



Facultat de Ciències
Departament de Genètica i de Microbiologia
Grup de Mutagènesi

POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y CÁNCER DE TIROIDES

TESIS DOCTORAL

Gisselle Pérez Machado

2006

POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y CÁNCER DE TIROIDES

Memoria presentada por Giselle Pérez Machado,
para optar al grado de Doctora en Genética por
la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)
Julio de 2006

VºBº
Director de la Tesis

Dr. Ricard Marcos Dauder
Catedrático de Genética

Queremos encontrar la verdad, no importa dónde ésta nos lleve. Pero para encontrar esta verdad necesitamos imaginación y escepticismo, no tendremos temor a especular, pero seremos cuidadosos en separar la especulación de la verdad.

Carl Sagan

A mi familia porque siempre me apoyó aunque les doliese que me alejara

A Cuba, por más de un motivo

“Yo te quiero libre, libre y con amor
libre de la sombra, pero no del sol
Yo te quiero libre y con buena fe
para que conduzcas tu preciosa sed
y te quiero libre, libre de verdad
libre como el sueño de la libertad
La libertad tiene alma clara
y solo canta cuando va batiendo
alas vuela y canta, libertad
La libertad, nació sin dueño
y no hay razón para robarle cada
sueño”

Silvio Rodríguez

El trabajo está hecho y, aún me queda una página en blanco, curiosamente, siendo la última es de las primeras que se lee. Lleva el sello que ha caracterizado este trabajo: RETO.

El primer obstáculo fue cruzar el mar, el segundo la brevedad del tiempo, ahora el espacio limitado, debo constreñir en esta única página más de un sentimiento.

Empiezo por agradecer a todas las personas sanas y enfermas, que dispuestas a participar en el estudio, posibilitaron el trabajo. Por supuesto al Dr. Pere Galofré que proveyó la arcilla que hemos cocido entre muchos.

Especial mención al Departamento de Genética de la Universitat Autònoma de Barcelona, pues gracias a su soporte económico pude realizar el trabajo.

Agradezco muy especialmente a Ricard que siempre me ha tendido una mano y desveló un camino de aprendizaje y esfuerzos del que no quisiera apartarme. Gracias le doy por la sabiduría de hacernos sentir especial a cada uno de nosotros.

También extendiendo la gratitud a Nilo, que con su confianza me comprometió a esforzarme.

Agradezco a Amadeu su atención oportuna y la disposición a la lectura y, corrección del manuscrito.

Infinitas gracias a los Umbert y los Gea, que al insertarme en sus vidas moldearon una familia en Cataluña, para mí.

Agradezco a Alba su envidiable visión y cobijarme bajo su talento, a Lourdes unirse a mis manos en un esfuerzo común. Me place sobremanera que Leiliane se hiciera inseparable, que dudas y aciertos me acercaran a Aída, que Martí aceptara que también SOY AMERICA, que Emma se involucrara en mi pesar, que Anna asimilara mi "escandalizante" idiosincrasia, que Arturo me dejara asomar a sus rincones de España. Me conmueve Susana me mantenga en el recuerdo, que la generosidad de Elsa me llegara desde lejos, que Elky entendiera mi humor y que Musta fuera tan empecinadamente noble.

Con todos los del Grupo, he contraído una deuda, han sido cómplices en regalarme la satisfacción de vivir en enriquecedora armonía, de respirar solidaridad y, ratificar que lo que verdaderamente cuenta en la vida, no son las cosas que tengo, sino las personas que me rodean.

Agradezco a los que me hicieron sentir a gusto en "casa" y que viera la convivencia como una suerte. Debo a los amigos cubanos de uno y otro lado el enredarme en mis raíces, a los de aquí les debo hacerme fácil el estar, a los de allá sumarle ganas al volver..... Omi, Giselle, Osmany y Mandy...los más implicados.

Finalmente me sobrecojo y no dudo del lugar indiscutible que ocupa mi madre por su ejemplo y bondad.

Un sitio especial para mí esposo por el sacrificio que le ha supuesto la lejanía, por mantener con su amor la inspiración en los días más amargos y las noches más oscuras.

Hace unos años Serrat me prestó su verso para expresar mis ansias de desandar este camino, ahora Violeta pone en mi voz su rima:

"GRACIAS A LA VIDA QUE ME HADADO TANTO"

ÍNDICE

Abreviaturas	i
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El tiroides.....	1
1.1.1. Patología de la glándula tiroidea.....	3
1.1.2. El cáncer de tiroides.....	4
1.1.2.1. Base molecular del cáncer de tiroides	6
1.1.2.2. Factores de riesgo	10
1.1.2.3. Tratamiento.....	19
1.1.2.4. Factores de pronóstico	19
1.2. Marcadores de susceptibilidad	20
1.2.1. Daño en el DNA y mecanismos de reparación	22
1.2.2. Genes de reparación y SNPs.....	24
1.2.2.1. Genes del mecanismo de reparación BER.....	24
1.2.2.1.1. Gen <i>XRCC1</i>	24
1.2.2.1.2. Gen <i>OGG1</i>	28
1.2.2.2. Genes del mecanismo de reparación por recombinación homóloga	30
1.2.2.2.1. Gen <i>XRCC2</i>	32
1.2.2.2.2. Gen <i>XRCC3</i>	33
1.2.3. Genes relacionados con la biosíntesis de hormonas tiroideas	34
1.2.3.1. Gen <i>TSHR</i>	34
1.2.3.2. Gen <i>TG</i>	38
1.2.4. Gen de control del ciclo celular	41
1.2.4.1. Gen <i>PTPRJ</i>	41
1.3. Estudios de asociación de los marcadores de susceptibilidad y el cáncer de tiroides	44
1.3.1. Evaluación de los marcadores de susceptibilidad.....	44
1.3.1.1 Métodos convencionales.....	44
1.3.1.1.1. PCR.....	45
1.3.1.2. PCR en tiempo real en la detección de SNPs	46
1.3.1.2.1. Diseños de sondas FRET	53
1.3.1.2.2. Detección de mutaciones con sondas FRET	54
1.3.1.2.3. Análisis de curvas de disociación	55
1.3.1.3. PCR alelo específica.....	57
1.3.1.3.1. Cebadores LNA. Aplicación en PCR alelo específica a tiempo real	59
1.3.2. Análisis estadístico de SNP en estudios epidemiológicos.....	62
1.3.2.1. Estudios de asociación alélica	62
1.3.2.2. Análisis simultáneo de múltiples <i>loci</i>	63
2. OBJETIVOS	65
3. MATERIALES Y MÉTODOS	67
3.1. Población estudiada.....	67

