0,32				

marcada por el SNP rs2145418 en la susceptibilidad al cáncer de tiroides. En la tabla 21 se muestran los resultados del análisis de la interacción entre cada uno de los SNPs del gen *WDR3* y el SNP rs2145418, las *odds ratio* ajustadas con el sexo y la edad corresponden a las distintas combinaciones de ambos genotipos tomando como referencia el genotipo formado por el doble homocigoto de los alelos más frecuentes.

A pesar de encontrar que algunas combinaciones producen valores de OR significativas, la interacción global da valores de  $P= 0,32$ . Así, nuestros resultados indican que no existe una interacción entre los SNPs del gen *WDR3* y los genotipos del marcador rs2145418. Por lo tanto, se descarta la posible sinergia entre estas dos regiones de susceptibilidad al cáncer de tiroides en el cromosoma 1p12.

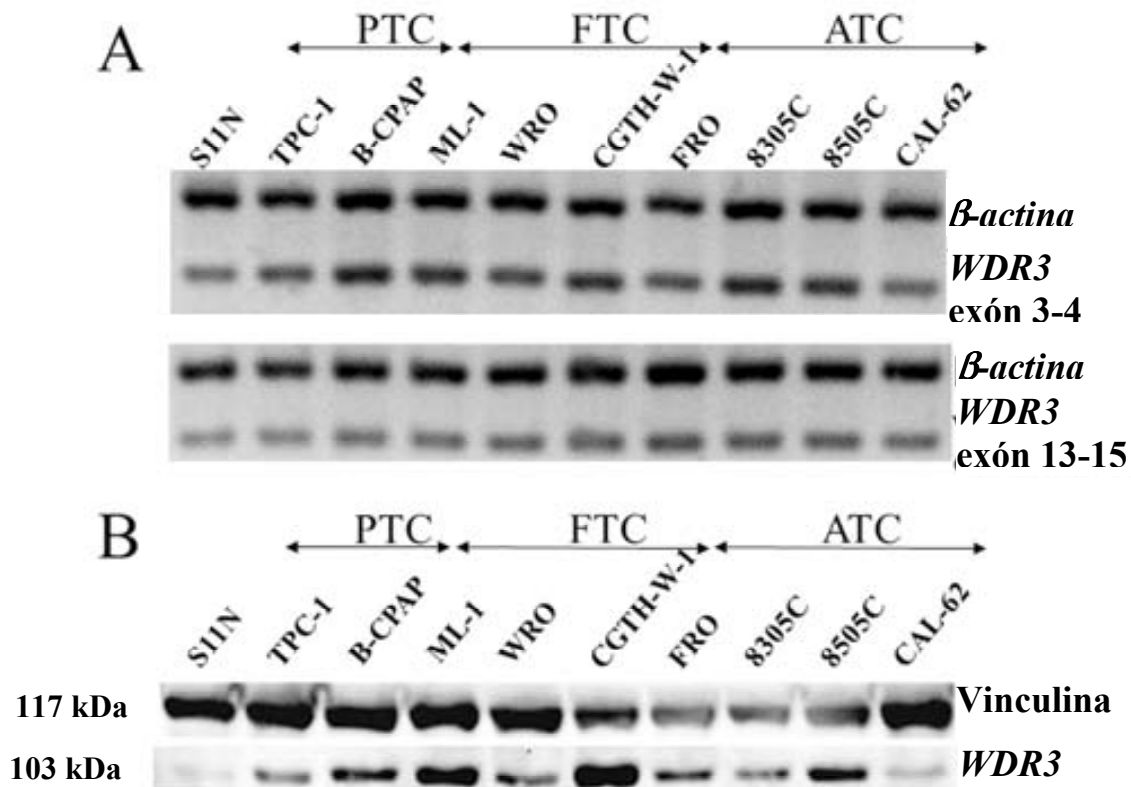
#### **4.2.4 EXPRESIÓN DEL GEN *WDR3* EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE TIROIDES**

Basándonos en los estudios de asociación descritos anteriormente, nosotros hipotizamos que si el gen *WDR3* desempeña algún papel en el desarrollo de cáncer de tiroides, la expresión del gen *WDR3* podría estar alterada en el tejido tumoral. Para probar esta hipótesis, se realizó RT-PCR y análisis de *western blot* en una línea celular humana normal de tiroides y en 9 líneas celulares humanas de cáncer de tiroides de diferentes tipos histológicos: dos papilar, tres folicular y cuatro carcinomas de tiroides anaplásico. El análisis semicuantitativo por RT-PCR se realizó amplificando los exones 3-4 y los exones 13-15 del mRNA del gen *WDR3*.

Como se muestra en la figura 14 los dos segmentos del mRNA se amplificaron con éxito en todas las líneas celulares analizadas. El análisis de la expresión de *WDR3* por *western blot*, reveló una banda de 103 kDa correspondiente a la estimación del tamaño de la proteína.

La expresión de *WDR3* en las líneas celulares de cáncer de tiroides fue mayor que en la línea normal de tiroides, excepto en CAL-62 (figura 14). En la figura 14A y B se puede observar una correlación de la señal de *western blot* con la amplificación por RT-PCR del exón 3-4 del cDNA del *WDR3*. La cuantificación de la señal de *western blot* mostró un aumento relativo de la expresión del *WDR3* en las células de cáncer de tiroides, con un rango de 6 a 109 veces (ver la tabla 22 y figura 15). Estos resultados muestran que la expresión del gen *WDR3* está alterada en las células de cáncer de tiroides y sugieren la posible implicación del gen *WDR3* en la tumorigénesis del tiroides.

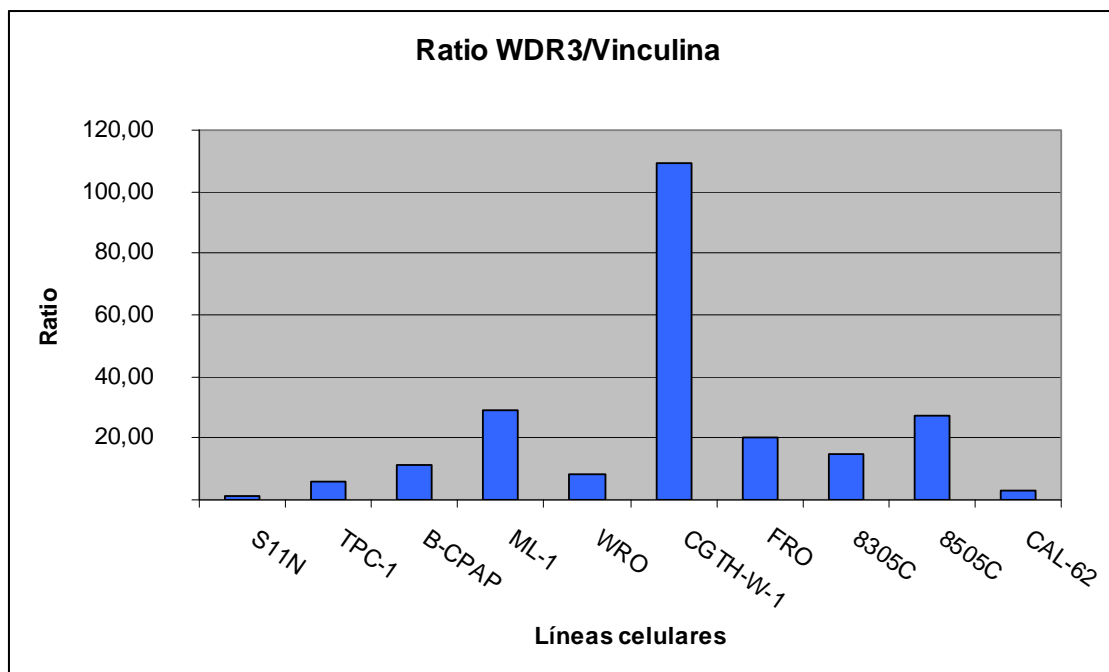




**Figura 14.** Expresión de *WDR3* en líneas celulares de cáncer de tiroides. (A) Análisis semicuantitativo por RT-PCR utilizando  $\beta$ -actina como control interno de la reacción (B) Análisis de la expresión de la proteína del *WDR3* mediante *western blot*, utilizando la vinculina como control. PTC, líneas celulares de cáncer papilar. FTC, líneas celulares de cáncer folicular. ATC, líneas celulares de cáncer anaplásico. S11N, línea celular de tejido normal de tiroides.

**Tabla 22.** Cuantificación de la señal de *western blot* para la proteína WDR3. Se muestra el cociente WDR3/Vinculina y la ratio de la expresión en función de la línea celular normal S11N.

	Línea celular	WDR3/Vinculina	Ratio
NORMAL	S11N	0,07	1,00
PAPILARES	TPC-1	0,40	6,00
	B-CPAP	0,74	11,23
FOLICULARES	ML-1	1,92	29,08
	WRO	0,54	8,17
	CGTH-W-1	7,23	109,29
ANAPLÁSICAS	FRO	1,34	20,31
	8305C	1,00	15,09
	8505C	1,81	27,43
	CAL-62	0,20	3,08

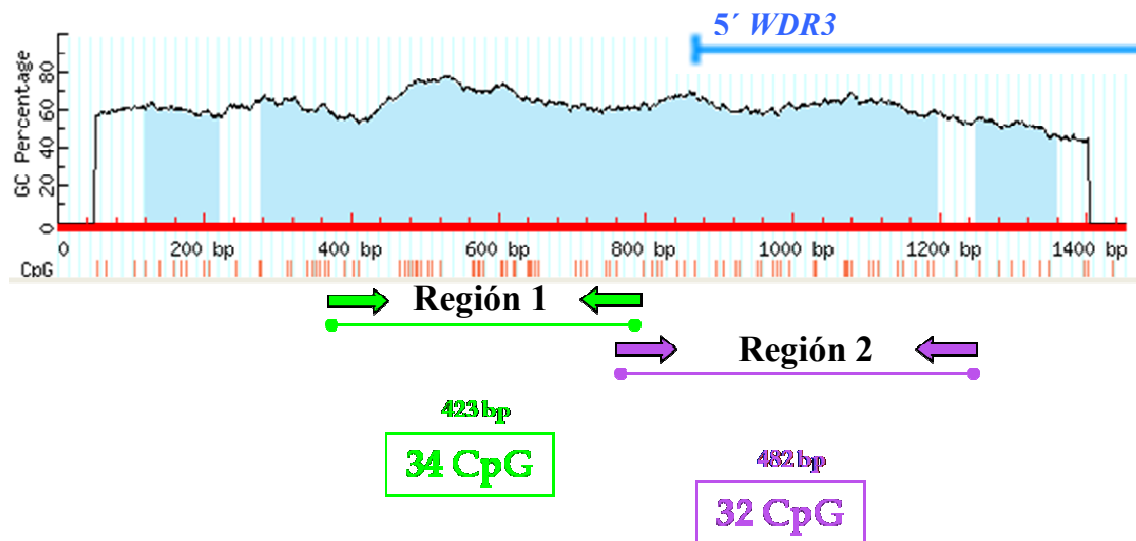


**Figura 15.** Representación grafica de la expresión de *WDR3* relativa a la línea celular normal S11N.

#### 4.2.5 ANÁLISIS DE LA METILACIÓN EN EL PROMOTOR DEL GEN *WDR3*

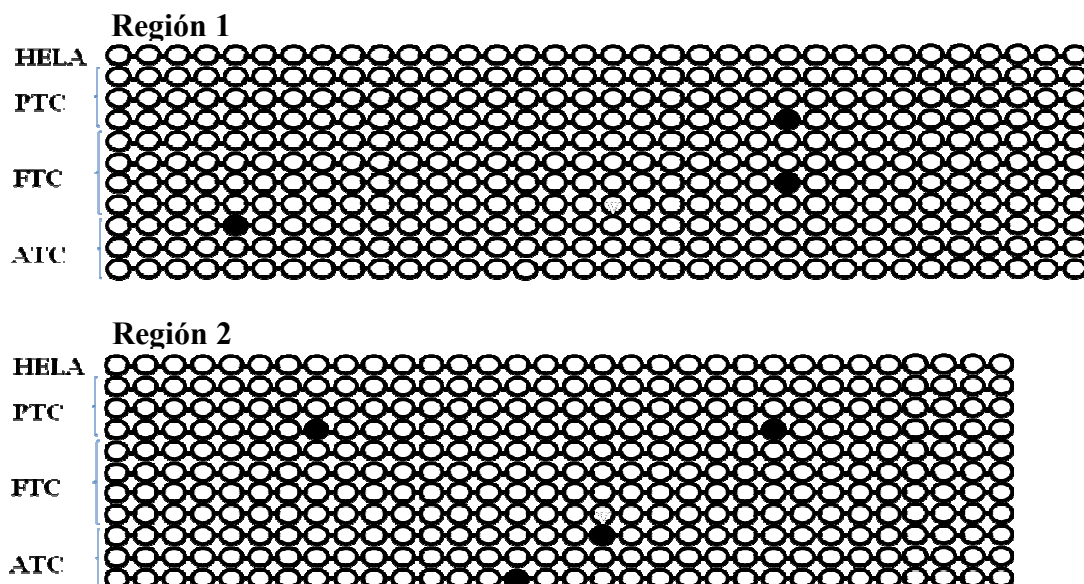
Las alteraciones en los patrones normales de metilación del DNA están asociadas con muchos tipos de cáncer. Cambios en la transcripción génica debidos a la hipermetilación o hipometilación de islas CpG en sus promotores son claves en el proceso tumorigénico. Dadas las diferencias encontradas a nivel transcripcional en el gene *WDR3*, se realizó un análisis del grado de metilación de la región promotora de este gen en las líneas celulares utilizadas en el análisis de expresión descrito anteriormente. Para ello, se modificó el DNA con bisulfito sódico, se amplificaron por PCR las regiones a analizar y se secuenciaron. La modificación con bisulfito sódico 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.

En la figura 16 se representa la región 5' del gen *WDR3* con una isla CpG de 1400 pb. Se indica también las dos regiones analizadas. La isla CpG de 1400 bp contiene 96 sitios CpG. Se analizaron dos regiones: la región 1 con 34 sitios CpG y la región 2 con 32 sitios CpG.



**Figura 16.** Las dos regiones analizadas del promotor del gen *WDR3* para metilación. La región 1 de 34 islas CpG y la región 2 de 32 islas CpG.

La metilación de las regiones 1 y 2 en las distintas líneas celulares analizadas se muestra en la figura 17. Se observa que ambas regiones se encuentran no metiladas de forma generalizada en todas las líneas celulares, indicando que no existen diferencias en el grado de metilación entre las mismas, por lo que otros factores serán los responsables de la expresión diferencial del gen *WDR3* en las líneas celulares de cáncer de tiroides analizadas.



**Figura 17.** Grado de metilación de la isla CpG en el promotor del gen *WDR3*.

- Representa un sitio CpG no metilado.
- Representa un sitio CpG metilado.
- PTC: líneas celulares de tipo papilar.
- FTC: líneas celulares de tipo folicular.
- ATC: líneas celulares de tipo anaplásico.

### 4.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LA REGIÓN 8q CON CÁNCER DE TIROIDES

Según se ha indicado en la introducción, el cromosoma 8q se ha relacionado con el riesgo de diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de tiroides. Teniendo en cuenta estos datos, en este trabajo se determina la implicación del cromosoma 8q en la susceptibilidad al cáncer de tiroides, mediante un estudio de asociación caso-control de una población española.

#### 4.3.1 GENOTIPADO DE SIETE POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN 8q Y ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN AL CÁNCER DE TIROIDES

En el estudio de asociación caso-control se seleccionaron siete polimorfismos del cromosoma 8q: rs4129682 y rs7823804 se encuentran en el gen *TRHR* ubicado en 8q23; los SNPs rs180223, rs853326 y rs2076740 en el gen *TG* que se encuentran en 8q24. Se estudiaron dos SNPs adicionales, rs6983267 y rs1447295 localizados en 8q24, que han sido descritos como marcadores de riesgo en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de tiroides. Más información de los SNPs de la región 8q utilizados en este estudio se encuentra en la tabla 23.

**Tabla 23.** SNPs estudiados de la región 8q.

SNP	posición <sup>a</sup>	Locus	Alelos	Polimorfismo en el gen
rs4129682	110191315	TRHR	C/T	Intron 1
rs7823804	110198554	TRHR	G/T	Intron 1
rs6983267	128482487	8q24	G/T	NA
rs1447295	128554220	8q24	A/C	NA
rs180223	133969434	TG	G/T	Ser734Ala
rs853326	133979156	TG	C/T	Met1028Val
rs2076740	134053240	TG	C/T	Arg1999Trp

<sup>a</sup>Posición según la base de datos UCSC Genome Bioinformatics, NA. No aplicable.

Los siete polimorfismos mencionados se analizaron en la población de pacientes y controles descrita en el apartado 4.1 de resultados (Tabla 15). En total se genotiparon 479 controles y 402 pacientes para cada uno de los siete SNPs. En la población control, el análisis de las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas calculadas a partir de las frecuencias alélicas indica que todos los polimorfismos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto el rs6983267 ( $P=0,01$ ). Por lo tanto, las

frecuencias alélicas de rs6983267 se han comparado mediante el test de tendencia de Armitage. Esto no afecta a la comparación de las frecuencias genotípicas mediante regresión logística en el que no influye el equilibrio de Hardy-Weinberg. Como queda recogido en la tabla 15 del apartado 4.1 de Resultados, las frecuencias de distribución de sexos son diferentes entre controles y pacientes. Por lo tanto, en controles hemos analizado la distribución de genotipos en función de esta variable. En este análisis no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas.

En la tabla 24 se indican las frecuencias alélicas del alelo menos frecuente o variante (MAF) para los siete SNPs estudiados. También, se muestran las frecuencias genotípicas en la población de controles y pacientes con cáncer de tiroides y la estima del riesgo mediante los valores de *odds ratio* ajustados con el sexo y la edad.

Las frecuencias alélicas muestran diferencias estadísticamente significativas entre las controles y pacientes para los polimorfismos rs180223 y rs853326 que se encuentran en los exones 10 y 12 del gen *TG*, respectivamente ( $P < 0,01$ ). Para el resto de los SNPs no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélicas entre los controles y pacientes.

A partir de las frecuencias genotípicas se analizó la posible asociación de cada polimorfismo con el cáncer de tiroides mediante una regresión logística y siguiendo un modelo de herencia codominante. Los polimorfismos rs180223 y rs853326 del gen *TG* mostraron una clara asociación, estadísticamente significativa, con el cáncer de tiroides (ver tabla 24). Este resultado concuerda con la diferencia en la frecuencia alélica entre pacientes y controles para estos marcadores. Además, se observa la presencia de una sola copia del alelo variante es suficiente para conferir riesgo al cáncer de tiroides.

En concreto para el marcador rs180223, los genotipos GT y TT muestran un valor de *odds ratio* 1,80 (IC 95% = 1,27-2,55) y 1,87 (IC 95% = 1,21-2,89), respectivamente ( $P = 0,001$ ). Lo que indica que tomando como referencia los individuos con genotipo GG, los individuos portadores del alelo variante T (una o dos copias) presentan el mismo riesgo elevado de cáncer de tiroides y sugiere un efecto dominante del polimorfismo. De la misma manera, los genotipos CT y TT del polimorfismo rs853326 muestran un valor de *odds ratio* 1,80 (IC 95% = 1,28-2,55) y 1,85 (IC 95% = 1,20-2,87), respectivamente ( $P = 0,0014$ ). Lo que indica que el efecto de riesgo del alelo variante T, también sigue un modelo dominante. El tercer marcador de *TG* analizado (rs2076740) no muestra una asociación estadísticamente significativa.

**Tabla 24.** Frecuencias alélicas, distribución de genotipos y odds ratio ajustadas con el sexo y la edad, según un modelo de herencia codominante de siete SNPs en cromosoma 8q.

SNP	MAF		P <sup>a</sup>	Genotipo	Controles N (%)	Pacientes N (%)	Odds Ratio (IC 95%)	P
	Controles N=479	Pacientes N=402						
<i>TRHR</i>								
rs4129682	0,48	0,47	0,91	C/C	127 (26,9)	100 (25,1)	1,00	
				C/T	240 (50,9)	217 (54,5)	1,05 (0,73-1,50)	
				T/T	105 (22,2)	81 (20,4)	0,88 (0,57-1,37)	0,68
rs7823804	0,36	0,35	0,56	T/T	186 (39,4)	165 (41,5)	1,00	
				T/G	233 (49,4)	190 (47,7)	0,84 (0,61-1,15)	
				G/G	53 (11,2)	43 (10,8)	0,88 (0,53-1,48)	0,55
8q24								
rs6983267	0,47	0,47	0,81 <sup>b</sup>	G/G	142 (30,7)	115 (29,4)	1,00	
				G/T	204 (44,1)	188 (48,1)	1,10 (0,77-1,57)	
				T/T	117 (25,3)	88 (22,5)	0,97 (0,64-1,47)	0,77
rs1447295	0,07	0,08	0,33	C/C	414 (86,8)	335 (84,8)	1,00	
				C/A	60 (12,6)	55 (13,9)	1,03 (0,66-1,60)	
				A/A	3 (0,6)	5 (1,3)	2,33 (0,44-12,33)	0,59
<i>TG</i>								
rs180223 (Ser734Ala)	0,40	0,47	<0,01	G/G	177 (37,3)	109 (27,6)	1,00	
				G/T	214 (45,1)	199 (50,4)	<b>1,80 (1,27-2,55)</b>	
				T/T	83 (17,5)	87 (22,0)	<b>1,87 (1,21-2,89)</b>	<b>0,001</b>
rs853326 (Met1028Val)	0,40	0,47	<0,01	C/C	178 (37,5)	110 (27,6)	1,00	
				C/T	213 (44,9)	201 (50,5)	<b>1,80 (1,28-2,55)</b>	
				T/T	83 (17,5)	87 (21,9)	<b>1,85 (1,20-2,87)</b>	<b>0,001</b>
rs2076740 (Arg1999Trp)	0,39	0,37	0,36	C/C	172 (38,0)	153 (40,9)	1,00	
				C/T	210 (46,5)	167 (44,6)	0,87 (0,62-1,22)	
				T/T	70 (15,5)	54 (14,4)	0,90 (0,56-1,45)	0,71

<sup>a</sup> test de  $\chi^2$ .

<sup>b</sup> test de tendencia de Armitage.

Como se acaba de indicar, el riesgo estimado para los polimorfismos rs180223 y rs853326 del gen *TG* es el mismo para los homocigotos del alelo variante que para los heterocigotos, lo que indica un modelo de herencia dominante. Por lo tanto, se utilizó este modelo de herencia para evaluar el riesgo asociado a estos polimorfismos y después de la estratificación del grupo de pacientes según el tipo de cáncer de tiroides, papilar (PTC) o folicular (FTC). Como se muestra en la tabla 25, para los dos polimorfismos se observó una asociación estadísticamente significativa de los portadores del alelo variante con el cáncer de tiroides, y con el cáncer papilar y folicular por separado. Además, la estimación de riesgo para el grupo total de pacientes (rs180223 OR = 1,82, IC 95% = 1,31-2,52,  $P < 0,001$ ; rs853326 OR = 1,82, IC 95% = 1,31-2,52,  $P < 0,001$ ) y para los subgrupos de pacientes por separado, PTC (rs180223 OR = 1,73, IC 95% = ,83-2,44,  $P = 0,001$ ; rs853326 OR = 1,73, IC 95% = 1,23-2,44,  $P = 0,001$ ) y FTC (rs180223 OR = 2,45, IC 95% = 1,17-5,13,  $P = 0,01$ ; rs853326 OR = 2,50, IC 95% = 1,19-5,22,  $P = 0,01$ ), fueron similares. A continuación, el análisis de haplotipos resultante de la combinación de los SNPs de riesgo del gen *TG*, rs180223 (Ser734Ala) y rs853326 (Met1028Val) revela sólo dos haplotipos de los 4 haplotipos posibles. Como se muestra en la tabla 26, el haplotipo formado por los dos alelos variantes, TT, presentó una distribución diferente entre casos y controles con una OR estadísticamente significativa de 1,41 (IC 95% = 1,14-1,75,  $P = 0,001$ ) para el grupo total de pacientes. En el grupo de pacientes con cáncer papilar las ORs del haplotipo de riesgo TT fueron similares a las encontradas en la población total de pacientes 1,39 (IC 95% = 1,11-1,74,  $P < 0,01$ ). En el grupo de pacientes con el cáncer folicular el haplotipo TT no mostró una relación estadísticamente significativa con este tipo de cáncer, probablemente debido al número reducido de los pacientes con cáncer folicular (N=59).

Cabe señalar que la combinación de los dos alelos de riesgo no modificada el riesgo estimado para cada locus, por lo que en los casos y los controles la distribución del haplotipo TT es equivalente a la distribución del alelo variante de cada polimorfismo (ver la tabla 25 y la tabla 26 para comparar).

Seguidamente, se analizó la posible interacción del marcador rs180223 (exones 10-12) y el marcador rs2076740 (exón 33). En este análisis no se detectaron interacciones ( $P = 0,39$ ).

**Tabla 25.** Distribución de genotipos y estimación del riesgo de los SNPs rs180223 y rs853326 de acuerdo con el modelo dominante.

<b>Gentipos de TG</b>		<b>Controles</b>	<b>Pacientes</b>				<b>PTC</b>				<b>FTC</b>		
<b>SNP</b>	<b>Genotipos</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>Odds Ratio</b>			<b>N=339</b>	<b>Odds Ratio</b>			<b>N=59</b>	<b>Odds Ratio</b>	<b>P</b>
		<b>N=479</b>	<b>N=402</b>	<b>(IC 95%)</b>	<b>P</b>			<b>(IC 95%)</b>	<b>P</b>			<b>(IC 95%)</b>	<b>P</b>
rs180223 (Ser734Ala)	G/G	177(37,3)	109(27,6)	1,00			94(28,1)	1,00			15(25,4)	1,00	
	G/T-T/T	297(62,7)	286(72,4)	1,82 (1,31-2,52)	<0,001		240(71,9)	1,73 (1,23-2,44)	0,001		44(74,6)	<b>2,45 (1,17-5,13)</b>	<b>0,01</b>
rs853326 (Met1028Val)	C/C	178(37,5)	110(27,6)	1,00			95(28,2)	1,00			15(25,4)	1,00	
	C/T-T/T	296(62,5)	288(72,4)	1,82 (1,31-2,52)	<0,001		242(71,8)	1,73 (1,23-2,44)	0,001		44(74,6)	<b>2,50 (1,19-5,22)</b>	<b>0,01</b>

PTC. Pacientes con el cáncer papilar.

FTC. Pacientes con el cáncer folicular.



**Tabla 26.** Distribución de haplotipos de la combinación de los SNPs rs180223 y rs853326 y estimación del riesgo.

Haplotipos de TG		Controles	Pacientes	Odds Ratio		PTC	Odds Ratio		FTC	Odds Ratio	
rs180223	rs853326	N=479	N=402	(IC 95%)	P	N=339	(IC 95%)	P	N=59	(IC 95%)	P
G	C	0,5998	0,5311	1,00	---	0,531	1,00	---	0,5169	1,00	---
T	T	0,4002	0,4689	1,41 (1,14-1,75)	0,001	0,469	1,39 (1,11-1,74)	<0,01	0,4831	1,43 (0,92-2,24)	0,11

PTC. Pacientes con el cáncer papilar.

FTC. Pacientes con el cáncer folicular.

Para determinar si existe una relación entre los marcadores de riesgo de *TG* y el sexo y la edad, se estimó el riesgo de los polimorfismos rs180223 y rs853326 en mujeres y hombres y según la edad de diagnóstico. Los resultados se muestran en la tabla 27, donde se puede observar que en las mujeres, las ORs fueron significativas en los dos polimorfismos, independientemente de la edad al momento del diagnóstico. Tendencias similares se observaron en los hombres menores de 45 años. Sin embargo, en los hombres mayores de 45 años los marcadores de riesgo de *TG* no mostraron asociación con el cáncer de tiroides.

**Tabla 27.** Los genotipos de los SNPs rs180223 y rs853326 y el riesgo del cáncer de tiroides en mujeres y hombres y según la edad del diagnóstico.

SNP	Genotipo	<45				≥45			
		Controles	Pacientes	Odds Ratio (95% IC)	<i>P</i> <sup>a</sup>	Controles	Pacientes	Odds Ratio (95% IC)	<i>P</i> <sup>a</sup>
Mujeres		N=164	N=153			N=119	N=154		
rs180223	G/G	74 (45,7)	49 (32,2)	1,00		42 (35,6)	38 (24,8)	1,00	
(Ser734Ala)	G/T-T/T	88 (54,3)	103 (67,8)	<b>1,77 (1,12-2,80)</b>	<b>0,01</b>	76 (64,4)	115 (75,2)	1,67 (0,99-2,83)	0,05
rs853326	C/C	74 (45,7)	49 (32,0)	1,00		43 (36,4)	38 (24,7)	1,00	
(Met1028Val)	C/T-T/T	88 (54,3)	104 (68,0)	<b>1,78 (1,13-2,83)</b>	<b>0,01</b>	75 (63,6)	116 (75,3)	<b>1,75 (1,04-2,96)</b>	<b>0,04</b>
Hombres		N=89	N=39			N=107	N=50		
rs180223	G/G	31 (35,2)	8 (20,5)	1,00		30 (28,3)	14 (28,6)	1,00	
(Ser734Ala)	G/T-T/T	57 (64,8)	31 (79,5)	2,11 (0,86-5,14)	0,09	76 (71,7)	35 (71,4)	0,99 (0,47-2,09)	0,97
rs853326	C/C	31 (35,6)	8 (20,5)	1,00		30 (28,0)	15 (30,0)	1,00	
(Met1028Val)	C/T-T/T	56 (64,4)	31 (79,5)	2,15 (0,88-5,24)	0,08	77 (72,0)	35 (70,0)	0,91 (0,43-1,90)	0,80

<sup>a</sup> valor de *P* se corresponde con el modelo dominante.

N. número de individuos.

### **4.3.2 INTERACCIÓN DEL GEN *TG* CON LOS GENES *THRA* Y *THRB***

La tiroglobulina (TG) es la precursora de las hormonas tiroideas. A su vez la acción de la hormona tiroidea T3 en los tejidos dianas tiene lugar mediante su interacción con los receptores de la hormona tiroidea (*THRA* y *THRB*). Los THR son factores de transcripción que tras su unión con T3 reconocen secuencias específicas del DNA, los elementos de respuesta a la hormona tiroidea (TREs), regulando la transcripción de los genes diana de la hormona (Jansen et al., 2005).

Dada la relación funcional entre la hormona tiroidea T3 y los receptores de la hormona tiroidea, en este estudio analizamos la posible interacción del gen *TG* y los genes *THRA* y *THRB* en la susceptibilidad al cáncer de tiroides.

En un estudio paralelo en nuestro laboratorio se analizó la asociación de un SNP de *THRA* (rs939348) y tres SNPs de *THRB* (rs3752874, rs826377 y rs844107) con cáncer de tiroides, donde el SNP rs939348 del gen *THRA* mostraba un aumento de riesgo de cáncer tiroides con una OR estadísticamente significativa de 1,79 (IC 95% =1,02-3,13,  $P=0,039$ ) considerando el modelo dominante. Por el contrario, ninguno de los SNPs analizados del gen *THRB* mostró asociación con cáncer de tiroides.

Los estudios de interacción realizados en este trabajo comprenden dos marcadores del gen *TG*: el marcador rs180223 (exones 10-12) y el marcador rs2076740 (exón 33) y los marcadores rs939348 (*THRA*) y rs3752874, rs826377 y rs844107 (*THRB*). En las tablas 28 y 29 se muestran los resultados del análisis de la interacción de los SNPs de *TG* rs180223 y rs2076740, respectivamente, y los SNPs de *THRA* y *THRB*. Las odds ratio ajustadas con el sexo y la edad corresponden a las distintas combinaciones de genotipos tomando como referencia al genotipo doble homocigoto de los alelos más frecuentes. Nuestros resultados indican que no existe interacción entre el marcador del gen *TG* rs180223 y los SNPs de *THRB* y *THRA* estudiados ( $P>0,05$ ). Sin embargo, se evidenció la interacción del SNP rs2076740 de *TG* con el SNP rs3752874 del exón 7 del gen *THRB* ( $P=0,049$ ) y con el SNP rs844107 que se encuentra en la región 3' UTR de este gen, aunque en este caso, sin alcanzar la significación estadística ( $P=0,053$ ).

Cabe señalar que tanto el marcador rs2076740 de *TG* como los marcadores rs3752874 y rs844107 de *THRB* no mostraron asociación con el cáncer de tiroides de forma individual. Para el resto de los SNPs de *THRA* y *THRB* estudiados, no se detectaron interacciones con el marcador rs2076740.

**Tabla 28.** Análisis de la interacción entre el SNP rs180223 del gen *TG* y los SNPs de *THRA* y *THRB*. Odds ratio ajustadas con sexo y edad.

		<b>Controles</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Odds Ratio</b>
		<b>N=479</b>	<b>N= 402</b>	<b>(IC 95%)</b>
		<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
rs180223 ( <i>TG</i> )	rs3752874 ( <i>THRB</i> )			
	C/C	116 (24,32)	76 (18,91)	1,00
G/G	C/T	56 (11,74)	31 (7,71)	0,79 (0,46-1,35)
	T/T	4 (0,84)	2 (0,50)	0,97 (0,17-5,65)
	C/C	152 (31,87)	145 (36,07)	<b>1.51 (1.04-2.20)</b>
G/T	C/T	59 (12,37)	52 (12,94)	1,45 (0,89-2,35)
	T/T	3 (0,63)	1 (0,25)	0,49 (0,05-5,00)
	C/C	62 (13,00)	65 (16,17)	<b>1,69 (1,06-2,68)</b>
T/T	C/T	19 (3,98)	20 (4,98)	1,71 (0,84-3,47)
	T/T	2 (0,42)	2 (0,50)	1,16 (0,16-8,45)
<i>P</i> de Interacción: 0,9				
rs180223 ( <i>TG</i> )	rs826377 ( <i>THRB</i> )			
	T/T	124 (26,00)	76 (18,91)	1,00
G/G	T/C	44 (9,22)	29 (7,21)	1,06 (0,61-1,85)
	C/C	9 (1,89)	4 (1,00)	0,62 (0,18-2,12)
	T/T	138 (28,93)	128 (31,84)	<b>1,58 (1,08-2,31)</b>
G/T	T/C	69 (14,47)	64 (15,92)	<b>1,60 (1,02-2,53)</b>
	C/C	6 (1,26)	6 (1,49)	1,97 (0,59-6,55)
	T/T	55 (11,53)	55 (13,68)	<b>1,78 (1,10-2,89)</b>
T/T	T/C	26 (5,45)	31 (7,71)	<b>1,91 (1,04-3,50)</b>
	C/C	2 (0,42)	1 (0,25)	0,83 (0,07-9,56)
<i>P</i> de Interacción: 0,92				
rs180223 ( <i>TG</i> )	rs844107 ( <i>THRB</i> )			
	A/A	65 (13,63)	39 (9,70)	1,00
G/G	A/G	78 (16,35)	52 (12,94)	1,15 (0,67-1,97)
	G/G	31 (6,50)	17 (4,23)	0,86 (0,41-1,77)
	A/A	79 (16,56)	81 (20,15)	<b>1,82 (1,09-3,05)</b>
G/T	A/G	103 (21,59)	88 (21,89)	1,50 (0,91-2,47)
	G/G	22 (4,61)	27 (6,72)	<b>2,47 (1,21-5,04)</b>
	A/A	34 (7,13)	38 (9,45)	<b>2,13 (1,14-3,99)</b>
T/T	A/G	36 (7,55)	34 (8,46)	1,66 (0,89-3,12)
	G/G	10 (2,10)	11 (2,74)	1,73 (0,66-4,50)
<i>P</i> de Interacción: 0,53				
rs180223 ( <i>TG</i> )	rs939348 ( <i>THRA</i> )			
	C/C	92 (19,29)	54 (13,43)	1,00
G/G	C/T	75 (15,72)	44 (10,95)	0,91 (0,55-1,52)
	T/T	10 (2,10)	10 (2,49)	1,74 (0,67-4,57)
	C/C	118 (24,74)	115 (28,61)	<b>1,73 (1,12-2,66)</b>
G/T	C/T	86 (18,03)	67 (16,67)	1,35 (0,84-2,17)
	T/T	10 (2,10)	17 (4,23)	<b>2,72 (1,14-6,46)</b>
	C/C	47 (9,85)	42 (10,45)	1,66 (0,96-2,88)
T/T	C/T	33 (6,92)	39 (9,70)	<b>1,92 (1,07-3,45)</b>
	T/T	3 (0,63)	6 (1,49)	3,24 (0,76-13,84)
<i>P</i> de Interacción: 0,91				

**Tabla 29.** Análisis de la interacción entre el SNP rs20767740 del gen *TG* y los SNPs de *THRA* y *THRB*. Odds ratio ajustadas con sexo y edad.

		<b>Controles</b> N=479 N (%)	<b>Pacientes</b> N= 402 N (%)	<b>Odds Ratio</b> <b>(IC 95%)</b>
rs2076740 ( <i>TG</i> )	rs3752874 ( <i>THRB</i> )			
	C/C	128 (26,83)	106 (26,37)	1,00
C/C	C/T	43 (9,01)	45 (11,19)	1,17 (0,70-1,93)
	T/T	1 (0,21)	1 (0,25)	1,58 (0,09-27,38)
	C/C	146 (30,61)	123 (30,60)	0,94 (0,66-1,35)
C/T	C/T	58 (12,16)	40 (9,95)	0,81 (0,50-1,32)
	T/T	6 (1,26)	4 (1,00)	0,77 (0,21-2,89)
	C/C	40 (8,39)	45 (11,19)	1,32 (0,79-2,20)
T/T	C/T	29 (6,08)	9 (2,24)	<b>0,37 (0,16-0,82)</b>
	T/T	1 (0,21)	0 (0,00)	0,00
<b>P de Interacción: 0,049</b>				
rs2076740 ( <i>TG</i> )	rs826377 ( <i>THRB</i> )			
	T/T	116 (24,32)	99 (24,63)	1,00
C/C	T/C	52 (10,90)	47 (11,69)	1,03 (0,63-1,68)
	C/C	4 (0,84)	6 (1,49)	1,40 (0,38-5,20)
	T/T	141 (29,56)	115 (28,61)	0,89 (0,61-1,29)
C/T	T/C	58 (12,16)	50 (12,44)	0,98 (0,61-1,57)
	C/C	11 (2,31)	2 (0,50)	<b>0,20 (0,04-0,96)</b>
	T/T	43 (9,01)	33 (8,21)	0,92 (0,53-1,57)
T/T	T/C	25 (5,24)	19 (4,73)	0,81 (0,41-1,57)
	C/C	2 (0,42)	2 (0,50)	1,25 (0,17-9,50)
<b>P de Interacción: 0,35</b>				
rs2076740 ( <i>TG</i> )	rs844107 ( <i>THRB</i> )			
	A/A	66 (13,84)	55 (13,68)	1,00
C/C	A/G	83 (17,40)	72 (17,91)	0,96 (0,59-1,58)
	G/G	12 (2,52)	23 (5,72)	2,11 (0,95-4,71)
	A/A	81 (16,98)	75 (18,66)	0,97 (0,60-1,59)
C/T	A/G	87 (18,24)	65 (16,17)	0,84 (0,51-1,38)
	G/G	38 (7,97)	22 (5,47)	0,65 (0,34-1,24)
	A/A	18 (3,77)	24 (5,97)	1,62 (0,78-3,37)
T/T	A/G	40 (8,39)	22 (5,47)	0,60 (0,31-1,15)
	G/G	11 (2,31)	8 (1,99)	0,82 (0,30-2,24)
<b>P de Interacción: 0,053</b>				
rs2076740 ( <i>TG</i> )	rs939348 ( <i>THRA</i> )			
	C/C	95 (19,92)	81 (20,15)	1,00
C/C	C/T	73 (15,30)	60 (14,93)	0,91 (0,57-1,44)
	T/T	4 (0,84)	12 (2,99)	3,30 (1,00-10,85)
	C/C	109 (22,85)	94 (23,38)	0,98 (0,65-1,48)
C/T	C/T	87 (18,24)	58 (14,43)	0,69 (0,44-1,09)
	T/T	14 (2,94)	15 (3,73)	1,15 (0,51-2,57)
	C/C	40 (8,39)	28 (6,97)	0,84 (0,47-1,50)
T/T	C/T	27 (5,66)	24 (5,97)	0,96 (0,51-1,82)
	T/T	3 (0,63)	1 (0,25)	0,29 (0,03-2,90)
<b>P de Interacción: 0,24</b>				



## **Discusión**





## **5 DISCUSIÓN**

---

El cáncer es una de las enfermedades más comunes y severas de nuestra sociedad. Alrededor de un tercio de la población desarrollará, a lo largo de su vida, algún tipo de cáncer que será responsable de un 20% de las muertes en países desarrollados y que supone más de un 10% del coste médico total.

El origen del cáncer hay que buscarlo por un lado en los agentes exógenos que van a favorecer en determinados casos su desarrollo y por otro lado, en la susceptibilidad genética constitucional que va a tener cada individuo para desarrollar un tumor.

La etiología génica del cáncer incluye variantes génicas denominadas de alta penetrancia, ya que los portadores de la variante suelen manifestar la enfermedad con una alta probabilidad. Estas variantes suelen ser de muy baja frecuencia en la población general, por ejemplo, las mutaciones heredadas en el gen supresor de tumores *APC* determinan la aparición de la poliposis familiar adenomatosa que a menudo degenera en carcinomas en el colon, pero esta entidad no explica más de un 1% del total de tumores de colon. En la actualidad muchos investigadores centran sus trabajos en identificar genes con polimorfismos que se dan en la población con mayor frecuencia y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad, pero con baja probabilidad (baja penetrancia). Un ejemplo son las variantes en genes que codifican enzimas glutatión-S-transferasas (*GSTT1*, *GSTM1*). Los individuos fumadores y portadores de estas variantes podrían tener un riesgo aumentado de padecer cáncer de pulmón o de vejiga, posiblemente por ser incapaces de metabolizar los carcinógenos del tabaco (McWilliams et al., 1995; Sorensen et al., 2004), aunque estos hallazgos no siempre son consistentes (Benhamou et al., 2002).

Existen varios tipos de variantes polimórficas en el genoma humano, pero los más frecuentes y útiles para el genotipado son los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs). Los SNPs son loci genómicos donde dos bases alternativas están presentes con una frecuencia superior al 1%. Por ejemplo, en el gen *ApoE* se han descrito varios polimorfismos frecuentes que consisten en cambios de una única base. Uno de ellos, resulta en un cambio en el aminoácido cisteína de la posición 112 por una arginina. Esta variante se asocia con la enfermedad de Alzheimer (Strittmatter et al., 1993).

Respecto al cáncer de tiroides, es la forma más frecuente del cáncer endocrinológico (98%). Aunque representa solamente el 1% de todos los tipos del cáncer, es tres veces más frecuente en mujeres que en hombres (Grebe y Hay, 1995), y es el octavo cáncer más frecuente en mujeres (Nix et al., 2005). Esta neoplasia tiene su origen en la interacción de factores genéticos y ambientales (Kondo et al., 2006; Sturgis y Li, 2009), siendo la radiación el factor ambiental más estudiado y mejor establecido (Kazakov et al., 1992; Inskip, 2001). Así, se ha observado un aumento en la frecuencia de esta enfermedad en personas expuestas a radiaciones sobre todo en niños (Segev et al., 2003). Se considera que la historia familiar constituye el segundo riesgo más importante para desarrollar esta enfermedad (5% de los pacientes que desarrollan el cáncer papilar y 20-25% que desarrollan cáncer medular). Con respecto a la variedad de cáncer de tiroides medular las causas genéticas están bien establecidas y resultan del desorden conocido como neoplasia múltiple endocrina de tipo IIa (MEN IIa) (Patocs et al., 2003; Robledo et al., 2003).

Numerosos estudios relacionan la susceptibilidad al cáncer de tiroides con polimorfismos en los genes de reparación, así como en polimorfismos en los genes de metabolismo o genes que regulan el ciclo celular.

En 2009 un estudio de asociación con variantes de todo el genoma (*Genome wide association*) mostró que las regiones 9q22 y 14q13, que contienen genes de diferenciación de la tiroides *FOXE1* y *NKX2-1*, están asociadas con la susceptibilidad al cáncer de tiroides (Gudmundsson et al., 2009). Otros estudios también han permitido identificar polimorfismos en las regiones 5q33, 1p12, 8q24 relacionados con la susceptibilidad al cáncer de tiroides (Baida et al., 2008; Jazdzewski et al., 2008; He et al., 2009). Estudios de asociación realizados por nosotros, analizando polimorfismos a lo largo del cromosoma 1p, mostraron que la región 1p12 está asociada al cáncer de tiroides (Baida et al., 2008). En esta región se encuentra el gen *WDR3* implicado en la progresión del ciclo celular y la apoptosis. Por otra parte, en el cromosoma 8q24, se han identificado tres regiones independientes relacionadas con el riesgo a diferentes tipos de cánceres, incluyendo cáncer de tiroides (Yeager et al., 2007; Wokolorczyk et al., 2008). Aunque no se han definido genes ligados a los marcadores de susceptibilidad en estas regiones, el gen de la tiroglobulina se localiza en esta zona del cromosoma 8q

En el presente trabajo hemos centrado el análisis de la asociación del gen *WDR3* de la región 1p12 y la región cromosómica 8q, utilizando una población de 881

individuos entre pacientes de cáncer de tiroides y controles para determinar la implicación de estas regiones en el riesgo al cáncer de tiroides.

### **5.1 ASOCIACIÓN DEL GEN *WDR3* CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES**

Nuestros resultados previos muestran que el SNP rs4658973 que se encuentra en el intrón 25 del gen *WDR3* está asociado al cáncer de tiroides (Baida et al., 2008). Así, en este trabajo se amplió el estudio de asociación para delimitar la región de susceptibilidad. El estudio se realizó en dos fases genotipando primero 10 SNPs que comprenden una región de aproximadamente 50 kb y que cubren el gen *WDR3* y sus regiones 5' y 3' en una población de 157 casos y 118 controles, posteriormente se incrementó la muestra a 402 casos y 479 controles. En ambos estudios de asociación caso-control se obtuvieron resultados similares, donde el análisis de haplotipos confirmó que el gen *WDR3* está implicado en el riesgo al cáncer de tiroides.

Cuando los polimorfismos genotipados se encuentran en DL perteneciendo a un solo bloque de ligamiento, el análisis de haplotipos permite revelar si ciertas combinaciones de variantes genéticas en múltiples SNPs muestran frecuencias diferentes en casos y controles, indicando la asociación con la enfermedad, aunque el análisis individual de SNPs no muestra asociación. Así, en nuestro estudio genotipando un número reducido de individuos (fase I) se observó un haplotipo formado por la combinación TACCTACTGC de 10 SNPs con un riesgo mayor de cáncer de tiroides, aunque no alcanzó la significación estadística (OR = 3,23, IC 95% = 0,90-11,61,  $P=0,073$ ). El análisis posterior con una muestra mayor (fase II), donde se genotiparon tres de los diez SNPs analizados en la fase I, mostró unas *odds ratio* del haplotipo CAT equivalente al haplotipo TACCTACTGC de la fase I, de 1,85 (IC 95% = 0,97-3,55,  $P=0,063$ ). Cuando estratificamos los pacientes con respecto al tipo de cáncer, papilar o folicular, encontramos que este haplotipo muestra una OR superior (OR = 2,00, IC 95% = 1.05-3.92,  $P<0,044$ ) para los pacientes PTC, sin embargo; en los pacientes FTC la OR no llegó a ser significativa. Aunque esta diferencia podría sugerir un papel de *WDR3* en la diferenciación histológica del cáncer de tiroides, se ha de tener en cuenta que el reducido número de pacientes con cáncer folicular hace reducir el poder estadístico después de estratificación en el caso del FTC. Así, la falta de significación podría atribuirse a la falta de potencia relacionada con el pequeño tamaño muestral.

Por otro lado, el grupo de pacientes muestra una distribución diferente de los haplotipos relacionadas con la edad del diagnóstico ( $P= 0,0192$ ), lo que sugiere que *WDR3* puede estar implicado en la etiología del cáncer de tiroides relacionada con la edad. Estos resultados sugieren que *WDR3* podría desempeñar un papel en la diferenciación histológica de cáncer de tiroides y en su etiología relacionada con la edad.

El gen *WDR3* mostró un aumento de expresión en ocho de las nueve líneas celulares de cáncer de tiroides utilizadas; así, la expresión alterada de *WDR3* apoyaría nuestros estudios de asociación, por lo tanto, el gen *WDR3* puede considerarse un factor de susceptibilidad para el cáncer de tiroides en la población estudiada. Este es uno de los primeros estudios que describen un factor de riesgo genético para el cáncer de tiroides, junto con los estudios recientes que muestran que el gen *FOXE1* es un factor de riesgo para este tipo de cáncer (Landa et al., 2009; Takahashi et al., 2010). El análisis de la metilación de la región promotora del gen *WDR3* indica que la metilación no influye la expresión del gen *WDR3* y que otros factores en cis y trans regulan la expresión de este gen o afectan a la estabilidad del mRNA. La regulación de la expresión del gen *WDR3* es desconocida y respecto a su función, recientemente, se ha descrito su implicación en la biogénesis de ribosomas (McMahon et al., 2010). Los autores de dicho trabajo proponen que la sobre-expresión del *WDR3* promueve la proliferación de células cancerosas mediante la interrupción de la vía de síntesis de ribosomas. Además, el gen *WDR3* forma parte de la familia de los genes WDR que están implicadas en muchos procesos celulares, como la progresión de ciclo celular, traducción de señales, apoptosis y regulación génica (van der Voorn y Ploegh, 1992; Neer et al., 1994; Smith et al., 1999). La expresión de proteínas WDR están alteradas en algunos tipos de cáncer (Honore et al., 2002; Silva et al., 2005a). En general, estos estudios sugieren que los genes WDR podrían contribuir al desarrollo del cáncer. Por otra parte, y para confirmar este papel, se han encontrado mutaciones en al menos 4 genes que pertenecen a esta familia en una serie de enfermedades, como en el síndrome de Cockayne (Li y Roberts, 2001).

Finalmente, resaltar que nuestros resultados abren un camino para estudios que permitan la función específica del gen *WDR3* en los procesos celulares y para entender su papel en el cáncer de tiroides y en los procesos carcinogénicos en general.

## 5.2 ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE DISTINTAS REGIONES DEL CROMOSOMA 8q CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES

Diferentes estudios de asociación han implicado al brazo cromosómico 8q en la susceptibilidad al cáncer. Estos estudios han identificado distintas regiones en este cromosoma relacionadas con los tipos de cáncer más frecuentes, aunque no se ha podido determinar los genes implicados (Yeager et al., 2007; Wokolorczyk et al., 2008). Para establecer la posible implicación del cromosoma 8q en el cáncer de tiroides, en este trabajo hemos genotipado dos SNPs que previamente mostraron asociación con diferentes tipos de cáncer, así como SNPs que se encuentran en dos genes implicados en la función tiroidea, los genes *TRHR* y *TG*.

Varios estudios han demostrado que las variantes genéticas comunes rs1447295 y rs6983267 están relacionadas con el cáncer de próstata y colorrectal (Amundadottir et al., 2006; Freedman et al., 2006; Tomlinson et al., 2007; Yeager et al., 2007). Sin embargo, en nuestro estudio observamos que ninguno de estos polimorfismos está asociado con el cáncer de tiroides. Este es el primer análisis del SNP rs1447295 en el cáncer de la tiroides, por lo tanto, estos resultados indican que este SNP no es un marcador de riesgo para cáncer de tiroides. Por otra parte, nuestros resultados de asociación negativa del marcador rs6983267 con el cáncer de tiroides están en contradicción con otro estudio previo, en el que se describe la asociación de rs6983267 con el cáncer de tiroides (Wokolorczyk et al., 2008). En nuestro caso hemos genotipado un total de 402 pacientes y 479 controles, por lo que el tamaño del estudio tiene el poder suficiente para detectar la asociación si estuviera presente. Las divergencias entre ambos estudios pueden explicarse por diferencias genéticas entre las poblaciones, sin destacar que las diferencias pueden ser debidas al azar, debido a los tamaños muestrales.

En cuanto al análisis del genotipo del gen *TRHR*, no encontramos evidencias de su asociación con el cáncer de tiroides en la población española. El *TRHR* es fundamental para la secreción de la hormona estimulante del tiroides TSH (*Thyroid-stimulating hormone*) (Yamada y Mori, 2008). Así, mutaciones en el gen *TRHR* dan lugar a hipotiroidismo (Collu et al., 1997) y, recientemente, estudios de asociación muestran la importancia de *TRHR* en el índice de masa corporal (Liu et al., 2009). Nuestro estudio es el primero en analizar la asociación de *TRHR* con el cáncer de tiroides, aunque otras poblaciones deberían ser estudiadas para confirmar que *TRHR* no es un factor de riesgo de cáncer de tiroides. Además, otras variantes genéticas de *TRHR*

deberían analizarse para ver si existen posibles marcadores de riesgo de cáncer de tiroides en este gen.

Todos los genes que codifican proteínas específicas del tiroides y que participan en el control y síntesis de hormonas del tiroides, pueden estar involucrados en las patologías del tiroides, incluyendo la carcinogénesis de la glándula. Así, la relevancia que tiene el gen que codifica para la *TG* en las patologías benignas del tiroides hace que éste sea un buen candidato para el estudio de la susceptibilidad al cáncer de tiroides (Bosetti et al., 2002; Alvarez-Nunez et al., 2003; Matakidou et al., 2004; Tomer y Greenberg, 2004). Ciertas variantes de *TG* se han asociado con enfermedades autoinmunes incluyendo la enfermedad de Graves y la tiroiditis de Hashimoto (Tomer et al., 2002). También, se ha observado que el cáncer de tiroides es más frecuente en la tiroiditis de Hashimoto (Di Pasquale et al., 2001). Otras enfermedades benignas del tiroides como: el bocio familiar, el hipotiroidismo y otros tipos de bocio se han asociado con el *TG* (OMIM # 188450). Asimismo, el análisis conjunto de varios estudios indica que las personas con adenomas y nódulos benignos del tiroides, tienen mayor riesgo de malignización celular, con valores de ORs asociados altos (OR = 29,9, 95% IC: 14,5–62,0) (Franceschi et al., 1999; Hishinuma et al., 1999; Preston-Martin et al., 2003).

Por otro lado, la cuantificación de los niveles plasmáticos de *TG* tiene reconocido valor predictivo del desarrollo tumoral, sugiriéndose la posibilidad de una relación causal (Hrafinkelsson et al., 2000; Matakidou et al., 2004).

A pesar de la importancia de la *TG* en la función tiroidea, los estudios de asociación del gen *TG* con el cáncer de tiroides son muy escasos. En la literatura sólo hallamos un estudio que describe la asociación de la variante Gln2511Arg de *TG* con la susceptibilidad a desarrollar cáncer tiroideo (Matakidou et al., 2004). No se conoce el mecanismo por el cual esta variante confiere la susceptibilidad, pero se sabe que esta variante localizada en la región C terminal de *TG*, es importante para la secreción normal de *TG* (Park y Arvan, 2004). En el presente trabajo hemos analizado tres SNPs comunes del gen *TG* que introducen un cambio de sentido en los aminoácidos de la proteína. Estos polimorfismos fueron previamente asociados con la enfermedad tiroidea autoinmune (Ban et al., 2003). Dos de los tres SNPs estudiados están en el grupo de exones 10-12 mientras que otro SNP en el exón 33, perteneciendo a dos bloques de ligamiento diferentes. Mientras el SNP rs2076740 (exón 33) no mostró asociación con el cáncer de tiroides, las frecuencias genotípicas de los SNPs del grupo de exones 10-

12 fueron estadísticamente diferentes respecto a la población control ( $P= 0,0014$ ), lo que indica que *TG* es un gen de susceptibilidad para cáncer de tiroides.

El análisis de haplotipos combinando los dos SNPs de riesgo, rs180223 y rs853326 (exones 10-12) mostró que la estimación de riesgo para el haplotipo formado por los alelos variantes de los dos polimorfismos era similar a la OR calculada de forma individual para cada polimorfismo. Así, cualquiera de estos *loci* podría ser responsable de la susceptibilidad al cáncer de tiroides, aunque no tenemos datos suficientes para averiguar cuál de ellos es el locus de susceptibilidad. Alternativamente, ninguno de estos polimorfismos puede ser directamente responsable de la susceptibilidad y existe un tercer *locus* de susceptibilidad, que está incluido en un haplotipo de riesgo dentro del gen *TG*, donde los rs180223 y rs853326 hacen de marcadores de riesgo en *TG* para el cáncer de tiroides.

Estos dos polimorfismos se encuentran en el grupo de exones 10-12 que forman parte del dominio responsable de la unión de TG a la membrana (Mendive et al., 2001). Así, nuestros resultados junto con resultados descritos por Matakidou et al. (2004) donde se muestra la asociación de la región C terminal del gen *TG* con el cáncer de tiroides, indican que el gen *TG* es un factor de riesgo para este tipo de cáncer y sugieren que variantes que afectan al dominio de unión de TG a la membrana y variantes en el dominio de secreción de *TG* pueden ser causas determinantes del riesgo de cáncer de tiroides. La alteración de la función de TG puede desencadenar una sucesión de efectos en la función del tiroides ya que TG actúa como regulador negativo suprimiendo la expresión de *NKX2-1*, *FOXE1* y *PAX8* y por consiguiente bajando la expresión de los genes *TPO*, *NIS* y *TSHR*.

Los tres polimorfismos de *TG* genotipados en este trabajo han mostrado asociación con las enfermedades autoinmunes (Ban et al., 2003), aunque en la población japonesa analizada en el mencionado estudio el SNP del exón 33 no mostró asociación, lo cual concuerda con nuestros resultados. En un estudio previo, el análisis de ligamiento en 26 familias con PTC se identificó un locus de susceptibilidad en la localización de los genes *TG* y *SLA*, donde *SLA* ocupa una región intrónica de *TG* (He et al., 2009).

Además del papel de *TG* en la función tiroidea actuando en la señalización transcripcional, *TG* es el sustrato para la biosíntesis de las hormonas tiroidea, las cuales actúan en los tejidos diana mediante su interacción con los receptores de las hormonas tiroideas (*THRA* y *THRB*). Por lo tanto, en este estudio analizamos la posible

interacción de las variantes genéticas de *TG* con variantes genéticas de los genes *THRA* y *THRB* en la susceptibilidad al cáncer de tiroides en nuestra población de estudio. La región de los exones 10-12 del gen *TG* no mostró interacción con ninguno de los polimorfismos de *THRA* o *THRB*. De la misma forma, el SNP del exón 33 de *TG* tampoco mostró interacción con *THRA*. A pesar de esta falta de interacción, hay que indicar que el genotipado de polimorfismos en *THRA* (datos obtenidos en el grupo) sí que mostró asociación de *THRA* con el cáncer de tiroides; sin embargo, las variantes de asociación de *THRA* son independientes de la asociación encontrada con *TG* al cáncer de tiroides. Por otro lado, la variante genética del exón 33 del gen *TG* analizada mostró interacción con dos de los tres polimorfismos de *THRB* estudiados. En este caso, ni el SNP del exón 33 de *TG*, ni los polimorfismos de *THRB* mostraron asociación con el cáncer de tiroides de forma individual, aunque observamos que la combinación de ciertas variantes genéticas en ambos genes puede contribuir al riesgo de cáncer de tiroides. En resumen, consideramos que los resultados presentados en esta tesis, nos ayudan a entender un poco mejor la base genética subyacente a la mayor incidencia del cáncer de tiroides en individuos con un determinado fondo genético.





## **Conclusiones**



---

## 6 CONCLUSIONES

---

A partir de los resultados presentados y de la discusión de los mismos, se derivan las siguientes conclusiones:

1. En los individuos analizados, no existe una variación de secuencia en el promotor y la región codificadora del gen *WDR3*, lo que sugiere que es un gen fundamental y conservado.
2. En nuestra población, la distribución de las frecuencias genotípicas de los 10 SNPs del gen *WDR3* genotipados, mostró que ninguno de estos polimorfismos analizados individualmente está asociado al cáncer de tiroides.
3. El análisis de haplotipos formados por la combinación de los 10 SNPs del gen *WDR3*, revela un haplotipo asociado con el cáncer de tiroides ( $P= 0,06$ ). Esta asociación se confirma al incrementar el tamaño de la muestra.
4. La distribución de haplotipos del gen *WDR3*, en los pacientes de cáncer de tiroides estudiados, depende de la edad de diagnóstico,  $\leq 45$  años o  $>45$  años ( $P= 0,019$ ).
5. El gen *WDR3* muestra una expresión alterada en líneas celulares humanas de cáncer de tiroides, que no depende de la metilación del promotor, lo que sugiere la implicación de *WDR3* en la tumorigénesis del tiroides.
6. Los polimorfismos rs1447295 y rs6983267 en el cromosoma 8q que mostraron asociación con diversos tipos de cáncer en otros estudios, no presentan asociación al cáncer de tiroides en nuestra población.
7. Ninguno de los polimorfismos genotipados del gen *TRHR*, rs4129682 y rs7823804, mostró asociación con el cáncer de tiroides en nuestra población de estudio.
8. En nuestra población, dos de los tres polimorfismos genotipados del gen *TG* mostraron asociación con el cáncer de tiroides. Estos dos polimorfismos, rs180223 y rs853326, están en desequilibrio de ligamiento y definen un haplotipo de riesgo en el gen *TG* que comprende los exones 10-12.
9. La asociación del gen *TG* con el cáncer de tiroides no está relacionada con la edad de diagnóstico, sexo o tipo de cáncer de tiroides.

10. En la población estudiada, y a partir de los resultados de genotipado del grupo, se observa una interacción del gen *TG* y el gen *THRB* en la susceptibilidad al cáncer de tiroides ( $P= 0,049$ ). Sin embargo, los genes *TG* y *THRA* no mostraron interacción en la evaluación del riesgo al cáncer de tiroides, aunque ambos genes son factores de riesgo al cáncer de tiroides.



# **Bibliografía**



---

## 7 BIBLIOGRAFÍA

---

- Abelson, J.F., Kwan, K.Y., O'Roak, B.J., Baek, D.Y., Stillman, A.A., Morgan, T.M., Mathews, C.A., Pauls, D.L., Rasin, M.R., Gunel, M., Davis, N.R., Ercan-Sencicek, A.G., Guez, D.H., Spertus, J.A., Leckman, J.F., Dure, L.S.t., Kurlan, R., Singer, H.S., Gilbert, D.L., Farhi, A., Louvi, A., Lifton, R.P., Sestan, N., State, M.W., 2005. Sequence variants in *SLITRK1* are associated with Tourette's syndrome. *Science* 310, 317-320.
- Adjadj, E., Schlumberger, M., de Vathaire, F., 2009. Germ-line DNA polymorphisms and susceptibility to differentiated thyroid cancer. *Lancet Oncol* 10, 181-90.
- Adeniran, A.J., Zhu, Z., Gandhi, M., Steward, D.L., Fidler, J.P., Giordano, T.J., Biddinger, P.W., Nikiforov, Y.E., 2006. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 30, 216-222.
- Al-Brahim, N., Asa, S.L., 2006. Papillary thyroid carcinoma: an overview. *Arch Pathol Lab Med* 130, 1057-1062.
- Álvarez-Nuñez, F., Mora, J., Matias-Guiu, X., 2003. Thyroid carcinomas of the follicular epithelium: tumor markers and oncogenes. *Med Clin (Barc)* 121, 264-269.
- Amundadottir, L.T., Sulem, P., Gudmundsson, J., Helgason, A., Baker, A., et al., 2006. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet* 38, 652-658.
- Asakawa, H., Kobayashi, T., 2002. Multistep carcinogenesis in anaplastic thyroid carcinoma: a case report. *Pathology* 34, 94-97.
- Baida, A., Akdi, M., González-Flores, E., Galofré, P., Marcos, R., Velázquez, A., 2008. Strong association of chromosome 1p12 loci with thyroid cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 1499-1504.
- Baida, A., Farrington, S.M., Galofré, P., Marcos, R., Velázquez, A., 2005. Thyroid cancer susceptibility and *THRA1* and *BAT-40* repeats polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 638-642.
- Ban, Y., Greenberg, D.A., Concepcion, E., Skrabanek, L., Villanueva, R., Tomer, Y., 2003. Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with

- susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15119-15124.
- Ban, Y., Tozaki, T., Taniyama, M., Tomita, M., 2004. Association of a thyroglobulin gene polymorphism with Hashimoto's thyroiditis in the Japanese population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61, 263-268.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263-265.
- Basolo, F., Giannini, R., Faviana, P., Fontanini, G., Patricelli Malizia, A., Ugolini, C., Elisei, R., Miccoli, P., Toniolo, A., 2004. Thyroid papillary carcinoma: preliminary evidence for a germ-line single nucleotide polymorphism in the Fas gene. *J Endocrinol* 182, 479-484.
- Basolo, F., Pisaturo, F., Pollina, L.E., Fontanini, G., Elisei, R., Molinaro, E., Iacconi, P., Miccoli, P., Pacini, F., 2000. N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid* 10, 19-23.
- Baylin, S.B., Ohm, J.E., 2006. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6, 107-116.
- Begum, S., Rosenbaum, E., Henrique, R., Cohen, Y., Sidransky, D., Westra, W.H., 2004. BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment. *Mod Pathol* 17, 1359-1363.
- Benhamou, S., Lee, W.J., Alexandrie, A.K., Boffetta, P., Bouchardy, C., et al., 2002. Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis* 23, 1343-1350.
- Beohar, N., Kawamoto, S., 1998. Transcriptional regulation of the human nonmuscle myosin II heavy chain-A gene. Identification of three clustered cis-elements in intron-1 which modulate transcription in a cell type- and differentiation state-dependent manner. *J Biol Chem* 273, 9168-9178.
- Bertherat, J., Horvath, A., Groussin, L., Grabar, S., Boikos, S., Cazabat, L., Libe, R., Rene-Corail, F., Stergiopoulos, S., Bourdeau, I., Bei, T., Clauser, E., Calender, A., Kirschner, L.S., Bertagna, X., Carney, J.A., Stratakis, C.A., 2009. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in



- 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 2085-2091.
- Bestor, T.H., 1998. Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* 393, 311-312.
- Bianco, A.C., Larsen, P.R., 2005. Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid* 15, 777-786.
- Bieche, I., Champeme, M.H., Matifas, F., Cropp, C., Callahan, R., Lidereau, R., 1994. Demonstration of two regions involved in chromosome 1p deletion in breast tumors. *Bull Cancer* 81, 108-113.
- Bilimoria, K.Y., Bentrem, D.J., Ko, C.Y., Stewart, A.K., Winchester, D.P., Talamonti, M.S., Sturgeon, C., 2007. Extent of surgery affects survival for papillary thyroid cancer. *Ann Surg* 246, 375-381.
- Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.
- Blanco Carrera, C., Peláez Torres, N., García-Díaz, J.D., Maqueda Villaizan, E., Sanz J.M., Alvarez Hernández, J., 2005. Epidemiological and clinicopathological study of thyroid cancer in east Madrid. *Rev Clin Esp.* 205, 307-310.
- Bongarzone, I., Butti, M.G., Coronelli, S., Borrello, M.G., Santoro, M., Mondellini, P., Pilotti, S., Fusco, A., Della Porta, G., Pierotti, M.A., 1994. Frequent activation of ret protooncogene by fusion with a new activating gene in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res* 54, 2979-2985.
- Bongarzone, I., Vigneri, P., Mariani, L., Collini, P., Pilotti, S., Pierotti, M.A., 1998. RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 4, 223-228.
- Bonomi, M., Busnelli, M., Beck-Peccoz, P., Costanzo, D., Antonica, F., Dolci, C., Pilotta, A., Buzi, F., Persani, L., 2009. A family with complete resistance to thyrotropin-releasing hormone. *N Engl J Med* 360, 731-734.
- Bosetti, C., Negri, E., Kolonel, L., Ron, E., Franceschi, S., Preston-Martin, S., McTiernan, A., Dal Maso, L., Mark, S.D., Mabuchi, K., Land, C., Jin, F., Wingren, G., Galanti, M.R., Hallquist, A., Glatte, E., Lund, E., Levi, F., Linos, D., La Vecchia, C., 2002. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. VII. Cruciferous and other vegetables (International). *Cancer Causes Control* 13, 765-775.

- Botstein, D., Risch, N., 2003. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 33 Suppl, 228-237.
- Boyd, L.A., Earnhardt, R.C., Dunn, J.T., Frierson, H.F., Hanks, J.B., 1998. Preoperative evaluation and predictive value of fine-needle aspiration and frozen section of thyroid nodules. *J Am Coll Surg* 187, 494-502.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bronner, C.E., Baker, S.M., Morrison, P.T., Warren, G., Smith, L.G., Lescoe, M.K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A., et al., 1994. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368, 258-261.
- Bufalo, N.E., Leite, J.L., Guilhen, A.C., Morari, E.C., Granja, F., Assumpcao, L.V., Ward, L.S., 2006. Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants. *Endocr Relat Cancer* 13, 1185-1193.
- Bunone, G., Vigneri, P., Mariani, L., Buto, S., Collini, P., Pilotti, S., Pierotti, M.A., Bongarzone, I., 1999. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol* 155, 1967-1976.
- Cadioux, B., Ching, T.T., VandenBerg, S.R., Costello, J.F., 2006. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res* 66, 8469-8476.
- Canbay, E., Dokmetas, S., Canbay, E.I., Sen, M., Bardakci, F., 2003. Higher glutathione transferase GSTM1 0/0 genotype frequency in young thyroid carcinoma patients. *Curr Med Res Opin* 19, 102-106.
- Cardon, L.R., Bell, J.I., 2001. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2, 91-99.
- Carlson, C.S., Eberle, M.A., Kruglyak, L., Nickerson, D.A., 2004. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature* 429, 446-452.
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

- Caron, P., Moya, C.M., Malet, D., Gutnisky, V.J., Chabardes, B., Rivolta, C.M., Targovnik, H.M., 2003. Compound heterozygous mutations in the thyroglobulin gene (1143delC and 6725G-->A [R2223H]) resulting in fetal goitrous hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3546-3553.
- Carpí, A., Di Coscio, G., Iervasi, G., Antonelli, A., Mechanick, J., Sciacchitano, S., Nicolini, A., 2008. Thyroid fine needle aspiration: how to improve clinicians' confidence and performance with the technique. *Cancer Lett* 264, 163-171.
- Casey, M., Vaughan, C.J., He, J., Hatcher, C.J., Winter, J.M., Weremowicz, S., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Morton, C.C., Basson, C.T., 2000. Mutations in the protein kinase A R1alpha regulatory subunit cause familial cardiac myxomas and Carney complex. *J Clin Invest* 106, R31-38.
- Castro, M.R., Gharib, H., 2000. Thyroid nodules and cancer. When to wait and watch, when to refer. *Postgrad Med* 107, 113-116, 119-120, 123-114.
- Castro, P., Rebocho, A.P., Soares, R.J., Magalhaes, J., Roque, L., Trovisco, V., Vieira de Castro, I., Cardoso-de-Oliveira, M., Fonseca, E., Soares, P., Sobrinho-Simoes, M., 2006. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 213-220.
- Ciampi, R., Giordano, T.J., Wikenheiser-Brokamp, K., Koenig, R.J., Nikiforov, Y.E., 2007. HOOK3-RET: a novel type of RET/PTC rearrangement in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 14, 445-452.
- Ciampi, R., Knauf, J.A., Kerler, R., Gandhi, M., Zhu, Z., Nikiforova, M.N., Rabes, H.M., Fagin, J.A., Nikiforov, Y.E., 2005. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* 115, 94-101.
- Claudio, J.O., Liew, C.C., Ma, J., Heng, H.H., Stewart, A.K., Hawley, R.G., 1999. Cloning and expression analysis of a novel WD repeat gene, WDR3, mapping to 1p12-p13. *Genomics* 59, 85-89.
- Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordo, X., Bibe, B., Bouix, J., Caiment, F., Elsen, J.M., Eyche, F., Larzul, C., Laville, E., Meish, F., Milenkovic, D., Tobin, J., Charlier, C., Georges, M., 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet* 38, 813-818.

- Coburn, M.C., Wanebo, H.J., 1992. Prognostic factors and management considerations in patients with cervical metastases of thyroid cancer. *Am J Surg* 164, 671-676.
- Cohen, J.I., Salter, K.D., 2008. Thyroid disorders: evaluation and management of thyroid nodules. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 20, 431-443.
- Cohen, Y., Xing, M., Mambo, E., Guo, Z., Wu, G., Trink, B., Beller, U., Westra, W.H., Ladenson, P.W., Sidransky, D., 2003. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95, 625-627.
- Collu, R., Tang, J., Castagne, J., Lagace, G., Masson, N., Huot, C., Deal, C., Delvin, E., Faccenda, E., Eidne, K.A., Van Vliet, G., 1997. A novel mechanism for isolated central hypothyroidism: inactivating mutations in the thyrotropin-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 1561-1565.
- Cooper, D.S., Doherty, G.M., Haugen, B.R., Kloos, R.T., Lee, S.L., Mandel, S.J., Mazzaferri, E.L., McIver, B., Sherman, S.I., Tuttle, R.M., 2006. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 16, 109-142.
- Corral, J., Martin, C., Perez, R., Sanchez, I., Mories, M.T., San Millan, J.L., Miralles, J.M., Gonzalez-Sarmiento, R., 1993. Thyroglobulin gene point mutation associated with non-endemic simple goitre. *Lancet* 341, 462-464.
- Cui, H., Onyango, P., Brandenburg, S., Wu, Y., Hsieh, C.L., Feinberg, A.P., 2002. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res* 62, 6442-6446.
- Cybulski, C., Gorski, B., Huzarski, T., Masojc, B., Mierzejewski, M., et al., 2004. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 75, 1131-1135.
- Chen, Y.T., Kitabayashi, N., Zhou, X.K., Fahey, T.J., 3rd, Scognamiglio, T., 2008. MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 21, 1139-1146.
- Cher, M.L., Bova, G.S., Moore, D.H., Small, E.J., Carroll, P.R., Pin, S.S., Epstein, J.I., Isaacs, W.B., Jensen, R.H., 1996. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res* 56, 3091-3102.
- Chiang, F.Y., Wu, C.W., Hsiao, P.J., Kuo, W.R., Lee, K.W., Lin, J.C., Liao, Y.C., Juo, S.H., 2008. Association between polymorphisms in DNA base excision repair

- genes XRCC1, APE1, and ADPRT and differentiated thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 14, 5919-5924.
- Chiosea, S., Nikiforova, M., Zuo, H., Ogilvie, J., Gandhi, M., Seethala, R.R., Otori, N.P., Nikiforov, Y., 2009. A novel complex BRAF mutation detected in a solid variant of papillary thyroid carcinoma. *Endocr Pathol* 20, 122-126.
- Darcy, K.M., Brady, W.E., Blancato, J.K., Dickson, R.B., Hoskins, W.J., McGuire, W.P., Birrer, M.J., 2009. Prognostic relevance of c-MYC gene amplification and polysomy for chromosome 8 in suboptimally-resected, advanced stage epithelial ovarian cancers: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 114, 472-479.
- de Groot, J.W., Links, T.P., Plukker, J.T., Lips, C.J., Hofstra, R.M., 2006. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev* 27, 535-560.
- Debniak, T., Scott, R.J., Huzarski, T., Byrski, T., Rozmiarek, A., et al., 2006. CDKN2A common variant and multi-organ cancer risk--a population-based study. *Int J Cancer* 118, 3180-3182.
- Delbridge, L., 2006. Solitary thyroid nodule: current management. *ANZ J Surg* 76, 381-386.
- Dermitzakis, E.T., Reymond, A., Antonarakis, S.E., 2005. Conserved non-genic sequences - an unexpected feature of mammalian genomes. *Nat Rev Genet* 6, 151-157.
- Di Pasquale, M., Rothstein, J.L., Palazzo, J.P., 2001. Pathologic features of Hashimoto's-associated papillary thyroid carcinomas. *Hum Pathol* 32, 24-30.
- Diez, O., Osorio, A., Duran, M., Martinez-Ferrandis, J.I., de la Hoya, M., et al., 2003. Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat* 22, 301-312.
- Dimova, I., Raicheva, S., Dimitrov, R., Doganov, N., Toncheva, D., 2009. Coexistence of copy number increases of c-Myc, ZNF217, CCND1, ErbB1 and ErbB2 in ovarian cancers. *Onkologie* 32, 405-410.
- Drake, J.A., Bird, C., Nemesh, J., Thomas, D.J., Newton-Cheh, C., Reymond, A., Excoffier, L., Attar, H., Antonarakis, S.E., Dermitzakis, E.T., Hirschhorn, J.N., 2006. Conserved noncoding sequences are selectively constrained and not mutation cold spots. *Nat Genet* 38, 223-227.

- Dumont, P., Leu, J.I., Della Pietra, A.C., 3rd, George, D.L., Murphy, M., 2003. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33, 357-365.
- Duntas, L., Grab-Duntas, B.M., 2006. Risk and prognostic factors for differentiated thyroid cancer. *Hell J Nucl Med* 9, 156-162.
- Dwight, T., Thoppe, S.R., Foukakis, T., Lui, W.O., Wallin, G., Hoog, A., Frisk, T., Larsson, C., Zedenius, J., 2003. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4440-4445.
- Easton, D.F., Pooley, K.A., Dunning, A.M., Pharoah, P.D., Thompson, D., et al., 2007. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447, 1087-1093.
- Eng, P.H., Cardona, G.R., Fang, S.L., Previti, M., Alex, S., Carrasco, N., Chin, W.W., Braverman, L.E., 1999. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 140, 3404-3410.
- Erdogan, M., Karadeniz, M., Berdeli, A., Tamsel, S., Ertan, Y., Uluer, H., Yilmaz, C., Tuzun, M., Kabalak, T., Ozgen, A.G., 2007. Fas/Fas ligand gene polymorphism in patients with papillary thyroid cancer in the Turkish population. *J Endocrinol Invest* 30, 411-416.
- Esapa, C.T., Johnson, S.J., Kendall-Taylor, P., Lennard, T.W., Harris, P.E., 1999. Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50, 529-535.
- Estour B., Van Herle A.J., Juillard G.J., Totanes T.L., Sparkes R.S., Giuliano A.E., Klandorf H., 1989. Characterization of a human follicular thyroid carcinoma cell line (UCLA RO 82 W-1). *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology* 57, 167-174.
- Ezzat, S., Zheng, L., Kolenda, J., Safarian, A., Freeman, J.L., Asa, S.L., 1996. Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules. *Thyroid* 6, 409-416.
- Fabien N., Fusco A., Santoro M., Barbier Y., Dubois P.M., Paulin C., 1994. Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers. *Cancer* 73, 2206-2212.

- Feinberg, A.P., Ohlsson, R., Henikoff, S., 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 7, 21-33.
- Feld, L.G., Lieberman, E., Mendoza, S.A., Springate, J.E., 1996. Management of hypertension in the child with chronic renal disease. *J Pediatr* 129, s18-26.
- Fenton, C.L., Lukes, Y., Nicholson, D., Dinauer, C.A., Francis, G.L., Tuttle, R.M., 2000. The *ret*/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 1170-1175.
- Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M., Kolodner, R., 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027-1038.
- Franceschi, S., Preston-Martin, S., Dal Maso, L., Negri, E., La Vecchia, C., Mack, W.J., McTiernan, A., Kolonel, L., Mark, S.D., Mabuchi, K., Jin, F., Wingren, G., Galanti, R., Hallquist, A., Glatte, E., Lund, E., Levi, F., Linos, D., Ron, E., 1999. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. IV. Benign thyroid diseases. *Cancer Causes Control* 10, 583-595.
- Frates, M.C., Benson, C.B., Charboneau, J.W., Cibas, E.S., Clark, O.H., et al., 2005. Management of thyroid nodules detected at US: Society of Radiologists in Ultrasound consensus conference statement. *Radiology* 237, 794-800.
- Frattini, M., Ferrario, C., Bressan, P., Balestra, D., De Cecco, L., Mondellini, P., Bongarzone, I., Collini, P., Gariboldi, M., Pilotti, S., Pierotti, M.A., Greco, A., 2004. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* 23, 7436-7440.
- Freedman, M.L., Haiman, C.A., Patterson, N., McDonald, G.J., Tandon, A., Waliszewska, A., Penney, K., Steen, R.G., Ardlie, K., John, E.M., Oakley-Girvan, I., Whittemore, A.S., Cooney, K.A., Ingles, S.A., Altshuler, D., Henderson, B.E., Reich, D., 2006. Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14068-14073.
- Galang, C.K., Hauser, C.A., 1992. Cooperative DNA binding of the highly conserved human Hox 2.1 homeodomain gene product. *New Biol* 4, 558-568.

- Garinis, G.A., Patrinos, G.P., Spanakis, N.E., Menounos, P.G., 2002. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet* 111, 115-127.
- Gaspar, J., Rodrigues, S., Gil, O.M., Manita, I., Ferreira, T.C., Limbert, E., Goncalves, L., Pina, J.E., Rueff, J., 2004. Combined effects of glutathione S-transferase polymorphisms and thyroid cancer risk. *Cancer Genet Cytogenet* 151, 60-67.
- Gey G.O., Coffman W.D., Kubicek M.T., 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* 12, 264-265.
- Gharib, H., Goellner, J.R., 1993. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med* 118, 282-289.
- Gioanni J., Zanghellini E., Mazeau C., Zhang D., Courdi A., Farges M., Lambert J.C., Duplay H., Schneider M., 1991. Characterization of a human cell line from an anaplastic carcinoma of the thyroid gland. *Bulletin Cancer* 78, 1053-1062.
- Giuffrida, D., Ferrau, F., Bordonaro, R., Mattina, M., Priolo, D., Aiello, R.A., Cordio, S., Motta, S., Failla, G., 2000. Medullary carcinoma of the thyroid: diagnosis and therapy. *Clin Ter* 151, 29-35.
- Giusti, F., Falchetti, A., Franceschelli, F., Marini, F., Tanini, A., Brandi, M.L., 2010. Thyroid cancer: current molecular perspectives. *J Oncol* 351679.
- Granja, F., Morari, E.C., Assumpcao, L.V., Ward, L.S., 2005. GSTO polymorphism analysis in thyroid nodules suggest that GSTO1 variants do not influence the risk for malignancy. *Eur J Cancer Prev* 14, 277-280.
- Granja, F., Morari, J., Morari, E.C., Correa, L.A., Assumpcao, L.V., Ward, L.S., 2004a. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett* 210, 151-157.
- Granja, F., Morari, J., Morari, E.C., Correa, L.A., Assumpcao, L.V., Ward, L.S., 2004b. GST profiling may be useful in the screening for thyroid nodule malignancy. *Cancer Lett* 209, 129-137.
- Grebe, S.K., Hay, I.D., 1995. Follicular thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 24, 761-801.
- Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M.T., Melillo, R.M., Donghi, R., Bongarzone, I., Pierotti, M.A., Della Porta, G., Fusco, A., Vecchio, G., 1990. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60, 557-563.



- Gudmundsson, J., Sulem, P., Gudbjartsson, D.F., Jonasson, J.G., Sigurdsson, A., et al., 2009. Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet* 41, 460-464.
- Gulcelik, M.A., Gulcelik, N.E., Kuru, B., Camlibel, M., Alagol, H., 2007. Prognostic factors determining survival in differentiated thyroid cancer. *J Surg Oncol* 96, 598-604.
- Hall, J.M., Lee, M.K., Newman, B., Morrow, J.E., Anderson, L.A., Huey, B., King, M.C., 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250, 1684-1689.
- Hara, H., Fulton, N., Yashiro, T., Ito, K., DeGroot, L.J., Kaplan, E.L., 1994. N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 116, 1010-1016.
- Harach, H.R., Escalante, D.A., Day, E.S., 2002. Thyroid cancer and thyroiditis in Salta, Argentina: a 40-yr study in relation to iodine prophylaxis. *Endocr Pathol* 13, 175-181.
- Harach, H.R., Williams, G.T., Williams, E.D., 1994. Familial adenomatous polyposis associated thyroid carcinoma: a distinct type of follicular cell neoplasm. *Histopathology* 25, 549-561.
- Haselkorn, T., Stewart, S.L., Horn-Ross, P.L., 2003. Why are thyroid cancer rates so high in southeast Asian women living in the United States? The Bay Area thyroid cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, 144-150.
- He, H., Jazdzewski, K., Li, W., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Franssila, K., Suster, S., Kloos, R.T., Croce, C.M., de la Chapelle, A., 2005. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19075-19080.
- He, H., Nagy, R., Liyanarachchi, S., Jiao, H., Li, W., Suster, S., Kere, J., de la Chapelle, A., 2009. A susceptibility locus for papillary thyroid carcinoma on chromosome 8q24. *Cancer Res* 69, 625-631.
- Hegedus, L., 2004. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med* 351, 1764-1771.
- Herman, J.G., Baylin, S.B., 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349, 2042-2054.

- Hernández, A., Céspedes, W., Xamena, N., Surrallés, J., Creus, A., Galofré, P., Marcos, R., 2003. Glutathione S-transferase polymorphisms in thyroid cancer patients. *Cancer Lett* 190, 37-44.
- Hirschhorn, J.N., Daly, M.J., 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 6, 95-108.
- Hishinuma, A., Takamatsu, J., Ohyama, Y., Yokozawa, T., Kanno, Y., Kuma, K., Yoshida, S., Matsuura, N., Ieiri, T., 1999. Two novel cysteine substitutions (C1263R and C1995S) of thyroglobulin cause a defect in intracellular transport of thyroglobulin in patients with congenital goiter and the variant type of adenomatous goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1438-1444.
- Ho, T., Li, G., Lu, J., Zhao, C., Wei, Q., Sturgis, E.M., 2009. Association of XRCC1 polymorphisms and risk of differentiated thyroid carcinoma: a case-control analysis. *Thyroid* 19, 129-135.
- Ho, T., Li, G., Zhao, C., Zheng, R., Wei, Q., Sturgis, E.M., 2008. Fas single nucleotide polymorphisms and risk of thyroid and salivary gland carcinomas: a case-control analysis. *Head Neck* 30, 297-305.
- Ho, T., Zhao, C., Zheng, R., Liu, Z., Wei, Q., Sturgis, E.M., 2006. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of differentiated thyroid carcinomas: a case-control analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132, 756-761.
- Holland, E.A., Schmid, H., Kefford, R.F., Mann, G.J., 1999. CDKN2A (P16(INK4a)) and CDK4 mutation analysis in 131 Australian melanoma probands: effect of family history and multiple primary melanomas. *Genes Chromosomes Cancer* 25, 339-348.
- Honore, B., Baandrup, U., Nielsen, S., Vorum, H., 2002. Endonuclein is a cell cycle regulated WD-repeat protein that is up-regulated in adenocarcinoma of the pancreas. *Oncogene* 21, 1123-1129.
- Houlston, R.S., Peto, J., 2004. The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene* 23, 6471-6476.
- Hrafinkelsson, J., Tulinius, H., Kjeld, M., Sigvaldason, H., Jonasson, J.G., 2000. Serum thyroglobulin as a risk factor for thyroid carcinoma. *Acta Oncol* 39, 973-977.
- Hsiao, P.J., Lu, M.Y., Chiang, F.Y., Shin, S.J., Tai, Y.D., Juo, S.H., 2007. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in thyroid cancer. *J Endocrinol* 195, 265-270.

- Ieiri, T., Cochaux, P., Targovnik, H.M., Suzuki, M., Shimoda, S., Perret, J., Vassart, G., 1991. A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism. *J Clin Invest* 88, 1901-1905.
- Inskip, P.D., 2001. Thyroid cancer after radiotherapy for childhood cancer. *Med Pediatr Oncol* 36, 568-573.
- Israel, A., Sharan, R., Ruppin, E., Galun, E., 2009. Increased microRNA activity in human cancers. *PLoS One* 4, e6045.
- Issa, J.P., Ottaviano, Y.L., Celano, P., Hamilton, S.R., Davidson, N.E., Baylin, S.B., 1994. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 7, 536-540.
- Ito T., Seyama T., Mizuno T., Tsuyama N., Hayashi T., Hayashi Y., Dohi K., Nakamura N., Akiyama M., 1992. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Research* 52, 1369–1371.
- Iwase, K., 2007. Outline of general rules for the description of thyroid cancer (6th edition). *Nippon Rinsho* 65, 1943-1951.
- Jansen, J., Friesema E.C., Milici. C., Visser T.J., 2005. Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid* 15, 757–768.
- Jazdzewski, K., Liyanarachchi, S., Swierniak, M., Pachucki, J., Ringel, M.D., Jarzab, B., de la Chapelle, A., 2009. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1502-1505.
- Jazdzewski, K., Murray, E.L., Franssila, K., Jarzab, B., Schoenberg, D.R., de la Chapelle, A., 2008. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7269-7274.
- Ji, W., Hernandez, R., Zhang, X.Y., Qu, G.Z., Frady, A., Varela, M., Ehrlich, M., 1997. DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. *Mutat Res* 379, 33-41.
- Jin, Y., Jin, C., Wennerberg, J., Mertens, F., Hoglund, M., 1998. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization characterization of chromosome 1 rearrangements in head and neck carcinomas delineate a target region for deletions within 1p11-1p13. *Cancer Res* 58, 5859-5865.

- Jones, P.A., Baylin, S.B., 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- Jones, P.A., Baylin, S.B., 2007. The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683-692.
- Jones, P.A., Laird, P.W., 1999. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21, 163-167.
- Karga, H., Lee, J.K., Vickery, A.L., Jr., Thor, A., Gaz, R.D., Jameson, J.L., 1991. Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 73, 832-836.
- Kawabata, W., Suzuki, T., Moriya, T., Fujimori, K., Naganuma, H., Inoue, S., Kinouchi, Y., Kameyama, K., Takami, H., Shimosegawa, T., Sasano, H., 2003. Estrogen receptors (alpha and beta) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 in thyroid disorders: possible in situ estrogen synthesis and actions. *Mod Pathol* 16, 437-444.
- Kawada, N., Moriyama, T., Ando, A., Koyama, T., Hori, M., Miwa, T., Imai, E., 1999. Role of intron 1 in smooth muscle alpha-actin transcriptional regulation in activated mesangial cells in vivo. *Kidney Int* 55, 2338-2348.
- Kazakov, V.S., Demidchik, E.P., Astakhova, L.N., 1992. Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 359, 21.
- Kimura, E.T., Nikiforova, M.N., Zhu, Z., Knauf, J.A., Nikiforov, Y.E., Fagin, J.A., 2003. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63, 1454-1457.
- Kirschner, L.S., Sandrini, F., Monbo, J., Lin, J.P., Carney, J.A., Stratakis, C.A., 2000. Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex. *Hum Mol Genet* 9, 3037-3046.
- Kitamura, Y., Shimizu, K., Tanaka, S., Ito, K., Emi, M., 2000. Allelotyping of anaplastic thyroid carcinoma: frequent allelic losses on 1q, 9p, 11, 17, 19p, and 22q. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 244-251.
- Knauf, J.A., Ma, X., Smith, E.P., Zhang, L., Mitsutake, N., Liao, X.H., Refetoff, S., Nikiforov, Y.E., Fagin, J.A., 2005. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res* 65, 4238-4245.
- Ko, H.M., Jhu, I.K., Yang, S.H., Lee, J.H., Nam, J.H., Juhng, S.W., Choi, C., 2003. Clinicopathologic analysis of fine needle aspiration cytology of the thyroid. A

- review of 1,613 cases and correlation with histopathologic diagnoses. *Acta Cytol* 47, 727-732.
- Komiya, K., Sueoka-Aragane, N., Sato, A., Hisatomi, T., Sakuragi, T., Mitsuoka, M., Sato, T., Hayashi, S., Izumi, H., Tsuneoka, M., Sueoka, E., 2010. Mina53, a novel c-Myc target gene, is frequently expressed in lung cancers and exerts oncogenic property in NIH/3T3 cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 136, 465-473.
- Kondo, T., Ezzat, S., Asa, S.L., 2006. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 6, 292-306.
- Kratzsch, J., Pulzer, F., 2008. Thyroid gland development and defects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22, 57-75.
- Landa, I., Ruiz-Llorente, S., Montero-Conde, C., Inglada-Perez, L., Schiavi, F., et al., 2009. The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS Genet* 5, e1000637.
- Layfield, L.J., 2007. Fine-needle aspiration in the diagnosis of head and neck lesions: a review and discussion of problems in differential diagnosis. *Diagn Cytopathol* 35, 798-805.
- Lee, M.L., Chen, G.G., Vlantis, A.C., Tse, G.M., Leung, B.C., van Hasselt, C.A., 2005. Induction of thyroid papillary carcinoma cell proliferation by estrogen is associated with an altered expression of Bcl-xL. *Cancer J* 11, 113-121.
- Lemoine, N.R., Mayall, E.S., Wyllie, F.S., Farr, C.J., Hughes, D., Padua, R.A., Thurston, V., Williams, E.D., Wynford-Thomas, D., 1988. Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer Res* 48, 4459-4463.
- Lemoine, N.R., Mayall, E.S., Wyllie, F.S., Williams, E.D., Goyns, M., Stringer, B., Wynford-Thomas, D., 1989. High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* 4, 159-164.
- Lemos, M.C., Carrilho, F., Rodrigues, F., Coutinho, E., Gomes, L., Carvalheiro, M., Regateiro, F.J., 2007. Genetic polymorphism of CYP2D6 influences susceptibility to papillary thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67, 180-183.
- Li, D., Roberts, R., 2001. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci* 58, 2085-2097.
- Li, L.C., Dahiya, R., 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18, 1427-1431.

- Lin J.D., Chang H.Y., Ho Y.S., Weng H.F., 1995. The role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in follicular thyroid cancer cell line CGTH W-1. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 31, 817-821.
- Lin, J.D., Liou, M.J., Chao, T.C., Weng, H.F., Ho, Y.S., 1999. Prognostic variables of papillary and follicular thyroid carcinoma patients with lymph node metastases and without distant metastases. *Endocr Relat Cancer* 6, 109-115.
- Lindblom, A., Tannergard, P., Werelius, B., Nordenskjold, M., 1993. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet* 5, 279-282.
- Liu, X.G., Tan, L.J., Lei, S.F., Liu, Y.J., Shen, H., et al., 2009. Genome-wide association and replication studies identified TRHR as an important gene for lean body mass. *Am J Hum Genet* 84, 418-423.
- Loh, K.C., Greenspan, F.S., Gee, L., Miller, T.R., Yeo, P.P., 1997. Pathological tumor-node-metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: a retrospective analysis of 700 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3553-3562.
- Lonn, S., Bhatti, P., Alexander, B.H., Pineda, M.A., Doody, M.M., Struewing, J.P., Sigurdson, A.J., 2007. Papillary thyroid cancer and polymorphic variants in TSHR- and RET-related genes: a nested case-control study within a cohort of U.S. radiologic technologists. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 174-177.
- Lundgren, C.I., Hall, P., Dickman, P.W., Zedenius, J., 2006. Clinically significant prognostic factors for differentiated thyroid carcinoma: a population-based, nested case-control study. *Cancer* 106, 524-531.
- Mack, W.J., Preston-Martin, S., Dal Maso, L., Galanti, R., Xiang, M., et al., 2003. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer: cigarette smoking and consumption of alcohol, coffee, and tea. *Cancer Causes Control* 14, 773-785.
- Malchoff, C.D., Malchoff, D.M., 2004. Familial papillary thyroid carcinoma. *Cancer Treat Res* 122, 381-387.
- Marques, A.R., Espadinha, C., Catarino, A.L., Moniz, S., Pereira, T., Sobrinho, L.G., Leite, V., 2002. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3947-3952.

- Marqusee, E., Benson, C.B., Frates, M.C., Doubilet, P.M., Larsen, P.R., Cibas, E.S., Mandel, S.J., 2000. Usefulness of ultrasonography in the management of nodular thyroid disease. *Ann Intern Med* 133, 696-700.
- Matakidou, A., Hamel, N., Popat, S., Henderson, K., Kantemiroff, T., Harmer, C., Clarke, S.E., Houlston, R.S., Foulkes, W.D., 2004. Risk of non-medullary thyroid cancer influenced by polymorphic variation in the thyroglobulin gene. *Carcinogenesis* 25, 369-373.
- Matre, V., Karlsen, H.E., Wright, M.S., Lundell, I., Fjeldheim, A.K., Gabrielsen, O.S., Larhammar, D., Gautvik, K.M., 1993. Molecular cloning of a functional human thyrotropin-releasing hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 179-185.
- Mazzaferri, E.L., Kloos, R.T., 2001. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1447-1463.
- McMahon, M., Ayllon, V., Panov, K.I., O'Connor, R., 2010. Ribosomal 18 S RNA processing by the IGF-I-responsive WDR3 protein is integrated with p53 function in cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 285, 18309-18318.
- McWilliams, J.E., Sanderson, B.J., Harris, E.L., Richert-Boe, K.E., Henner, W.D., 1995. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4, 589-594.
- Meier, D.A., Kaplan, M.M., 2001. Radioiodine uptake and thyroid scintiscanning. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30, 291-313, viii.
- Meinhold, C.L., Park, Y., Stolzenberg-Solomon, R.Z., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A., Berrington de Gonzalez, A., 2009. Alcohol intake and risk of thyroid cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Br J Cancer* 101, 1630-1634.
- Meireless, A.M., Preto, A., Rocha, A.S., Rebocho, A.P., Máximo, V., Pereira-Castro, I., Moreira, S., Feijão, T., Botelho, T., Marques, R., Trovisco, V., Cirnes, L., Alves, C., Velho, S., Soares, P., Sobrinho-Simões, M., 2007. Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines. *Thyroid* 17, 707-715.
- Mendive, F.M., Rivolta, C.M., Moya, C.M., Vassart, G., Targovnik, H.M., 2001. Genomic organization of the human thyroglobulin gene: the complete intron-exon structure. *Eur J Endocrinol* 145, 485-496.

- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W., et al., 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.
- Mitelman, F., Mertens, F., Johansson, B., 1997. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Genet* 15 Spec No, 417-474.
- Morari, E.C., Leite, J.L., Granja, F., da Assumpcao, L.V., Ward, L.S., 2002. The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 1485-1488.
- Motoi, N., Sakamoto, A., Yamochi, T., Horiuchi, H., Motoi, T., Machinami, R., 2000. Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathol Res Pract* 196, 1-7.
- Mulligan, L.M., Kwok, J.B., Healey, C.S., Elsdon, M.J., Eng, C., Gardner, E., Love, D.R., Mole, S.E., Moore, J.K., Papi, L., et al., 1993. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363, 458-460.
- Namba, H., Nakashima, M., Hayashi, T., Hayashida, N., Maeda, S., Rogounovitch, T.I., Ohtsuru, A., Saenko, V.A., Kanematsu, T., Yamashita, S., 2003. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4393-4397.
- Namba, H., Rubin, S.A., Fagin, J.A., 1990. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 4, 1474-1479.
- Narayan, A., Ji, W., Zhang, X.Y., Marrogi, A., Graff, J.R., Baylin, S.B., Ehrlich, M., 1998. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *Int J Cancer* 77, 833-838.
- Narod, S.A., Feunteun, J., Lynch, H.T., Watson, P., Conway, T., Lynch, J., Lenoir, G.M., 1991. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet* 338, 82-83.
- Nayak, B., Hodak, S.P., 2007. Hyperthyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 36, 617-656.
- Neale, B.M., Sham, P.C., 2004. The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet* 75, 353-362.



- Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R., Smith, T.F., 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371, 297-300.
- Negri, E., Ron, E., Franceschi, S., La Vecchia, C., Preston-Martin, S., Kolonel, L., Kleinerman, R.A., Mabuchi, K., Jin, F., Wingren, G., Hallquist, A., Levi, F., Linos, A., Fraumeni, J.F., Jr., 2002. Risk factors for medullary thyroid carcinoma: a pooled analysis. *Cancer Causes Control* 13, 365-372.
- Nikiforov, Y.E., 2002. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 13, 3-16.
- Nikiforov, Y.E., Rowland, J.M., Bove, K.E., Monforte-Munoz, H., Fagin, J.A., 1997. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res* 57, 1690-1694.
- Nikiforova, M.N., Chiosea, S.I., Nikiforov, Y.E., 2009. MicroRNA expression profiles in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 20, 85-91.
- Nikiforova, M.N., Lynch, R.A., Biddinger, P.W., Alexander, E.K., Dorn, G.W., 2nd, Tallini, G., Kroll, T.G., Nikiforov, Y.E., 2003a. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2318-2326.
- Nikiforova, M.N., Kimura, E.T., Gandhi, M., Biddinger, P.W., Knauf, J.A., Basolo, F., Zhu, Z., Giannini, R., Salvatore, G., Fusco, A., Santoro, M., Fagin, J.A., Nikiforov, Y.E., 2003b. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5399-5404.
- Nikiforova, M.N., Tseng, G.C., Steward, D., Diorio, D., Nikiforov, Y.E., 2008. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 1600-1608.
- Nishihara, E., Nagayama, Y., Mawatari, F., Tanaka, K., Namba, H., Niwa, M., Yamashita, S., 1997. Retrovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction renders human thyroid carcinoma cell lines sensitive to ganciclovir and radiation in vitro and in vivo. *Endocrinology* 138, 4577-4583.

- Nix, P., Nicolaides, A., Coatesworth, A.P., 2005. Thyroid cancer review 1: presentation and investigation of thyroid cancer. *Int J Clin Pract* 59, 1340-1344.
- Nix, P.A., Nicolaides, A., Coatesworth, A.P., 2006. Thyroid cancer review 3: management of medullary and undifferentiated thyroid cancer. *Int J Clin Pract* 60, 80-84.
- Nupponen, N.N., Kakkola, L., Koivisto, P., Visakorpi, T., 1998. Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol* 153, 141-148.
- Nystrom-Lahti, M., Sistonen, P., Mecklin, J.P., Pylkkanen, L., Aaltonen, L.A., Jarvinen, H., Weissenbach, J., de la Chapelle, A., Peltomaki, P., 1994. Close linkage to chromosome 3p and conservation of ancestral founding haplotype in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6054-6058.
- Oertel, Y.C., 2007. Fine-needle aspiration of the thyroid: technique and terminology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 36, 737-751, vi-vii.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257.
- Olaleye, O., Ekrikpo, U., Moorthy, R., Lyne, O., Wiseberg, J., Black, M., Mitchell, D., 2010. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in South East England: 1987-2006. *Eur Arch Otorhinolaryngol*.
- Onda, M., Li, D., Suzuki, S., Nakamura, I., Takenoshita, S., Brogren, C.H., Stampanoni, S., Rampino, N., 2002. Expansion of microsatellite in the thyroid hormone receptor-alpha1 gene linked to increased receptor expression and less aggressive thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 8, 2870-2874.
- Oshimo, Y., Nakayama, H., Ito, R., Kitadai, Y., Yoshida, K., Chayama, K., Yasui, W., 2003. Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma. *Int J Oncol* 23, 1663-1670.
- Ott, R.A., Calandra, D.B., McCall, A., Shah, K.H., Lawrence, A.M., Paloyan, E., 1985. The incidence of thyroid carcinoma in patients with Hashimoto's thyroiditis and solitary cold nodules. *Surgery* 98, 1202-1206.
- Pacini, F., Molinaro, E., Castagna, M.G., Lippi, F., Ceccarelli, C., Agate, L., Elisei, R., Pinchera, A., 2002. Ablation of thyroid residues with 30 mCi (131)I: a

- comparison in thyroid cancer patients prepared with recombinant human TSH or thyroid hormone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4063-4068.
- Pallante, P., Visone, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Berlingieri, M.T., Troncone, G., Chiappetta, G., Liu, C.G., Santoro, M., Negrini, M., Croce, C.M., Fusco, A., 2006. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 13, 497-508.
- Papini, E., Guglielmi, R., Bianchini, A., Crescenzi, A., Taccogna, S., Nardi, F., Panunzi, C., Rinaldi, R., Toscano, V., Pacella, C.M., 2002. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1941-1946.
- Park, Y.N., Arvan, P., 2004. The acetylcholinesterase homology region is essential for normal conformational maturation and secretion of thyroglobulin. *J Biol Chem* 279, 17085-17089.
- Patocs, A., Valkusz, Z., Igaz, P., Balogh, K., Toth, M., Varga, I., Racz, K., 2003. Segregation of the V804L mutation and S836S polymorphism of exon 14 of the RET gene in an extended kindred with familial medullary thyroid cancer. *Clin Genet* 63, 219-223.
- Peltomaki, P., Aaltonen, L.A., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Green, J.S., Jass, J.R., Weber, J.L., Leach, F.S., et al., 1993. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 260, 810-812.
- Pilarski, R., 2009. Cowden syndrome: a critical review of the clinical literature. *J Genet Couns* 18, 13-27.
- Pilli, T., Prasad, K.V., Jayarama, S., Pacini, F., Prabhakar, B.S., 2009. Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying thyroid cancer. *Thyroid* 19, 1333-1342.
- Pino Rivero, V., Guerra Camacho, M., Marcos Garcia, M., Trinidad Ruiz, G., Pardo Romero, G., Gonzalez Palomino, A., Blasco Huelva, A., 2004. The incidence of thyroid carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. Our experience and literature review. *An Otorrinolaringol Ibero Am* 31, 223-230.
- Preston-Martin, S., Franceschi, S., Ron, E., Negri, E., 2003. Thyroid cancer pooled analysis from 14 case-control studies: what have we learned? *Cancer Causes Control* 14, 787-789.

- Qu, G.Z., Grundy, P.E., Narayan, A., Ehrlich, M., 1999. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 109, 34-39.
- Rabes, H.M., Demidchik, E.P., Sidorow, J.D., Lengfelder, E., Beimfohr, C., Hoelzel, D., Klugbauer, S., 2000. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res* 6, 1093-1103.
- Rafnar, T., Sulem, P., Stacey, S.N., Geller, F., Gudmundsson, J., et al., 2009. Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types. *Nature Genet* 41, 221-227.
- Rebai, M., Kallel, I., Charfeddine, S., Hamza, F., Guermazi, F., Rebai, A., 2009. Association of polymorphisms in estrogen and thyroid hormone receptors with thyroid cancer risk. *J Recept Signal Transduct Res* 29, 113-118.
- Risch, N., Merikangas, K., 1996. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273, 1516-1517.
- Robledo, M., Gil, L., Pollan, M., Cebrian, A., Ruiz, S., Azanedo, M., Benitez, J., Menarguez, J., Rojas, J.M., 2003. Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Res* 63, 1814-1817.
- Rogounovitch, T.I., Saenko, V.A., Ashizawa, K., Sedliarou, I.A., Namba, H., Abrosimov, A.Y., Lushnikov, E.F., Roumiantsev, P.O., Konova, M.V., Petoukhova, N.S., Tchebotareva, I.V., Ivanov, V.K., Chekin, S.Y., Bogdanova, T.I., Tronko, M.D., Tsyb, A.F., Thomas, G.A., Yamashita, S., 2006. TP53 codon 72 polymorphism in radiation-associated human papillary thyroid cancer. *Oncol Rep* 15, 949-956.
- Ron, E., Lubin, J.H., Shore, R.E., Mabuchi, K., Modan, B., Pottern, L.M., Schneider, A.B., Tucker, M.A., Boice, J.D., Jr., 1995. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res* 141, 259-277.
- Roque, L., Nunes, V.M., Ribeiro, C., Martins, C., Soares, J., 2001. Karyotypic characterization of papillary thyroid carcinomas. *Cancer* 92, 2529-2538.
- Rosario, P.W., Barroso, A.L., Rezende, L.L., Padrao, E.L., Borges, M.A., Fagundes, T.A., Purisch, S., 2005. Ablative treatment of thyroid cancer with high doses of <sup>131</sup>I without pre-therapy scanning. *Nucl Med Commun* 26, 129-132.

- Rossing, M.A., Cushing, K.L., Voigt, L.F., Wicklund, K.G., Daling, J.R., 2000. Risk of papillary thyroid cancer in women in relation to smoking and alcohol consumption. *Epidemiology* 11, 49-54.
- Rudolph, B., Harbott, J., Lampert, F., 1988. Fragile sites and neuroblastoma: fragile site at 1p13.1 and other points on lymphocyte chromosomes from patients and family members. *Cancer Genet Cytogenet* 31, 83-94.
- Sakai, K., Shirasawa, S., Ishikawa, N., Ito, K., Tamai, H., Kuma, K., Akamizu, T., Tanimura, M., Furugaki, K., Yamamoto, K., Sasazuki, T., 2001. Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese. *Hum Mol Genet* 10, 1379-1386.
- Santisteban, P., 2006. Mecanismos moleculares implicados en la función tiroidea: control de procesos fisiológicos y alteraciones patológicas. [Ebs.uvigo.es/endocrinologia/PDFs%202004\\_05/PDFS/Tiroides\\_P Santisteban.pdf](http://Ebs.uvigo.es/endocrinologia/PDFs%202004_05/PDFS/Tiroides_P Santisteban.pdf).
- Santoro, M., Carlomagno, F., Hay, I.D., Herrmann, M.A., Grieco, M., Melillo, R., Pierotti, M.A., Bongarzone, I., Della Porta, G., Berger, N., et al., 1992. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest* 89, 1517-1522.
- Santoro, M., Dathan, N.A., Berlingieri, M.T., Bongarzone, I., Paulin, C., Grieco, M., Pierotti, M.A., Vecchio, G., Fusco, A., 1994. Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* 9, 509-516.
- Schlumberger, M., Lacroix, L., Russo, D., Filetti, S., Bidart, J.M., 2007. Defects in iodide metabolism in thyroid cancer and implications for the follow-up and treatment of patients. *Nature Clin Pract Endocrinol Metab* 3, 260-269.
- Schmid, K.W., Farid, N.R., 2006. How to define follicular thyroid carcinoma? *Virchows Arch* 448, 385-393.
- Schönberger, J., Bauer, J., Spruss, T., Weber, G., Chahoud, I., Eilles, C., Grimm, D., 2000. Establishment and characterization of the follicular thyroid carcinoma cell line ML-1. *Journal of Molecular Medicine* 78, 102-110.
- Schweppe, R.E., Klopper, J.P., Korch, C., Pugazhenti, U., Benezra, M., Knauf, J.A., Fagin, J.A., Marlow, L.A., Copland, J.A., Smallridge, R.C., Haugen, B.R., 2008. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell

- lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93, 4331–4341.
- Segev, D.L., Umbricht, C., Zeiger, M.A., 2003. Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg Oncol* 12, 69-90.
- Shaha, A.R., 2004. Implications of prognostic factors and risk groups in the management of differentiated thyroid cancer. *Laryngoscope* 114, 393-402.
- Shaha, A.R., 2007. TNM classification of thyroid carcinoma. *World J Surg* 31, 879-887.
- Sherman, S.I., 2003. Thyroid carcinoma. *Lancet* 361, 501-511.
- Silva, S.N., Gil, O.M., Oliveira, V.C., Cabral, M.N., Azevedo, A.P., Faber, A., Manita, I., Ferreira, T.C., Limbert, E., Pina, J.E., Rueff, J., Gaspar, J., 2005a. Association of polymorphisms in ERCC2 gene with non-familial thyroid cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 2407-2412.
- Silva, F.P., Hamamoto, R., Nakamura, Y., Furukawa, Y., 2005b. WDRPUH, a novel WD-repeat-containing protein, is highly expressed in human hepatocellular carcinoma and involved in cell proliferation. *Neoplasia* 7, 348-355.
- Siraj, A.K., Al-Rasheed, M., Ibrahim, M., Siddiqui, K., Al-Dayel, F., Al-Sanea, O., Uddin, S., Al-Kuraya, K., 2008. RAD52 polymorphisms contribute to the development of papillary thyroid cancer susceptibility in Middle Eastern population. *J Endocrinol Invest* 31, 893-899.
- Smedley, D., Sidhar, S., Birdsall, S., Bennett, D., Herlyn, M., Cooper, C., Shipley, J., 2000. Characterization of chromosome 1 abnormalities in malignant melanomas. *Genes Chromosomes Cancer* 28, 121-125.
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., Neer, E.J., 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* 24, 181-185.
- Soares, P., Fonseca, E., Wynford-Thomas, D., Sobrinho-Simoes, M., 1998. Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol* 185, 71-78.
- Soares, P., Trovisco, V., Rocha, A.S., Lima, J., Castro, P., Preto, A., Maximo, V., Botelho, T., Seruca, R., Sobrinho-Simoes, M., 2003. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22, 4578-4580.

- Sobin, L.H., 2001. TNM classification: clarification of number of regional lymph nodes for pN0. *Br J Cancer* 85, 780.
- Sobin, L.H., 2003. TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. *Semin Surg Oncol* 21, 19-22.
- Solé, X., Guino, E., Valls, J., Iniesta, R., Moreno, V., 2006. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22, 1928-1929.
- Sorensen, M., Autrup, H., Tjønneland, A., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., 2004. Glutathione S-transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer. *Int J Cancer* 110, 219-224.
- Spitzweg, C., Morris, J.C., 2002. Sodium iodide symporter (NIS) and thyroid. *Hormones (Athens)* 1, 22-34.
- Steinmuller, T., Klupp, J., Rayes, N., Ulrich, F., Jonas, S., Graf, K.J., Neuhaus, P., 2000. Prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Surg* 166, 29-33.
- Stoler, D.L., Datta, R.V., Charles, M.A., Block, A.W., Brenner, B.M., Siczka, E.M., Hicks, W.L., Jr., Loree, T.R., Anderson, G.R., 2002. Genomic instability measurement in the diagnosis of thyroid neoplasms. *Head Neck* 24, 290-295.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., Roses, A.D., 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1977-1981.
- Sturgis, E.M., Li, G., 2009. Molecular epidemiology of papillary thyroid cancer: in search of common genetic associations. *Thyroid* 19, 1031-1034.
- Sturgis, E.M., Zhao, C., Zheng, R., Wei, Q., 2005. Radiation response genotype and risk of differentiated thyroid cancer: a case-control analysis. *Laryngoscope* 115, 938-945.
- Suarez, H.G., du Villard, J.A., Severino, M., Caillou, B., Schlumberger, M., Tubiana, M., Parmentier, C., Monier, R., 1990. Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors. *Oncogene* 5, 565-570.
- Suen, K.C., 2002. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid. *CMAJ* 167, 491-495.
- Surks, M.I., Ortiz, E., Daniels, G.H., Sawin, C.T., Col, N.F., Cobin, R.H., Franklyn, J.A., Hershman, J.M., Burman, K.D., Denke, M.A., Gorman, C., Cooper, R.S., Weissman, N.J., 2004. Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. *JAMA* 291, 228-238.

- Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J.G., Baylin, S.B., 2004. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nature Genet* 36, 417-422.
- Takahashi, M., Saenko, V.A., Rogounovitch, T.I., Kawaguchi, T., Drozd, V.M., et al., 2010. The FOXE1 locus is a major genetic determinant for radiation-related thyroid carcinoma in Chernobyl. *Hum Mol Genet* 19, 2516-2523.
- Tallini, G., Asa, S.L., 2001. RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. *Adv Anat Pathol* 8, 345-354.
- Tallini, G., Santoro, M., Helie, M., Carlomagno, F., Salvatore, G., Chiappetta, G., Carcangiu, M.L., Fusco, A., 1998. 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* 4, 287-294.
- Tanaka, J., Ogura, T., Sato, H., 1987. Datano M. Establishment and biological characterization of an in vitro human cytomegalovirus latency model. *Virology* 161, 62-72.
- Taningher, M., Malacarne, D., Izzotti, A., Ugolini, D., Parodi, S., 1999. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat Res* 436, 227-261.
- Targovnik, H.M., Rivolta, C.M., Mendive, F.M., Moya, C.M., Vono, J., Medeiros-Neto, G., 2001. Congenital goiter with hypothyroidism caused by a 5' splice site mutation in the thyroglobulin gene. *Thyroid* 11, 685-690.
- Tetzlaff, M.T., Liu, A., Xu, X., Master, S.R., Baldwin, D.A., Tobias, J.W., Livolsi, V.A., Baloch, Z.W., 2007. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocr Pathol* 18, 163-173.
- Thompson, D., Easton, D., 2004. The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 221-236.
- Tomer, Y., Greenberg, D., 2004. The thyroglobulin gene as the first thyroid-specific susceptibility gene for autoimmune thyroid disease. *Trends Mol Med* 10, 306-308.



- Tomer, Y., Greenberg, D.A., Concepcion, E., Ban, Y., Davies, T.F., 2002. Thyroglobulin is a thyroid specific gene for the familial autoimmune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 404-407.
- Tomlinson, I., Webb, E., Carvajal-Carmona, L., Broderick, P., Kemp, Z., et al., 2007. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nature Genet* 39, 984-988.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., Issa, J.P., 1999. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8681-8686.
- Tuck-Muller, C.M., Narayan, A., Tsien, F., Smeets, D.F., Sawyer, J., Fiala, E.S., Sohn, O.S., Ehrlich, M., 2000. DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet* 89, 121-128.
- Tung, W.S., Shevlin, D.W., Bartsch, D., Norton, J.A., Wells, S.A., Jr., Goodfellow, P.J., 1996. Infrequent CDKN2 mutation in human differentiated thyroid cancers. *Mol Carcinog* 15, 5-10.
- Tung, W.S., Shevlin, D.W., Kaleem, Z., Tribune, D.J., Wells, S.A., Jr., Goodfellow, P.J., 1997. Allelotype of follicular thyroid carcinomas reveals genetic instability consistent with frequent nondisjunctional chromosomal loss. *Genes Chromosomes Cancer* 19, 43-51.
- Vaidya, B., Pearce, S.H., 2008. Management of hypothyroidism in adults. *BMJ* 337, a801.
- van de Graaf, S.A., Ris-Stalpers, C., Pauws, E., Mendive, F.M., Targovnik, H.M., de Vijlder, J.J., 2001. Up to date with human thyroglobulin. *J Endocrinol* 170, 307-321.
- van der Voorn, L., Ploegh, H.L., 1992. The WD-40 repeat. *FEBS Lett* 307, 131-134.
- Varghese, J.S., Easton, D.F., 2010. Genome-wide association studies in common cancers--what have we learnt? *Curr Opin Genet Dev* 20, 201-209.
- Vasko, V., Bauer, A.J., Tuttle, R.M., Francis, G.L., 2007. Papillary and follicular thyroid cancers in children. *Endocr Dev* 10, 140-172.
- Vasko, V.V., Gaudart, J., Allasia, C., Savchenko, V., Di Cristofaro, J., Saji, M., Ringel, M.D., De Micco, C., 2004. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma. *Eur J Endocrinol* 151, 779-786.

- Vernole, P., Tedeschi, B., Caporossi, D., Nicoletti, B., 1989. Fragile site 1p13.1 in neuroblastoma patients. *Cancer Genet Cytogenet* 40, 135-136.
- Visone, R., Russo, L., Pallante, P., De Martino, I., Ferraro, A., Leone, V., Borbone, E., Petrocca, F., Alder, H., Croce, C.M., Fusco, A., 2007. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr Relat Cancer* 14, 791-798.
- Vono-Toniolo, J., Rivolta, C.M., Targovnik, H.M., Medeiros-Neto, G., Kopp, P., 2005. Naturally occurring mutations in the thyroglobulin gene. *Thyroid* 15, 1021-1033.
- Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., Marais, R., 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855-867.
- Wemeau, J.L., 2005. [Hyperthyroidism: current concepts and management]. *Rev Prat* 55, 149-157.
- Williams, D., 2002. Cancer after nuclear fallout: lessons from the Chernobyl accident. *Nature Rev Cancer* 2, 543-549.
- Wokolorczyk, D., Gliniewicz, B., Sikorski, A., Zlowocka, E., Masojc, B., et al., 2008. A range of cancers is associated with the rs6983267 marker on chromosome 8. *Cancer Res* 68, 9982-9986.
- Wong, C.K., Wheeler, M.H., 2000. Thyroid nodules: rational management. *World J Surg* 24, 934-941.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., Micklem, G., 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378, 789-792.
- Wooster, R., Neuhausen, S.L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D., et al., 1994. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265, 2088-2090.
- Wreesmann, V.B., Ghossein, R.A., Patel, S.G., Harris, C.P., Schnaser, E.A., Shaha, A.R., Tuttle, R.M., Shah, J.P., Rao, P.H., Singh, B., 2002. Genome-wide appraisal of thyroid cancer progression. *Am J Pathol* 161, 1549-1556.
- Xing, M., 2005. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 12, 245-262.

- Xu, G.L., Bestor, T.H., Bourc'his, D., Hsieh, C.L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J.J., Viegas-Pequignot, E., 1999. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402, 187-191.
- Yamada, M., Mori, M., 2008. Mechanisms related to the pathophysiology and management of central hypothyroidism. *Nature Clin Pract Endocrinol Metab* 4, 683-694.
- Yamashita, H., Noguchi, S., Murakami, N., Kato, R., Adachi, M., Inoue, S., Kato, S., Nakayama, I., 1990. Effects of dietary iodine on chemical induction of thyroid carcinoma. *Acta Pathol Jpn* 40, 705-712.
- Yarbro, J.W., Page, D.L., Fielding, L.P., Partridge, E.E., Murphy, G.P., 1999. American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference. *Cancer* 86, 2436-2446.
- Yeager, M., Orr, N., Hayes, R.B., Jacobs, K.B., Kraft, P., et al., 2007. Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nature Genet* 39, 645-649.
- Zardo, F., Soldo, P., Altissimi, G., Parnasi, E., Bertin, S., 1999. [Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer: a report of a clinical case and a review of the literature]. *G Chir* 20, 174-176.
- Zhang, J., Glatfelter, A.A., Taetle, R., Trent, J.M., 1999. Frequent alterations of evolutionarily conserved regions of chromosome 1 in human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 111, 119-123.
- Zondervan, K.T., Cardon, L.R., 2004. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nature Rev Genet* 5, 89-100.



## **ANEXO 1**



## *WDR3* Gene Haplotype Is Associated with Thyroid Cancer Risk in a Spanish Population

Abdelmounaim Akdi,<sup>1</sup> Esteban-Mariano Giménez,<sup>1</sup> Wilser García-Quispes,<sup>1</sup> Susana Pastor,<sup>1,2</sup> Juan Castell,<sup>3</sup> Josefina Biarnés,<sup>4</sup> Ricard Marcos,<sup>1,2</sup> and Antonia Velázquez<sup>1,2</sup>

**Background:** A member of the genes encoding WD-repeat proteins, the *WDR3* gene, maps in the 1p12 region. This region was shown to be associated with thyroid cancer susceptibility in a previous work. In this study we aim to evaluate the contribution of *WDR3* to thyroid cancer risk.

**Methods:** A case-control association study was performed in a total of 402 patients and 479 control subjects from a Spanish population. In the initial phase of the study, 10 single-nucleotide polymorphisms covering the *WDR3* region were genotyped in a small group (157 patients and 118 control subjects); next, three of the initial single-nucleotide polymorphisms were further genotyped in the overall population. In addition, *WDR3* expression was investigated in 10 thyroid cancer cell lines by RT-PCR and Western blot.

**Results:** Haplotype analysis revealed that combination of certain *WDR3* variants, such as haplotype CAT, increases the risk of thyroid cancer (odds ratio = 1.85, 95% confidence interval = 0.97–3.55,  $p = 0.063$ ). Further, both messenger RNA transcription and protein expression of *WDR3* were altered in human thyroid cancer cells.

**Conclusion:** These results indicate for the first time that *WDR3* is a risk factor to thyroid cancer, suggesting its implication in the etiology of thyroid cancer.

### Introduction

THYROID CANCER IS the most frequent endocrine cancer and it appears mainly as sporadic form (1). Several risk factors have been linked to this disease, which is more common in women than in men (2). Although several environmental and genetic factors related to thyroid tumorigenesis have been reported, the etiology of thyroid cancer remains unknown (2,3). Moreover, common genetic variants interacting with environmental factors are considered to be important for thyroid cancer risk. Genetic variants at several regions such as 1p12, 8q24, 5q33, 9q22.33, and 14q13.3 have been found to be related with this disease (4–8). The 1p12 region, previously studied by us, contains the *WDR3* gene, which is a member of the eukaryote conserved family of WD-repeat genes (9).

The large group of proteins encoded for the WD-repeat gene family have a related structure, although with diverse functions (10–12). These proteins are involved in cell cycle progression and signal transduction, among other cellular processes. Yeast-based research have shown that the human

*WDR3* orthologous encodes a DOM-interacting protein, which is involved in G1 cell progression and cell differentiation (13); subsequently, a role of the *WDR3* gene in cell division has been proposed in humans (9). No additional information about the specific function of *WDR3* exists in the literature; however, chromosome aberrations involving the 1p12 region have been observed in different types of cancer (14–17). In addition, several studies have shown irregular expression of some of the WD-repeat proteins in certain types of cancers (18–21). Altogether and based on our earlier association studies (4,5), we hypothesized that *WDR3* could be involved in thyroid cancer development.

In this study, we analyzed single-nucleotide polymorphisms (SNPs) from the *WDR3* gene in a two-stage study. Lack of association with thyroid cancer was found for individual SNPs; however, haplotype analysis revealed that the *WDR3* gene is associated with thyroid cancer risk. In addition, altered expression of the *WDR3* gene was detected in thyroid cancer cell lines, by both RT-PCR and Western blot analysis, supporting the possible implication of the *WDR3* gene in the etiology of thyroid cancer.

<sup>1</sup>Group of Mutagenesis, Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Bioscience, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain.

<sup>2</sup>CIBER Epidemiology and Public Health, ISCIII, Barcelona, Spain.

<sup>3</sup>Nuclear Medicine Services, Vall d'Hbron Hospital, Barcelona, Spain.

<sup>4</sup>Endocrinology Unit, Josep Trueta Hospital, Girona, Spain.

## Materials and Methods

### Subjects and DNA isolation

This study was performed in two stages in a Spanish population where individuals from case and control groups were unrelated. Both patients and control subjects were recruited during a 5-year period (2004–2008). Patients with thyroid cancer were from the Nuclear Medicine Services at the University Hospital Vall d'Hebron (Barcelona) and the Hospital Josep Trueta (Girona) and were newly diagnosed individuals. Control subjects were healthy, cancer-free volunteer individuals having Caucasian origin with Spanish ancestors. Initially, the study was carried out in a group of 157 patients and 118 control individuals. The sample size was increased to 402 patients and 479 control individuals in the second phase of the study. All subjects selected for this study reported no previous therapeutic or accidental whole-body exposure to radiation. Clinical information of patients was obtained from medical records, and patients were classified as papillary thyroid carcinoma (PTC) group (339 of 402 patients) and follicular thyroid carcinoma (FTC) group (59 of 402 patients). The information about the type of tumor was not available for four patients during the study; consequently, they were classified as others. Informed consent from all participants and clearance from the Ethics Committees of our institutions were obtained.

DNA was isolated from blood samples of each individual using either a standard phenol chloroform method or the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Alternatively, DNA of several control individuals was isolated from saliva using the Orogen kit (DNA Genotek).

### SNP selection and genotype analysis

In the initial study group of 157 patients and 118 control subjects, a total of 10 SNPs were analyzed, covering the *WDR3* gene and its surrounding sequences at 5' and 3'. The SNPs 1–10

were rs4233455, rs2208375, rs3754127, rs1321665, rs6680844, rs3765501, rs1321666, rs4658973, rs6685906, and rs6678671, respectively. The relative map positions of these markers are shown in Figure 1. SNPs were selected based on information available in public databases, referred to minor allele frequency (>0.2). All these markers are located in the same linkage disequilibrium (LD) block according to the HapMap information, HapMap CEU genotype data, and Haploview software (22), and with a density of one SNP per 4–5 kb.

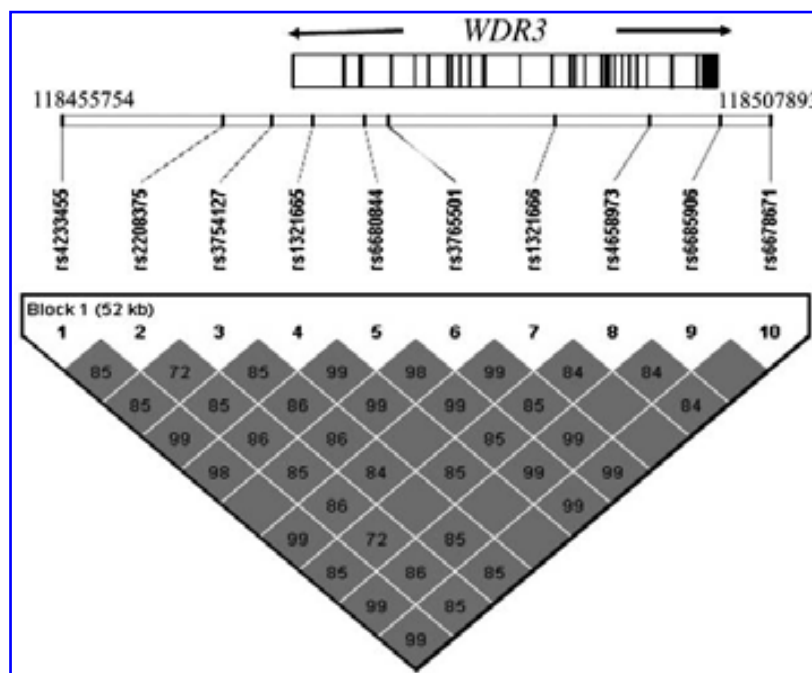
In the second genotype phase of 402 patients and 479 control subjects, 3 of the 10 initially selected SNPs were genotyped, rs3754127, rs3765501, and rs4658973 (SNPs 3, 6, and 8, respectively).

All genotype analyses were performed at the Genotype National Centre of Spain (CeGen) using the iPLEX technique (Sequenom, Inc.). To assure the genotyping reliability, 10% of the samples were randomly selected and double genotyped by replicates in multiple 96-well plates. In addition, two HapMap reference trios were incorporated in plates, and the genotype concordance and correct Mendelian inheritance were verified.

That the first genotyped group of 157 patients and 118 control subjects was also genotyped in the second phase for three repeated SNPs was an additional validation of the genotyping procedure.

### Statistical analysis

Chi-square test was used to compare the sex proportion between case and control groups, and to examine the Hardy–Weinberg equilibrium of the genotype distribution in the control population with a 5% level of significance. Mean ages of patients and control subjects were compared by the Mann–Whitney test. Unconditional logistic regression analyses, adjusted for sex and age, were performed to calculate the odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) for risk of thy-



**FIG. 1.** Diagram of the *WDR3* gene at 1p12 region, coordinates 118455754 to 118507893. The relative map position of the studied SNPs and pair-wise LD measured using  $r$ -squared values are indicated.



roid cancer. A model of multiplicative allelic effect was assumed (codominant model).

Haploview software (22) was used to examine the LD between SNPs. A logistic regression analysis was used to obtain the adjusted OR and 95% CI of haplotypes. The relation of haplotypes and clinicopathological variables in patients was evaluated by the chi-square test.

All statistical analyses were performed using SNPStats software (23) with a 5% level of significance.

#### Cell lines

The S11N human thyroid normal cell line, provided by Dr. Ludwig Hieber (German Research Center for Environmental Health, Neuherberg, Germany), was grown in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; Gibco) and 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  plasmocin (InvivoGen). The human thyroid cancer cell lines TPC-1 (papillary) and CAL-62 (anaplastic) were provided by Dr. R. Melillo and Dr. M. Santoro (University of Naples, Naples, Italy), and ML-1 (follicular) was purchased from DSMZ; these were all grown in DMEM (Sigma) containing 10% FBS (Gibco) and 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  plasmocin (InvivoGen). The human thyroid cancer cell lines WRO (follicular) and FRO (anaplastic) (provided by Dr. R. Ciampi, University of Pisa, Pisa, Italy) were grown in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with 10% FBS (Gibco), 1% non-essential amino acids (Sigma), 1% sodium pyruvate (Sigma) and 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  plasmocin (InvivoGen). The human thyroid cancer cell lines B-CPAP (papillary), CGTH-W-1 (follicular), 8305C (anaplastic), 8505C (anaplastic), purchased from DSMZ, were grown in RPMI 1640 (Sigma) containing 10% FBS (Gibco) and 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  plasmocin (InvivoGen). Cells were placed in culture flasks and incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator.

#### RNA extraction and reverse transcription PCR

RNA was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. RNA was treated with DNase-I using TURBO DNA-free kit (Ambion). Quality of RNA was verified by agarose gel electrophoresis and quantified with the spectrophotometer (NanoDrop-1000; ThermoScientific). Semiquantitative RT-PCR analysis was performed using 100 ng of RNA and the SuperScript™ One-Step RT-PCR System kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Two regions of the *WDR3* mRNA, corresponding to exons 3–4 and exons 13–15, were tested in separate RT-PCR reactions, and the endogenous control  $\beta$ -actin mRNA was included in each reaction. Primers for exons 3–4 of *WDR3* were F: 5'-TCGATCCGAATCTTCAGTCT-3' and R: 5'-AACAAATGCTTGTTGATGGC-3', and amplified a 209 bp sequence from cDNA. Primers for exons 13–15 of *WDR3* were F: 5'-TGACACACAGAACATCTTCA-3' and R: 5'-AATCTGCTGGAGACAATAGA-3', and amplified a 210 bp sequence from cDNA. The primers for  $\beta$ -actin mRNA were F: 5'-CCAGAGCAAGAGAGGCATCC-3' and R: 5'-AATCTGCTGGAGACAATAGA-3'. The reaction temperature was 55°C. RT-PCR products were separated by electrophoresis on a 2.5% agarose gel and observed with SYBER green.

#### Western blot

A total of 30  $\mu\text{g}$  of each protein lysate was heat denatured in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol (5 minutes, 90°C),

loaded onto 7% polyacrylamide sodium dodecyl sulfate gel, and transferred to a nitrocellulose membrane by electroblotting. The membrane was incubated with a monoclonal rabbit anti-*WDR3* antibody (Bethyl Laboratories, Inc.) and a secondary anti-rabbit antibody conjugated with horseradish peroxidase (Abcam) at 4°C overnight. Protein bands were observed using the SuperSignal Western Pico Chemiluminescent Substrate kit (Pierce). A vinculin antibody (Abcam) was used as a loading control. The Western blot signal was quantified using GeneTools Analysis Software (Syngene).

## Results

In a previous case-control association study carried out in a Spanish population of 227 patients and 202 control subjects, we showed that the 1p12 region was associated with thyroid cancer susceptibility (5). The *WDR3* gene maps in this region, and to determine the thyroid cancer contribution of *WDR3* we performed a two-stage case-control association study. As DNA samples from individuals participating in the previous studies (4,5) were run out, a new collection of samples was used for this study. Initially, 10 SNPs covering the *WDR3* gene and its surrounded regions at 5' and 3' were genotyped (Fig. 1) in a group of 157 patients and 118 control subjects. Next, to increase the power of the first study, we genotyped 402 patients and 479 control subjects of the same Spanish population, using 3 of the 10 first genotyped SNPs. In this large group the initial 157 patients and 118 control subjects were also included. All selected SNPs were within the same LD block and showed a minor allele frequency >0.2, based on HapMap and public databases.

In the group of 157 patients (118 women and 39 men) and 118 control subjects (78 women and 40 men), mean age  $\pm$  SD was 44.44  $\pm$  14.52 and 39.7  $\pm$  13.44 years, respectively ( $p = 0.013$ ). The sex distribution was 75.1% and 66.1% of women in patients and control subjects, respectively ( $p = 0.10$ ). In the second genotyped group of 402 patients (312 women and 90 men) and 479 control subjects (283 women and 196 men), mean age  $\pm$  SD was 47.06  $\pm$  15.48 and 45.99  $\pm$  17.24 years, respectively ( $p = 0.089$ ), with a sex distribution of 77.6% and 59.1% of women in patients and control subjects, respectively ( $p < 0.0001$ ). Therefore, before performing the association analysis, the genotype distribution within sex was analyzed in both groups, but no significant differences were found (data not shown). Thus, the different sex proportion in control and patient groups does not influence our association analysis.

In our control population, genotype frequency distribution was consistent with those of the Hardy-Weinberg equilibrium; where  $p > 0.05$  for the 10 selected SNPs (data not shown). The allele frequencies of these SNPs were similar to those reported in the dbSNP database. In the first stage of this study, the logistic regression analysis did not show any significant association for individual SNPs; nevertheless, we could observe that all 10 SNPs exhibited an increased frequency of the homozygous variant genotype in patients compared with control subjects (Table 1). Subsequently, haplotype analysis was performed combining the 10 genotyped SNPs. Four of the inferred haplotypes represented >95% of the individuals, the remaining haplotypes showing frequencies <1% were classified as others. As shown in Table 2 one of the four haplotypes (Hap III, i.e., TACCTACTGC) revealed an increased risk to thyroid cancer though it did not reach statistical significance

TABLE 1. ALLELE FREQUENCIES AND GENOTYPE DISTRIBUTION OF SELECTED SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF *WDR3* AND ASSOCIATION OF GENOTYPES WITH THYROID CANCER

NCBI SNP ID	MAF		SNP genotype	Control subjects, n (%), n = 118	Patients, n (%), n = 157	OR <sup>a</sup> (95% CI)	p <sup>b</sup>
	Control subjects, n = 118	Patients, n = 157					
1 rs4233455	0.45	0.50	C/C	33 (29.2)	40 (26.3)	1.00	0.57
			C/T	58 (51.3)	71 (46.7)	1.05 (0.50–2.22)	
			T/T	22 (19.5)	41 (27.0)	1.54 (0.63–3.78)	
2 rs2208375	0.47	0.51	G/G	31 (27.2)	38 (25.0)	1.00	0.70
			A/G	58 (50.9)	72 (47.4)	1.05 (0.49–2.24)	
			A/A	25 (21.9)	42 (27.6)	1.42 (0.58–3.50)	
3 rs3754127	0.44	0.45	C/C	35 (29.7)	48 (32.0)	1.00	0.50
			C/T	63 (53.4)	68 (45.3)	0.78 (0.38–1.61)	
			T/T	20 (16.9)	34 (22.7)	1.29 (0.51–3.26)	
4 rs1321665	0.45	0.5	A/A	33 (28.9)	38 (26.2)	1.00	0.58
			A/C	60 (52.6)	68 (46.9)	1.30 (0.61–2.79)	
			C/C	21 (18.4)	39 (26.9)	1.63 (0.64–4.14)	
5 rs6680844	0.45	0.5	C/C	33 (28.9)	40 (26.9)	1.00	0.33
			C/T	60 (52.6)	68 (45.6)	1.05 (0.50–2.20)	
			T/T	21 (18.4)	41 (27.5)	1.81 (0.74–4.44)	
6 rs3765501	0.46	0.5	G/G	33 (28.4)	41 (26.4)	1.00	0.56
			G/A	60 (51.7)	73 (47.1)	1.10 (0.53–2.31)	
			A/A	23 (19.8)	41 (26.4)	1.59 (0.65–3.89)	
7 rs1321666	0.45	0.5	T/T	33 (28.9)	40 (27.2)	1.00	0.60
			C/T	59 (51.8)	68 (46.3)	1.02 (0.48–2.15)	
			C/C	22 (19.3)	39 (26.5)	1.49 (0.61–3.64)	
8 rs4658973	0.43	0.45	T/T	35 (30.7)	47 (32.4)	1.00	0.58
			G/T	60 (52.6)	65 (44.8)	0.86 (0.41–1.78)	
			G/G	19 (16.7)	33 (22.8)	1.36 (0.53–3.54)	
9 rs6685906	0.45	0.51	T/T	33 (29.2)	40 (26.3)	1.00	0.54
			G/T	58 (51.3)	70 (46.0)	1.08 (0.51–2.29)	
			G/G	22 (19.5)	42 (27.6)	1.59 (0.65–3.89)	
10 rs6678671	0.46	0.51	T/T	33 (28.4)	40 (26.1)	1.00	0.43
			C/T	60 (51.7)	71 (46.4)	1.08 (0.51–2.28)	
			C/C	23 (19.8)	42 (27.4)	1.70 (0.69–4.17)	

<sup>a</sup>Adjusted for age and sex.

<sup>b</sup>*p*-Value corresponding to a codominant model.

CI, confidence interval; MAF, minor allele frequency; *n*, number of subjects; OR, odds ratios; SNP, single-nucleotide polymorphism.

(OR = 3.23, 95% CI = 0.90–11.61, *p* = 0.073). To confirm the possible role of *WDR3* in thyroid cancer incidence, a second genotype analysis was performed in 402 patients and 479 control subjects in a second phase association analysis. In this case we genotyped only the rs3754127, rs3765501, and rs4658973 SNPs (SNPs 3, 6, and 8, respectively) because, ac-

cording to our initial study, these polymorphisms served as tag SNPs for haplotype association analysis of the *WDR3* gene with thyroid cancer. The haplotypes combining the SNPs 3, 6, and 8 are shown in Table 3. In agreement with our initial results, in this study the CAT haplotype, which corresponds to Hap III of the first study, showed a different distribution

TABLE 2. DISTRIBUTION OF INFERRED HAPLOTYPES IN THE *WDR3* GENE, AND THEIR ASSOCIATION WITH THYROID CANCER

Haplotype	SNPs <sup>a</sup>										Haplotype frequencies		OR <sup>b</sup> (95% CI)	p
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Control subjects, n = 118	Patients, n = 157		
Hap I	C	G	C	A	C	G	T	T	T	T	0.5203	0.4672	1.00	—
Hap II	T	A	T	C	T	A	C	G	G	C	0.4231	0.4398	1.18 (0.74–1.87)	0.49
Hap III	T	A	C	C	T	A	C	T	G	C	0.0254	0.0464	3.23 (0.90–11.61)	0.073
Hap IV	C	A	C	A	C	G	T	T	T	T	0.0178	0.0296	1.48 (0.34–6.44)	0.61
Others <sup>c</sup>											0.0134	0.0170	—	—

<sup>a</sup>SNPs as referred in Figure 1 and Table 1.

<sup>b</sup>Adjusted for age and sex.

<sup>c</sup>Rare haplotypes of frequencies <0.01.

TABLE 3. HAPLOTYPE ANALYSIS OF SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS 3, 6, AND 8 REFERRED IN FIGURE 1 IN THE CONTROL GROUP, TOTAL THYROID CANCER PATIENTS, AND PAPILLARY AND FOLLICULAR THYROID CANCER PATIENTS

Haplotype			Haplotype frequency									
SNP <sup>a</sup>			Control subjects, n = 479		Patients, n = 402		PTC, n = 339		FTC, n = 59			
3	6	8	OR <sup>b</sup> (95% CI)	p	OR <sup>b</sup> (95% CI)	p	OR <sup>b</sup> (95% CI)	p	OR <sup>b</sup> (95% CI)	p	OR <sup>b</sup> (95% CI)	p
C	G	T	0.5428	0.527	1	—	0.5268	1	—	0.5127	1	—
T	A	G	0.4295	0.4303	1.08 (0.87–1.34)	0.49	0.4307	1.09 (0.86–1.37)	0.48	0.4407	1.11 (0.69–1.78)	0.68
C	A	T	0.0255	0.0401	1.85 (0.97–3.55)	0.063	0.0395	2.00 (1.02–3.92)	0.044	0.0466	1.44 (0.38–5.45)	0.59
Others <sup>c</sup>			0.0022	0.0026	—	—	0.0030	—	—	0.0000	—	—

<sup>a</sup>SNPs as referred in Figure 1 and Table 1.

<sup>b</sup>Adjusted for age and sex.

<sup>c</sup>Rare haplotypes of frequencies <0.01.

FTC, follicular thyroid carcinoma; PTC, papillary thyroid carcinoma.

between patients and control subjects. The thyroid cancer risk estimated for this haplotype almost reached statistical significance (OR = 1.85, 95% CI = 0.97–3.55, *p* = 0.063). Stratification of haplotype data by histological type of thyroid cancer revealed a significant association of CAT haplotype with PTC (OR = 2.00, 95% CI = 1.02–3.92, *p* = 0.044) (Table 3), which likely is a manifestation of the nonstratified data. Moreover, the lack of haplotype association found with FTC might be due to the reduced number of follicular cases.

Next, we examined if *WDR3* haplotypes were related to the clinicopathological characteristics in the patient group. The results are shown in Table 4. No differences in the distribution of haplotypes were found for sex or type of thyroid cancer, PTC and FTC; however, the distribution of haplotypes was different between patients with age of diagnosis ≤45 and >45 years (*p* = 0.0192).

On the basis of the association studies described above, we reasoned that, if *WDR3* plays any role in thyroid cancer development, expression of *WDR3* might be affected in thyroid cancer. To test this hypothesis, we carried out RT-PCR and Western blot analyses in a human thyroid normal cell line, and in nine human thyroid cancer cell lines from different origins: two PTC, three FTC, and four anaplastic thyroid carcinomas. Semi-quantitative RT-PCR analysis was performed amplifying both exons 3–4 and exons 13–15 from the

*WDR3* mRNA. As it is shown in Figure 2 both segments of the mRNA were successfully amplified in all cell lines analyzed (Fig. 2A). The analysis of *WDR3* expression by Western blotting revealed a band of 103 kDa corresponding to the estimated full-length of the protein. Expression of *WDR3* in thyroid cancer cell lines was higher than in the thyroid normal cell line, except in CAL-62 (see Fig. 2B). Quantification of the Western blot signal has shown a relative increase of *WDR3* in the thyroid cancer cells, with a range of 6–106-fold. Correlation of the Western blot signal with RT-PCR amplification referred to exons 3–4 of the *WDR3* cDNA can be observed (Fig. 2). These results show that the *WDR3* gene is upregulated in thyroid cancer cells, suggesting its possible implication in thyroid cancer tumorigenesis.

Discussion

This study was based on our previous finding that suggested the involvement of chromosome 1p12 as a suscepti-

TABLE 4. RELATION OF HAPLOTYPES OF SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS 3, 6, AND 8 OF THE *WDR3* GENE WITH THE CLINOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS IN THYROID CANCER PATIENTS

	Haplotype <sup>a</sup> frequency			p <sup>b</sup>
	CGT	TAG	CAT	
Age				
>45 (n = 205)	0.5779	0.3852	0.0343	
<45 (n = 194)	0.4783	0.4728	0.0465	0.0192
Sex				
Male (n = 90)	0.4872	0.4722	0.0406	
Female (n = 312)	0.5384	0.4183	0.0400	0.4654
Type cancer				
Follicular (n = 59)	0.5127	0.4407	0.0466	
Papillary (n = 339)	0.5268	0.4307	0.0395	0.9387

<sup>a</sup>Haplotypes are equivalent to haplotypes specified in Table 3.

<sup>b</sup>Chi-square test.

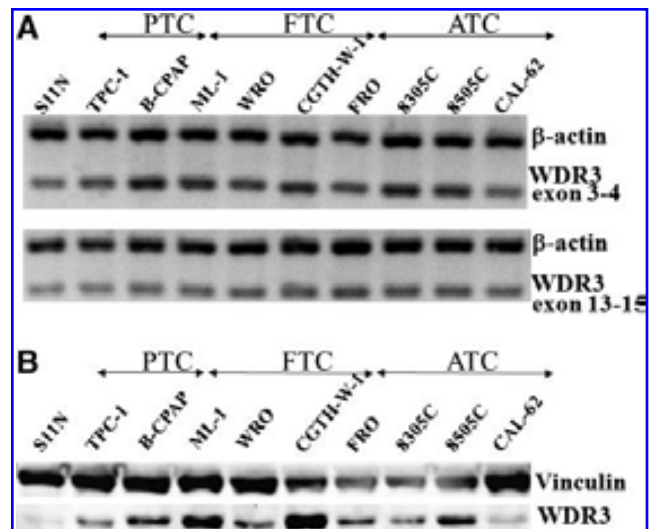


FIG. 2. Expression of *WDR3* in human thyroid cell lines. (A) Semiquantitative RT-PCR of *WDR3* mRNA in 10 human cell lines. RT-PCR of  $\beta$ -actin mRNA served as quantitative control. (B) Western blot analysis of *WDR3* protein; expression of vinculin served as a loading control. PTC, papillary thyroid carcinoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; ATC, anaplastic thyroid carcinoma.

bility region for thyroid cancer (5). Here, we have identified the *WDR3* gene, which maps in this region, as a susceptibility locus for thyroid cancer in a Spanish population. Additionally, we have observed altered expression of the *WDR3* gene in thyroid cancer cell lines.

The case-control association studies have shown similar results in each of the two phases of the study, and an increased risk to thyroid cancer was revealed by haplotype analysis. In the second phase of the study, the sample size was enlarged to 402 patients and 479 control subjects to ensure enough power for the study, and from the four inferred haplotypes the CAT haplotype showed an OR of 1.85 (95% CI=0.97–3.55,  $p=0.063$ ) (see Table 3). The OR for this haplotype was increased (OR=2.00, 95% CI=1.05–3.92,  $p<0.044$ ) when only PTC patients were taken into account. Further, a different distribution of haplotypes related with age of diagnosis ( $p=0.0192$ ) was observed in the patient group. These results would suggest that *WDR3* could play a role in the histological differentiation of thyroid cancer, and in its etiology related to age.

Examination of *WDR3* expression in thyroid cancer cell lines revealed that the *WDR3* is upregulated in eight of the nine thyroid cancer cell lines used. These results support our association studies indicating that the *WDR3* gene can be considered a susceptibility factor for thyroid cancer in the studied population. To our knowledge, this is one of the first studies describing a genetic risk factor for thyroid cancer. Recently, the *FOXE1* gene has also been reported to confer thyroid cancer susceptibility, both in sporadic PTC and radiation-related PTC (24,25).

Altogether, our findings will require further work to uncover the biological significance of *WDR3*. Although the specific function of *WDR3* is unknown, this gene is a member of the WD-repeats genes that are involved in cell cycle progression and signal transduction (12). A role of *WDR3* in ribosome biogenesis has just been reported (26). The authors of this report proposed that increased expression of *WDR3* will promote cancer cell proliferation through the disruption of ribosome synthesis pathway. Previous reports have also shown that expression of different WD-repeat proteins was altered in some types of cancer (19,21). Overall, these studies suggest that WD-repeat genes could contribute to cancer development.

In conclusion, here we provide evidence indicating that *WDR3* is a susceptibility gene for thyroid cancer. The investigation was done in a relative large group of patients from a Spanish population, but other populations should be investigated to determine the implication of *WDR3* in thyroid cancer risk of the general population. This study also shows that *WDR3* is upregulated in thyroid cancer cells, which could have consequences in prevention and treatment of thyroid cancer. Therefore, additional studies to understand the possible role of *WDR3* in the etiology of thyroid tumorigenesis are required.

### Acknowledgments

The authors thank all the subjects participated in this study; the members of the Nuclear Medicine Service, Hospital Vall d'Hebron (Barcelona), and the Endocrinology Unit of the Hospital Josep Trueta (Girona) for providing patient blood samples; and Dr. R. Melillo and Dr. M. Santoro, University of Naples (Italy), Dr. R. Ciampi, University of Pisa (Italy), and

Dr. Ludwig Hieber, German Research Center for Environmental Health (Germany), for sending some of the thyroid cancer cell lines. Gisselle Pérez, Aida Baida, Eddy González-Flores, and Cristian Valiente actively participated in collecting and preparing the samples for genotype analysis. This work was partially funded by the Spanish Ministry of Education and Science (project SAF2007-6338) and the Generalitat de Catalunya (CIRIT, 2009SGR-725). A. Akdi and E.-M. Giménez were supported by a predoctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona.

### Disclosure Statement

The authors declare that no competing financial interests exist.

### References

- Sherman SI 2003 Thyroid carcinoma. *Lancet* **361**:501–511.
- Kondo T, Ezzat S, Asa SL 2006 Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* **6**: 292–306.
- Hunt JL 2002 Molecular mutations in thyroid carcinogenesis. *Am J Clin Pathol* **118** Suppl:S116–S127.
- Baida A, Farrington SM, Galofre P, Marcos R, Velazquez A 2005 Thyroid cancer susceptibility and *THRA1* and *BAT-40* repeats polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**:638–642.
- Baida A, Akdi M, Gonzalez-Flores E, Galofre P, Marcos R, Velazquez A 2008 Strong association of chromosome 1p12 loci with thyroid cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**:1499–1504.
- Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la CA 2008 Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:7269–7274.
- 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 CA, Hrafnkelsson J, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K 2009 Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet* **41**:460–464.
- He H, Nagy R, Liyanarachchi S, Jiao H, Li W, Suster S, Kere J, de la CA 2009 A susceptibility locus for papillary thyroid carcinoma on chromosome 8q24. *Cancer Res* **69**:625–631.
- Claudio JO, Liew CC, Ma J, Heng HH, Stewart AK, Hawley RG 1999 Cloning and expression analysis of a novel WD repeat gene, *WDR3*, mapping to 1p12-p13. *Genomics* **59**: 85–89.
- van der Voorn L, Ploegh HL 1992 The WD-40 repeat. *FEBS Lett* **307**:131–134.
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ 1999 The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* **24**:181–185.
- Li D, Roberts R 2001 WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci* **58**:2085–2097.
- Davis L, Engebrecht J 1998 Yeast dom34 mutants are defective in multiple developmental pathways and exhibit decreased levels of polyribosomes. *Genetics* **149**:45–56.

14. Bieche I, Champeme MH, Matifas F, Cropp CS, Callahan R, Lidereau R 1993 Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. *Cancer Res* **53**:1990–1994.
15. Zhang J, Glatfelder AA, Taetle R, Trent JM 1999 Frequent alterations of evolutionarily conserved regions of chromosome 1 in human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* **111**:119–123.
16. Tamimi Y, Ziebart K, Desaulniers N, Dietrich K, Grundy P 2007 Identification of a minimal region of loss on the short arm of chromosome 1 in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer* **46**:327–335.
17. Chen Y, Liou CP, Tseng HH, Jan YJ, Li CF, Tzeng CC 2009 Deletions of chromosome 1p and 15q are associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumors. *J Formos Med Assoc* **108**:28–37.
18. Chernova OB, Hunyadi A, Malaj E, Pan H, Crooks C, Roe B, Cowell JK 2001 A novel member of the WD-repeat gene family, WDR11, maps to the 10q26 region and is disrupted by a chromosome translocation in human glioblastoma cells. *Oncogene* **20**:5378–5392.
19. Honore B, Baandrup U, Nielsen S, Vorum H 2002 Endonuclein is a cell cycle regulated WD-repeat protein that is up-regulated in adenocarcinoma of the pancreas. *Oncogene* **21**:1123–1129.
20. Proikas-Cezanne T, Waddell S, Gaugel A, Frickey T, Lupas A, Nordheim A 2004 WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene* **23**:9314–9325.
21. Silva FP, Hamamoto R, Nakamura Y, Furukawa Y 2005 WDRPUH, a novel WD-repeat-containing protein, is highly expressed in human hepatocellular carcinoma and involved in cell proliferation. *Neoplasia* **7**:348–355.
22. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ 2005 Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**:263–265.
23. Sole X, Guino E, Valls J, Iiesta R, Moreno V 2006 SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* **22**:1928–1929.
24. Landa I, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Inglada-Perez L, Schiavi F, Leskela S, Pita G, Milne R, Maravall J, Ramos I, Andia V, Rodriguez-Poyo P, Jara-Albarran A, Meoro A, del PC, Arribas L, Iglesias P, Caballero J, Serrano J, Pico A, Pomares F, Gimenez G, Lopez-Mondejar P, Castello R, Merante-Boschin I, Pelizzo MR, Mauricio D, Opocher G, Rodriguez-Antona C, Gonzalez-Neira A, Matias-Guiu X, Santisteban P, Robledo M 2009 The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS Genet* **5**:e1000637.
25. Takahashi M, Saenko VA, Rogounovitch TI, Kawaguchi T, Drozd VM, Takigawa-Imamura H, Akulevich NM, Ratana-jaraya C, Mitsutake N, Takamura N, Danilova LI, Lushchik ML, Demidchik YE, Heath S, Yamada R, Lathrop M, Matsuda F, Yamashita S 2010 The FOXE1 locus is a major genetic determinant for radiation-related thyroid carcinoma in Chernobyl. *Hum Mol Genet* 2010 Apr 5 [Epub ahead of print].
26. McMahon M, Ayllón V, Panov KI, O'Connor R 2010 Ribosomal 18S RNA processing by the IGF-I-responsive WDR3 protein is integrated with p53 function in cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 2010 Apr 14 [Epub ahead of print].

Address correspondence to:

*Antonia Velázquez, Ph.D.*

*Departament de Genètica i de Microbiologia*

*Edifici Cn*

*Universitat Autònoma de Barcelona*

*08193 Bellaterra*

*Spain*

*E-mail: antonia.velazquez@uab.es*



## **ANEXO 2**







1 **Abstract**

2 **Background:** Genetic factors are important in thyroid cancer susceptibility. Recently it  
3 has been reported that there are associations of certain chromosome regions with thyroid  
4 cancer. In this case-control study, we sought to determine if there is an association  
5 analysed the association between differentiated thyroid cancer (DTC) and variants in  
6 regions of chromosome 8q.

7 **Methods:** We used a case-control association design in a population of 877 individuals  
8 (398 patients with sporadic DTC and 479 healthy controls). The iPLEX technology was  
9 applied to analyse seven single nucleotide polymorphisms (SNPs) in chromosome 8q:  
10 two SNPs that map at 8q24, previously reported as risk markers in different types of  
11 cancer, two SNPs in the thyrotropin-releasing hormone receptor gene (*TRHR*), and three  
12 SNPs in the thyroglobulin gene (*TG*). Risk assessment was done by unconditional  
13 regression analysis.

14 **Results:** The two SNPs that map at 8q24, rs6983267 and rs1447295, and the two *TRHR*  
15 polymorphisms showed no association with DTC. No association was also found for the  
16 exon 33 *TG* polymorphism. The two *TG* polymorphisms in the exon 10-12 cluster were  
17 associated with an increased risk of DTC (dominant model OR = 1.80, 95% CI = 1.30-  
18 2.50,  $P < 0.001$ ), however.

19 **Conclusions:** In this study we show for the first time that the *TG* gene is a susceptibility  
20 factor for thyroid cancer. Although these conclusions are based on a large population,  
21 additional studies are warranted to support these data.

22

23

24

## 1 **Introduction**

2 Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy (1). Papillary thyroid  
3 carcinoma (PTC) and follicular thyroid carcinoma (FTC) are subtypes of differentiated  
4 thyroid carcinoma (DTC), representing more than 90 percent of thyroid neoplasms (2).  
5 Environmental factors and common genetic variants are relevant for thyroid cancer  
6 susceptibility (2, 3). As a result, several recent studies identified these risk factors and  
7 their interactions, using both genome-wide and candidate gene approaches. These  
8 studies have shown genetic variants on chromosome 9q22.33 and 14q13.3 to be related  
9 to thyroid cancer. Interestingly, these regions contain thyroid differentiation genes  
10 *FOXE1* and *NKX2-1*, respectively (4, 5). Additional polymorphisms at 5q33 and at 1p12  
11 are also susceptibility loci for thyroid cancer (6, 7) and, more recently, the *WDR3* gene  
12 that maps in 1p12 was found to be associated with the disease (8). In chromosome 8q24,  
13 three independent regions have been related to risk of different types of cancers,  
14 including thyroid cancer, but no known genes reside in that susceptibility region (9, 10).  
15 Using a linkage analysis approach, He *et al* 2009 identified a susceptibility locus  
16 (*AK023948*) for thyroid cancer that resides in the thyroglobulin (*TG*) gene on 8q24 (11).  
17 It is relevant to mention that amplification of 8q24 in several types of cancer was  
18 already established before the susceptibility studies emerged (12, 13).

19 Because the 8q23 and 8q24 regions contain genes involved in thyroid function and  
20 based on the indication that genetic variation in 8q24 is associated with cancer, we  
21 postulated that chromosome 8q23 and 8q24 may be associated with thyroid cancer. In  
22 the present study we carried out a case-control association analysis using seven single  
23 nucleotide polymorphisms (SNPs) of this chromosome regions: the rs4129682 and  
24 rs7823804 SNPs that are located in the thyrotropin-releasing hormone receptor (*TRHR*)

1 gene that maps at 8q23, the rs180223, rs853326 and rs2076740 SNPs that are in the *TG*  
2 gene that maps at 8q24, and two additional SNPs, rs6983267 and rs1447295 at 8q24  
3 that have been reported as risk factors for different types of cancer.

4

## 5 **Materials and Methods**

### 6 *Subjects*

7 The study was carried in a Spanish population of 881 unrelated subjects who were  
8 recruited during a five year period (2004-2008). All subjects participating in this study  
9 reported no previous whole-body exposure to radiation, were of Caucasian origin with  
10 Spanish ancestors, and were from the same geographic area.

11 The patients consisted of 398 individuals who were newly diagnosed with  
12 differentiated thyroid cancer (DTC) at two Spanish hospitals (Hospital Vall d'Hebron,  
13 Barcelona; and Hospital Josep Trueta, Girona). There were 309 females and 89 males  
14 (mean age  $\pm$  SD,  $47.06 \pm 15.48$ ). Clinical information of patients was obtained from the  
15 medical records. There were 339 with PTC (84.3%) and 59 patients with FTC (14.7%).  
16 The control individuals were 479 volunteers without a diagnosis of cancer. There were  
17 283 females and 196 males. Their mean age of  $45.99 \pm 17.24$  years was comparable to  
18 the mean age of the patients ( $P = 0.09$ ). All control subjects were from the same  
19 geographic area as the patients. Informed consent from all participants and clearances  
20 from the Ethical Committees of our institutions were obtained.

### 21 *Selection of SNPs*

22 The selection of SNPs was based on the information available in literature and  
23 public databases. The rs6983267 and rs1447295 SNPs have been extensively analysed  
24 in different cancer risk association studies. The rs4129682 and rs7823804

1 polymorphisms are located in the only intron of the *TRHR* gene. Finally, the *TG*  
2 polymorphisms rs180223 (exon 10, Ser734Ala), rs853326 (exon 12, Met1028Val) and  
3 rs2076740 (exon 33, Arg1999Trp) are common genetic variants, and were previously  
4 used in association studies of autoimmune thyroid disease (AITD) (14). More  
5 information of the selected SNPs used in this study is listed in Table 1.

#### 6 *DNA isolation and genotyping*

7 DNA for both cases and controls was isolated from peripheral blood, using the  
8 standard phenol-chloroform method. For some controls (<20% of control subjects),  
9 DNA was obtained from saliva samples using the Oragene DNA Self-Collection kit  
10 (DNA Genotek, Canada).

11 All genotype analyses were performed at the Spanish National Genotyping Center  
12 (CeGen) using the iPLEX technology (Sequenom, Inc). To guarantee genotyping  
13 reliability double genotyping was performed of 10% of randomly selected samples in  
14 multiple 96 well plates. In addition, two HapMap reference trios were incorporated in  
15 plates, and the genotype concordance and correct Mendelian inheritance were verified.

#### 16 *Statistical analysis*

17 Comparison of sex proportion between cases and control groups and the Hardy-  
18 Weinberg equilibrium investigation of the genotype distribution in the control  
19 population were examine using the chi-square test with a 5% level of significance.  
20 Mean ages of cases and controls were compared by the Mann-Whitney test. Thyroid  
21 cancer risk was assessed using unconditional logistic regression analyses, adjusted for  
22 sex and age, to determine the odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI).

1 The Haploview software (15) was used to examine the linkage disequilibrium (LD)  
2 between SNPs. A logistic regression analyses was used to obtain the adjusted OR and  
3 95% CI of haplotypes.

4 The SNPStats software (16) with a 5% level of significance was used to perform all  
5 statistical analyses.

6 The power of the study was calculated using the CaTS Power Calculator software  
7 (17). For the sample size of the study and type error 1 of 0.05, the power was 95% to  
8 detect an OR of 1.41 considering a minor allele frequency (MAF) of 0.40, and 1.95  
9 considering a MAF of 0.05.

10

## 11 **Results**

12 In this case-control association study, we genotyped seven SNPs of chromosome 8q  
13 in 398 patients with DTC and 479 control individuals. The group of patients consisted  
14 of 309 females and 89 males with a mean age of  $47.06 \pm 15.48$  years. The control  
15 subjects were 283 females and 196 males with a mean age of  $45.99 \pm 17.24$  years. In  
16 our studied population, case and control groups had a different distribution of sexes  
17 (77.6 % and 59.1 % of females in cases and controls, respectively;  $P < 0.001$ ). In the  
18 control group, within gender there was no difference in genotype distribution (data not  
19 shown). Thus, the different sex proportion in cases and control groups in our population  
20 did not influence successive association studies.

21 The allele frequencies and genotype distribution of the SNPs are shown in Table 2.  
22 The data are referred to the analysis of the total group of patients and after subgrouping  
23 for type of thyroid cancer, PTC and FTC. Significant differences in allele frequencies  
24 between cases and control were found for two of the three *TG* nonsynonymous SNPs,

1 rs180223 and rs853326, ( $P < 0.01$ ). However, no difference of allele frequency was  
2 observed for the rest of the SNPs studied.

3 In controls, the genotype distributions were according to the Hardy-Weinberg  
4 equilibrium for six of the seven polymorphisms ( $P = 0.13-0.71$ ), except for rs6983267  
5 ( $P = 0.01$ ). In this case, genotyping errors were not considered to be the cause of the  
6 Hardy-Weinberg deviation (see Materials and Methods). A correction for this deviation  
7 was used when comparing allele frequencies between cases and controls for this SNP  
8 (Armitage's trend test).

9 According to the different allele frequency found between cases and controls for two  
10 of the three *TG* polymorphisms studied, rs180223 and rs853326, we also found a  
11 significant association of these *TG* SNPs with thyroid cancer (see Table 2, codominant  
12 model). These two polymorphisms are in strong LD ( $r^2 = 0.9956$ ) and they displayed the  
13 same genotype distribution in our population. Consequently, the risk associated with the  
14 variant allele of both loci was very similar. For example, as shown in Table 2, in the  
15 total of cases the significant OR for the Ser734Ala polymorphism (rs180223) was 1.78  
16 (95% CI = 1.26-2.52) for the heterozygous and 1.86 (95% CI = 1.20-2.87) for the  
17 homozygous variant Ala ( $P = 0.001$ ), which indicates that one copy of the variant allele  
18 is sufficient to confer thyroid cancer susceptibility. The same was observed for the  
19 Met1028Val polymorphism (rs853326). In addition, both polymorphisms showed  
20 significant ORs in PTC and FTC. In contrast, no risk association was found for the third  
21 *TG* polymorphism studied, Arg1999Trp (rs2076740). Moreover, this polymorphism  
22 showed no linkage with the *TG* SNPs rs180223 and rs853326 ( $r^2 < 0.0004$ ). The four  
23 additional polymorphisms investigated also showed no association with thyroid cancer  
24 susceptibility (see Table 2).

1 For the *TG* Ser734Ala (rs180223) and Met1028Val (rs853326) polymorphisms, the  
2 risk estimates are the same for homozygous variant and heterozygous (see above)  
3 suggesting a dominant model of inheritance. Therefore, we evaluated risk assessment  
4 according a dominant model for these polymorphisms and after stratification of the  
5 patients group for PTC and FTC. The results are presented in Table 3. For both  
6 polymorphisms, a statistically significant association of the variant allele carriers was  
7 observed with thyroid cancer and when the two types of thyroid cancer, PTC and FTC,  
8 when examined separately. Furthermore, the risk estimates for all the patients  
9 (Ser734Ala OR = 1.82, 95% CI = 1.31-2.52,  $P < 0.001$ ) and for the patient subgroups  
10 separately, PTC (Ser734Ala OR = 1.73, 95% CI = 1.23-2.44,  $P = 0.001$ ) and FTC  
11 (Ser734Ala OR = 2.45, 95% CI = 1.17-5.13,  $P = 0.01$ ), were similar. Further  
12 investigation of haplotype combining the two significant SNPs of *TG*, rs180223  
13 (Ser734Ala) and rs853326 (Met1028Val), inferred only two haplotypes with a  
14 frequency of 99.9%. As shown in Table 3 the haplotype composed by the two variant  
15 alleles, TT, had a different distribution between cases and controls with a statistically  
16 significant OR of 1.41 (95% CI = 1.14-1.75,  $P = 0.001$ ) for the total group of patients.

17 Subsequently, we analysed the possible interaction between either of the two *TG*  
18 SNPs that were associated with DTC (rs180223 or rs853326) in our population and the  
19 *TG* SNPs showing lack of association (rs2076740). No interaction was found  
20 (interaction  $P$ -value = 0.39).

21 Finally, because the higher incidence of thyroid cancer in women and the prognostic  
22 indicator of age at diagnosis in thyroid cancer, the risk for the *TG* Ser734Ala (rs180223)  
23 and Met1028Val (rs853326) polymorphisms in women and men subgroups and  
24 according to age was estimated. The results are shown in Table 4, where it can be



1 observed that in women, regardless of age at diagnosis, the ORs were significant  
2 according the dominant model for both *TG* polymorphisms. In this case, the risk  
3 estimates were similar to the ones found in the total population (see Table 3). Similar  
4 trends were observed for <45 years old males. However, the *TG* SNPs, rs180223 and  
5 rs853326, did not showed association with DTC in  $\geq 45$  years old males.

6

## 7 **Discussion**

8 In this study we have evaluated the association of genetic variants at different loci  
9 on chromosome 8q23 and 8q24 with DTC; including two SNPs markers previously  
10 reported to be associated with different types of cancer, and polymorphisms in two  
11 genes involved in thyroid function, *TRHR* and *TG*.

12 Several studies have shown that common genetic variants at rs6983267 and  
13 rs1447295 are related to colorectal, breast and prostate cancer (9, 18-22). In our study  
14 neither of these polymorphisms were significantly associated with DTC. This is the first  
15 analysis of the rs1447295 in thyroid cancer. Therefore, these results showing lack of  
16 association suggest that this SNP is not a risk marker for DTC. On the other hand, a  
17 previous study showed that the rs6983267 SNP was associated with thyroid cancer (10)  
18 which is in contradiction with our results in a Spanish population. We have analysed a  
19 total of 402 patients and 479 controls. Therefore, the size of our study had sufficient  
20 power to detect an association if it was present. Nevertheless, genetic differences  
21 between the populations studied could explain the discrepancies between the our study  
22 and the previous study (10) although random chance events are possible.

23 We found no evidence for an association of variants of the *TRHR* gene with DTC in  
24 our Spanish population. Thyrotropin releasing hormone has a central role in regulating

1 the secretion of TSH via the hypothalamic-pituitary-thyroid axis (23). This role makes  
2 *TRHR* a good candidate for thyroid cancer association studies. Mutations in *TRHR* can  
3 cause hypothyroidism (24) and, recently, a genome-wide association study revealed that  
4 *TRHR* is an important gene for regulation of lean body mass (25). Therefore since our  
5 study is the first to look for an association of *TRHR* variants with DTC, it would be  
6 important to confirm that variants of *TRHR* are not thyroid cancer risk factors in other  
7 populations. In addition, variants of the *TRHR* other than those studied here should be  
8 analysed to determine if they are risk factors for thyroid cancer.

9 There is little information regarding an association of *TG* variants with thyroid  
10 cancer. Thyroglobulin (Tg) is the most highly expressed protein in the thyroid gland and  
11 plays important roles in thyroid function. Loss of function germline mutations in *TG*  
12 have been identified and linked to thyroid dysmorphogenesis (26, 27). However, to our  
13 knowledge, only one report exists describing the influence of a genetic variant of *TG* in  
14 the probability of developing thyroid cancer (28). Here we have analysed three common  
15 *TG* SNPs that introduce missense aminoacid changes in the protein and that previously  
16 were identified to be associated with autoimmune thyroid disease (14).

17 Two of the three *TG* SNPs studied here are in the exon 10-12 cluster and the other  
18 SNPs in the exon 33. Both the exon 10-12 cluster and the exon 33 are in different LD  
19 blocks. The exon 33 SNP was not associated with DTC. We found, however, that allele  
20 frequencies in the exon 10-12 cluster were statistically different in DTC compared to  
21 control subjects ( $P < 0.01$ ) indicating that *TG* is a susceptibility gene for thyroid cancer.  
22 Except for males over the age of 44, these *TG* variants were associated with DTC in  
23 males and females. We do not have a clear explanation for the data in males over the  
24 age of 44 being different from younger males and females but it may be related

1 decreased statistical power. Haplotype analysis combining the two *TG* risk SNPs,  
2 rs180223 and rs853326, showed that the risk estimate for the haplotype generated with  
3 the variant alleles of the two polymorphisms was similar to the OR found individually  
4 for each polymorphism. An explanation for these results is that any of these  
5 nonsynonymous SNPs could be responsible for the thyroid cancer susceptibility, but  
6 there are not sufficient data to resolve what the susceptibility locus is. Alternatively,  
7 neither of these polymorphisms may be directly responsible for the *TG* associated  
8 susceptibility, but they define a risk haplotype in the *TG* gene where rs180223 and  
9 rs853326 act as *TG* risk markers for thyroid cancer. In a previous study, linkage  
10 analysis on 26 families with PTC identified one susceptibility locus where both *TG* and  
11 Src-like adaptor (*SLA*) genes are located (11). In fact, the *SLA* gene is encoded by an  
12 intronic sequence on the antisense strand of the *TG* gene.

13 The size of our study population is sufficient to conduct association analysis using  
14 common genetic variants. On the other hand, since the majority of polymorphisms in  
15 the current study have not been analyzed previously in thyroid cancer association  
16 studies, other populations should be studied to confirm these results. In the case of the  
17 genetic variants of the *TG* gene associated with thyroid cancer in a Spanish population,  
18 replicated results will define the *TG* gene as a susceptibility factor for thyroid cancer. In  
19 addition, further studies will be required to determine the role of genetic variants in the  
20 *TG* gene in thyroid cancer susceptibility.

21

## 22 **Acknowledgements**

23 We thanks all the subjects participating in this study, as well as to the members of  
24 the Nuclear Medicine Service, Hospital Vall d'Hebron (Barcelona) and the

1 Endocrinology Unit of the Hospital Josep Trueta (Girona) for providing patient blood  
2 samples, Eddy González-Flores, Esteban-Mariano Giménez, Wilser García-Quispes and  
3 Cristian Valiente actively participated in collecting and preparing the samples for  
4 genotype analysis. This work was partially funded by the Spanish Ministry of Education  
5 and Science (project SAF2007-6338) and the Generalitat de Catalunya (CIRIT;  
6 2009SGR-725). A. Akdi was supported by a predoctoral fellowship from the Universitat  
7 Autònoma de Barcelona.

8

### 9 **Disclosure Statement**

10 The authors declare that no competing financial interests exist.

11

### 12 **Corresponding Author**

13 Antonia Velázquez, Departament de Genètica i de Microbiologia, Edifici Cn,  
14 Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. Phone: 34-935813111; Fax:  
15 34-935812387; E-mail: [antonia.velazquez@uab.es](mailto:antonia.velazquez@uab.es)

16

### 17 **References**

- 18 **1.** Sherman SI 2003 Thyroid carcinoma. *Lancet* **361**:501-511.
- 19 **2.** Kondo T, Ezzat S, Asa SL 2006 Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-  
20 cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* **6**:292-306.
- 21 **3.** Sturgis EM, Li G 2009 Molecular epidemiology of papillary thyroid cancer: in  
22 search of common genetic associations. *Thyroid* **19**:1031-1034.
- 23 **4.** Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A,  
24 Bergthorsson JT, He H, Blondal T, Geller F, Jakobsdottir M, Magnusdottir DN,

- 1 Matthiasdottir S, Stacey SN, Skarphedinsson OB, Helgadottir H, Li W, Nagy R,  
2 Aguillo E, Faure E, Prats E, Saez B, Martinez M, Eyjolfsson GI, Bjornsdottir  
3 US, Holm H, Kristjansson K, Frigge ML, Kristvinsson H, Gulcher JR, Jonsson  
4 T, Rafnar T, Hjartarsson H, Mayordomo JI, de la CA, Hrafnkelsson J,  
5 Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K 2009 Common variants on 9q22.33  
6 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet*  
7 **41**:460-464.
- 8 **5.** Landa I, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Inglada-Perez L, Schiavi F,  
9 Leskela S, Pita G, Milne R, Maravall J, Ramos I, Andia V, Rodriguez-Poyo P,  
10 Jara-Albarran A, Meoro A, del PC, Arribas L, Iglesias P, Caballero J, Serrano J,  
11 Pico A, Pomares F, Gimenez G, Lopez-Mondejar P, Castello R, Merante-  
12 Boschini I, Pelizzo MR, Mauricio D, Opocher G, Rodriguez-Antona C,  
13 Gonzalez-Neira A, Matias-Guiu X, Santisteban P, Robledo M 2009 The variant  
14 rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the  
15 recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS Genet* **5**:e1000637.
- 16 **6.** Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la CA  
17 2008 Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and  
18 predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:7269-  
19 7274.
- 20 **7.** Baida A, Akdi M, Gonzalez-Flores E, Galofre P, Marcos R, Velazquez A 2008  
21 Strong association of chromosome 1p12 loci with thyroid cancer susceptibility.  
22 *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**:1499-1504.

- 1 **8.** Akdi A, Gimenez EM, Garcia-Quispes W, Pastor S, Castell J, Biarnes J, Marcos  
2 R, Velazquez A 2010 WDR3 gene haplotype is associated with thyroid cancer  
3 risk in a Spanish population. *Thyroid* **20**:803-809.
- 4 **9.** Yeager M, Orr N, Hayes RB, Jacobs KB, Kraft P, Wacholder S, Minichiello  
5 MJ, Fearnhead P, Yu K, Chatterjee N, Wang Z, Welch R, Staats BJ, Calle EE,  
6 Feigelson HS, Thun MJ, Rodriguez C, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S,  
7 Schumacher FR, Giovannucci E, Willett WC, Cancel-Tassin G, Cussenot O,  
8 Valeri A, Andriole GL, Gelmann EP, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF Jr,  
9 Hoover R, Hunter DJ, Chanock SJ, Thomas G 2007 Genome-wide association  
10 study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nat Genet*  
11 **39**:645-649.
- 12 **10.** Wokolorczyk D, Gliniewicz B, Sikorski A, Zlowocka E, Masojc B, Debniak T,  
13 Matyjasik J, Mierzejewski M, Medrek K, Oszutowska D, Suchy J, Gronwald J,  
14 Teodorczyk U, Huzarski T, Byrski T, Jakubowska A, Gorski B, van de WT,  
15 Walczak S, Narod SA, Lubinski J, Cybulski C 2008 A range of cancers is  
16 associated with the rs6983267 marker on chromosome 8. *Cancer Res* **68**:9982-  
17 9986.
- 18 **11.** He H, Nagy R, Liyanarachchi S, Jiao H, Li W, Suster S, Kere J, de la CA 2009  
19 A susceptibility locus for papillary thyroid carcinoma on chromosome 8q24.  
20 *Cancer Res* **69**:625-631.
- 21 **12.** Cher ML, Bova GS, Moore DH, Small EJ, Carroll PR, Pin SS, Epstein JI, Isaacs  
22 WB, Jensen RH 1996 Genetic alterations in untreated metastases and androgen-  
23 independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and  
24 allelotyping. *Cancer Res* **56**:3091-3102.

- 1 **13.** Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, Visakorpi T 1998 Genetic alterations in  
2 hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol* **153**:141-148.
- 3 **14.** Ban Y, Greenberg DA, Concepcion E, Skrabanek L, Villanueva R, Tomer Y  
4 2003 Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with  
5 susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. *Proc Natl Acad*  
6 *Sci U S A* **100**:15119-15124.
- 7 **15.** Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ 2005 Haploview: analysis and visualization  
8 of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**:263-265.
- 9 **16.** Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V 2006 SNPStats: a web tool for  
10 the analysis of association studies. *Bioinformatics* **22**:1928-1929.
- 11 **17.** Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M 2006 Joint analysis is more  
12 efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association  
13 studies. *Nat Genet* **38**:209-213.
- 14 **18.** Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson  
15 BA, Sigurdsson A, Benediktsdottir KR, Cazier JB, Sainz J, Jakobsdottir M,  
16 Kostic J, Magnusdottir DN, Ghosh S, Agnarsson K, Birgisdottir B, Le RL,  
17 Olafsdottir A, Blondal T, Andresdottir M, Gretarsdottir OS, Bergthorsson JT,  
18 Gudbjartsson D, Gylfason A, Thorleifsson G, Manolescu A, Kristjansson K,  
19 Geirsson G, Isaksson H, Douglas J, Johansson JE, Balter K, Wiklund F, Montie  
20 JE, Yu X, Suarez BK, Ober C, Cooney KA, Gronberg H, Catalona WJ,  
21 Einarsson GV, Barkardottir RB, Gulcher JR, Kong A, Thorsteinsdottir U,  
22 Stefansson K 2006 A common variant associated with prostate cancer in  
23 European and African populations. *Nat Genet* **38**:652-658.

- 1 **19.** Freedman ML, Haiman CA, Patterson N, McDonald GJ, Tandon A,  
2 Waliszewska A, Penney K, Steen RG, Ardlie K, John EM, Oakley-Girvan I,  
3 Whittemore AS, Cooney KA, Ingles SA, Altshuler D, Henderson BE, Reich D  
4 2006 Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in  
5 African-American men. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:14068-14073.
- 6 **20.** Schumacher FR, Feigelson HS, Cox DG, Haiman CA, Albanes D, Buring J,  
7 Calle EE, Chanock SJ, Colditz GA, Diver WR, Dunning AM, Freedman ML,  
8 Gaziano JM, Giovannucci E, Hankinson SE, Hayes RB, Henderson BE, Hoover  
9 RN, Kaaks R, Key T, Kolonel LN, Kraft P, Le Marchand L, Ma J, Pike MC,  
10 Riboli E, Stampfer MJ, Stram DO, Thomas G, Thun MJ, Travis R, Virtamo J,  
11 Andriole G, Gelmann E, Willett WC, Hunter DJ 2007 A common 8q24 variant  
12 in prostate and breast cancer from a large nested case-control study. *Cancer Res*  
13 **67**:2951-2956.
- 14 **21.** Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Kemp Z, Spain S,  
15 Penegar S, Chandler I, Gorman M, Wood W, Barclay E, Lubbe S, Martin L,  
16 Sellick G, Jaeger E, Hubner R, Wild R, Rowan A, Fielding S, Howarth K, Silver  
17 A, Atkin W, Muir K, Logan R, Kerr D, Johnstone E, Sieber O, Gray R, Thomas  
18 H, Peto J, Cazier JB, Houlston R 2007 A genome-wide association scan of tag  
19 SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat*  
20 *Genet* **39**:984-988.
- 21 **22.** Fletcher O, Johnson N, Gibson L, Coupland B, Fraser A, Leonard A, dos Santos  
22 Silva I, Ashworth A, Houlston R, Peto J 2008 Association of genetic variants at  
23 8q24 with breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**:702-705.



- 1   **23.**   Yamada M, Mori M 2008 Mechanisms related to the pathophysiology and  
2           management of central hypothyroidism. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **4**:683-  
3           694.
- 4   **24.**   Collu R, Tang J, Castagne J, Lagace G, Masson N, Huot C, Deal C, Delvin E,  
5           Faccenda E, Eidne KA, Van Vliet G 1997 A novel mechanism for isolated  
6           central hypothyroidism: inactivating mutations in the thyrotropin-releasing  
7           hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* **82**:1561-1565.
- 8   **25.**   Liu XG, Tan LJ, Lei SF, Liu YJ, Shen H, Wang L, Yan H, Guo YF, Xiong DH,  
9           Chen XD, Pan F, Yang TL, Zhang YP, Guo Y, Tang NL, Zhu XZ, Deng HY,  
10          Levy S, Recker RR, Papasian CJ, Deng HW 2009 Genome-wide association and  
11          replication studies identified TRHR as an important gene for lean body mass.  
12          *Am J Hum Genet* **84**:418-423.
- 13   **26.**   Vono-Toniolo J, Rivolta CM, Targovnik HM, Medeiros-Neto G, Kopp P 2005  
14          Naturally occurring mutations in the thyroglobulin gene. *Thyroid* **15**:1021-1033.
- 15   **27.**   Caputo M, Rivolta CM, Esperante SA, Gruneiro-Papendieck L, Chiesa A,  
16          Pellizas CG, Gonzalez-Sarmiento R, Targovnik HM 2007 Congenital  
17          hypothyroidism with goitre caused by new mutations in the thyroglobulin gene.  
18          *Clin Endocrinol (Oxf)* **67**:351-357.
- 19   **28.**   Matakidou A, Hamel N, Popat S, Henderson K, Kantemiroff T, Harmer C,  
20          Clarke SE, Houlston RS, Foulkes WD 2004 Risk of non-medullary thyroid  
21          cancer influenced by polymorphic variation in the thyroglobulin gene.  
22          *Carcinogenesis* **25**:369-373.
- 23
- 24

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

**Table 1** Single nucleotide polymorphisms studied on chromosome 8q in a case-control study of thyroid cancer in a Spanish population.

SNP	Genomic position <sup>a</sup>	Locus	Allele variant	Gene polymorphism
rs4129682	110191315	TRHR	C/T	Intron 1
rs7823804	110198554	TRHR	G/T	Intron 1
rs6983267	128482487	8q24	G/T	Intergenic
rs1447295	128554220	8q24	A/C	Intergenic
rs180223	133969434	TG	G/T	Ser734Ala
rs853326	133979156	TG	C/T	Met1028Val
rs2076740	134053240	TG	C/T	Arg1999Trp

<sup>a</sup>Position according to NCBI reference sequence.

TRHR: thyrotropin-releasing hormone receptor.

TG: thyroglobulin.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12

1 **Table 2** Allele frequencies, genotype distribution and risk analysis of seven SNPs on chromosome 8q for their relationship with thyroid  
 2 cancer in a case-control study in a Spanish population.

SNP	MAF		$P^a$	SNP Genotype	Controls N(%) N=479	Patients N(%) N=398	Odds Ratio <sup>b</sup> ( 95% CI)	$P^c$	PTC N(%) N=339	Odds Ratio <sup>b</sup> ( 95% CI)	$P^c$	FTC N(%) N=59	Odds Ratio <sup>b</sup> ( 95% CI)	$P^c$
	Controls N=479	Patients N=398												
<i>TRHR</i>														
rs4129682	0.48	0.47	0.91	C/C	127 (26.9)	100 (25.2)	1.00		80 (23.7)	1.00		20 (33.9)	1.00	
				C/T	240 (50.9)	217 (54.8)	1.04 (0.73-1.49)		184 (54.6)	1.14 (0.78-1.66)		33 (55.9)	0.82 (0.41-1.66)	
				T/T	105 (22.2)	79 (19.9)	0.85 (0.55-1.33)	0.59	73 (21.7)	1.01 (0.64-1.61)	0.75	6 (10.2)	<b>0.25 (0.08-0.75)</b>	<b>0.02</b>
rs7823804	0.36	0.34	0.55	T/T	186 (39.4)	165 (41.7)	1.00		135 (40.1)	1.00		30 (50.9)	1.00	
				G/T	233 (49.4)	189 (47.7)	0.83 (0.61-1.15)		163 (48.4)	0.86 (0.61-1.21)		26 (44.1)	0.71 (0.36-1.38)	
				G/G	53 (11.2)	42 (10.6)	0.85 (0.51-1.42)	0.52	39 (11.6)	0.96 (0.56-1.64)	0.68	3 (5.1)	0.27 (0.07-1.09)	0.12
<i>8q24</i>														
rs6983267	0.47	0.47	0.81*	G/G	142 (30.7)	114 (29.3)	1.00		91 (27.6)	1.00		23 (39.0)	1.00	
				G/T	204 (44.1)	187 (48.1)	1.11 (0.78-1.58)		161 (48.8)	1.22 (0.83-1.78)		26 (44.1)	0.82 (0.40-1.66)	
				T/T	117 (25.3)	88 (22.6)	0.98 (0.64-1.48)	0.76	78 (23.6)	1.12 (0.72-1.73)	0.6	10 (16.9)	0.40 (0.15-1.05)	0.15
rs1447295	0.07	0.08	0.33	C/C	414 (86.8)	334 (85)	1.00		285 (84.8)	1.00		49 (86.0)	1.00	
				A/C	60 (12.6)	54 (13.7)	1.00 (0.64-1.56)		47 (14.0)	1.00 (0.63-1.59)		7 (12.3)	0.85 (0.32-2.25)	
				A/A	3 (0.6)	5 (1.3)	2.43 (0.46-12.80)	0.56	4 (1.2)	1.98 (0.37-10.67)	0.73	1 (1.8)	2.21 (0.14-35.11)	0.81
<i>TG</i>														
rs180223 (Ser734Ala)	0.40	0.47	< <b>0.01</b>	G/G	177 (37.3)	109 (27.7)	1.00		94 (28.1)	1.00		15 (25.4)	1.00	
				G/T	214 (45.1)	197 (50.1)	<b>1.78 (1.26-2.52)</b>		166 (49.7)	<b>1.69 (1.17-2.43)</b>		31 (52.5)	<b>2.79 (1.28-6.08)</b>	

				T/T	83 (17.5)	87 (22.1)	<b>1.86 (1.20-2.87)</b>	<b>0.001</b>	74 (22.2)	<b>1.86 (1.18-2.93)</b>	<b>&lt;0.01</b>	13 (22.0)	1.78 (0.67-4.72)	<b>0.02</b>	
rs853326 (Met1028Val)	0.40	0.47	<b>&lt;0.01</b>	C/C	178 (37.5)	110 (27.8)	1.00		95 (28.2)	1.00		15 (25.4)	1.00		
				C/T	213 (44.9)	199 (50.2)	<b>1.78 (1.26-2.52)</b>		168 (49.9)	<b>1.69 (1.18-2.43)</b>		31 (52.5)	<b>2.85 (1.31-6.20)</b>		
				T/T	83 (17.5)	87 (22.0)	<b>1.85 (1.19-2.85)</b>	<b>0.001</b>	74 (22.0)	<b>1.84 (1.17-2.90)</b>	<b>&lt;0.01</b>	13 (22.0)	1.82 (0.69-4.81)	<b>0.02</b>	
rs2076740 (Arg1999Trp)	0.39	0.36	0.35	C/C	172 (38.0)	153 (41.1)	1.00		129 (40.7)	1.00		24 (43.6)	1.00		
				C/T	210 (46.5)	166 (44.6)	0.86 (0.61-1.21)		142 (44.8)	0.85 (0.60-1.22)		24 (43.6)	0.98 (0.48-2.01)		
				T/T	70 (15.5)	53 (14.2)	0.90 (0.56-1.44)	0.68	46 (14.5)	0.90 (0.54-1.47)	0.67	7 (12.7)	1.01 (0.34-3.01)	1.0	

<sup>a</sup>Two-sided chi-square test for distribution of allelic frequencies \*Compared by the Armitage's trend test.

<sup>b</sup>Adjusted for age and sex.

<sup>c</sup>P-value corresponding to codominant model.

N. Number of subjects.

MAF. Minor allele frequency.

PTC. Papillary thyroid carcinoma.

FTC. Follicular thyroid carcinoma.

1

2

1 **Table 3** Genotype distribution and risk estimates according to the dominant model, and haplotype analysis of thyroglobulin SNPs,  
 2 rs180223 and rs853326 in a case-control study of thyroid cancer in a Spanish population.

3

<b>TG Genotype</b>		Controls	Pacients			PTC			FTC		
SNP	SNP Genotype	N (%)	N (%)	Odds Ratio <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>b</sup>	N=339	Odds Ratio <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>b</sup>	N=59	Odds Ratio <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>b</sup>
		N=479	N=398	(95% CI)			(95% CI)			(95% CI)	
rs180223 (Ser734Ala)	G/G	177(37.3)	109 (27.7)	1.00		94(28.1)	1.00		15(25.4)	1.00	
	G/T-T/T	297(62.7)	284 (72.3)	<b>1.80 (1.30-2.50)</b>	<b>&lt;0.001</b>	240(71.9)	<b>1.73 (1.23-2.44)</b>	<b>0.001</b>	44(74.6)	<b>2.45 (1.17-5.13)</b>	<b>0.01</b>
rs853326 (Met1028Val)	C/C	178(37.5)	110 (27.8)	1.00		95(28.2)	1.00		15(25.4)	1.00	
	C/T-T/T	296(62.5)	286 (72.2)	<b>1.80 (1.30-2.49)</b>	<b>&lt;0.001</b>	242(71.8)	<b>1.73 (1.23-2.44)</b>	<b>0.001</b>	44(74.6)	<b>2.50 (1.19-5.22)</b>	<b>0.01</b>
<b>TG Haplotype</b>											
rs180223	rs853326	Controls	Pacients	Odds Ratio <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>c</sup>	PTC	Odds Ratio <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>c</sup>	FTC	Odds Ratio <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>c</sup>
				(95% CI)			(95% CI)			(95% CI)	
G	C	0.5998	0.5289	1.00	---	0.5310	1.00	---	0.5169	1.00	---
T	T	0.4002	0.4711	<b>1.40 (1.13 - 1.74)</b>	<b>&lt;0.01</b>	0.4690	<b>1.39 (1.11-1.74)</b>	<b>&lt;0.01</b>	0.4831	1.43 (0.92-2.24)	0.11

<sup>a</sup>Adjusted for age and sex.

<sup>b</sup>P-value corresponding to dominant model.

<sup>c</sup>P-value corresponding to haplotype association.

N. number of subjects.

PTC: papillary thyroid cancer.

FTC: follicular thyroid cancer.

4  
5  
6  
7

1 **Table 4.** rs180223 and rs853326 thyroglobulin genotypes and thyroid cancer risk in women and men according to age at diagnosis.

2

<b>TG Genotype</b>		<45				≥45			
SNP	SNP Genotype	Controls	Pacients	Odds Ratio ( 95% CI)	<i>P</i> <sup>a</sup>	Controls N=119	Pacients N=154	Odds Ratio ( 95% CI)	<i>P</i> <sup>a</sup>
Women		N=164	N=153						
rs180223 (Ser734Ala)	G/G	74 (45.7)	49 (32.2)	1.00		42 (35.6)	38 (24.8)	1.00	
	G/T-T/T	88 (54.3)	103 (67.8)	<b>1.77 (1.12-2.80)</b>	<b>0.01</b>	76 (64.4)	115 (75.2)	1.67 (0.99-2.83)	0.05
rs853326 (Met1028Val)	C/C	74 (45.7)	49 (32.0)	1.00		43 (36.4)	38 (24.7)	1.00	
	C/T-T/T	88 (54.3)	104 (68.0)	<b>1.78 (1.13-2.83)</b>	<b>0.01</b>	75 (63.6)	116 (75.3)	<b>1.75 (1.04-2.96)</b>	<b>0.04</b>
Men		N=89	N=39			N=107	N=50		
rs180223 (Ser734Ala)	G/G	31 (35.2)	8 (20.5)	1.00		30 (28.3)	14 (28.6)	1.00	
	G/T-T/T	57 (64.8)	31 (79.5)	2.11 (0.86-5.14)	0.09	76 (71.7)	35 (71.4)	0.99 (0.47-2.09)	0.97
rs853326 (Met1028Val)	C/C	31 (35.6)	8 (20.5)	1.00		30 (28.0)	15 (30.0)	1.00	
	C/T-T/T	56 (64.4)	31 (79.5)	2.15 (0.88-5.24)	0.08	77 (72.0)	35 (70.0)	0.91 (0.43-1.90)	0.80

<sup>a</sup>P-value corresponding to dominant model.

N. number of subjects.

3