3.2. Cuestionarios	67
3.3. Metodologías experimentales	68
3.3.1. Extracción de DNA	69
3.3.1.1. A partir de sangre.....	69
3.3.1.2. A partir de células de la mucosa bucal.....	72
3.3.2. Análisis de los genotipos.....	74
3.3.2.1. Análisis de los genotipos de <i>XRCC1</i>	74
3.3.2.2. Análisis de los genotipos de <i>XRCC2</i>	78
3.3.2.3. Análisis de los genotipos de <i>XRCC3</i>	80
3.3.2.4. Análisis de los genotipos de <i>OGGI</i>	83
3.3.2.5. Análisis de los genotipos de <i>TG</i>	84
3.3.2.6. Análisis de los genotipos de <i>TSHR</i>	87
3.3.2.7. Análisis de los genotipos de <i>PTPRJ</i>	91
3.3.3. Secuenciación.....	93
3.4. Análisis estadístico	93
4. RESULTADOS	95
4.1. Descriptiva de la población.....	95
4.2. Genotipos de genes del mecanismo BER.....	99
4.2.1. Polimorfismos de <i>XRCC1</i>	99
4.2.2. Polimorfismos de <i>OGGI</i>	107
4.3. Genotipos de genes de reparación RH.....	109
4.3.1. Polimorfismos de <i>XRCC2</i>	109
4.3.2. Polimorfismos de <i>XRCC3</i>	111
4.4. Genotipos de genes relacionados con la síntesis hormonal del tiroides.....	116
4.4.1. Polimorfismos de <i>TG</i>	116
4.4.2. Polimorfismos de <i>TSHR</i>	125
4.5. Genotipos de genes relacionados con el ciclo celular	129
4.5.1. Polimorfismo de <i>PTPRJ</i>	129
4.6. Interacción entre polimorfismos de distintos genes	131
4.6.1. Interacciones entre genes de reparación	132
4.6.2. Interacciones entre genes de reparación y de metabolismo.....	135
4.7. Interacción del genotipo con la edad	138
4.8. Interacción del genotipo con factores ambientales.....	139
5. DISCUSIÓN.....	145
6. CONCLUSIONES	189
7. BIBLIOGRAFÍA	191
8. ANEXOS	233
ANEXO 1.....	233
ANEXO 2.....	239
ANEXO 3.....	242

ABREVIATURAS

a	Años
AC	Aberración cromosómica
AMPC	Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
AP	Sitio apurínico
APEI	Enzima endonucleasa AP
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspártico
AS PCR	PCR alelo específica
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BER	Reparación por Escisión de Bases
BRCTI	Dominio C terminal del gen de susceptibilidad al cáncer de mama
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Controles
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CHO	Célula de ovario de hámster
csp	Cantidad suficiente para
CRE	Elemento de respuesta al AMPC
CREB	Factor de transcripción de unión a elementos de respuesta a cAMP
Cys	Cisteína
d	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
g, mg, µg, ng, Kg	Gramo, miligramo, microgramo, nanogramo, kilogramo
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERCC1	Complemento cruzado de reparación por escisión
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
FEN-1	Endonucleasa flap 1
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico

Gly	Glicina
GSP	Proteína G alfa
GST	Glutación S transferasa
His	Histidina
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
Ile	Isoleucina
K	Ión potasio
kDa	Kilodalton
L, dL, mL, µL	Litro, decilitro, mililitro, microlitro
Leu	Leucina
Lys	Lisina
M, mM, µM	Molar, milimolar, micromolar
MEN 2a	Enfermedad Múltiple Endocrina tipo 2a
Met	Metionina
min	Minutos
N	Concentración normal
Na	Ión sodio
NADP	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NAT2	N-acetil transferasa-2
NER	Mecanismo de reparación del DNA por escisión de nucleótidos
NIS	Transportador de yodo dependiente de sodio
NLS	Secuencia de localización nuclear
nm	Nanómetro
nmol	Nanomol
NTD	Dominio N terminal
OGG1	Oxoguanina-DNA glicosilasa 1
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	<i>Odds Ratio</i>
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno
PARP	Poli-(ADP-ribosa) polimerasa
PCNA	Antígeno nuclear de células proliferantes

pb, Kb, Mb	Pares de bases, kilobases, megabases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína quinasa A
Pmol	Picomol
PNK	Polinucleótido quinasa
PoIβ	Polimerasa beta
PTK	Quinasa de tirosina
PTP	Fosfatasa de tirosina
Pro	Prolina
PSA	Persulfato amónico
PTPRJ	Receptor de fosfatasa de tirosina tipo j
RH	Recombinación homóloga
RI	Radiación ionizante
RNH	Reparación por recombinación de extremos no homólogos
rpm	Revoluciones por minuto
RR	Riesgo relativo
RT-PCR	PCR retrotranscriptasa
RNA	Ácido ribonucleico
sd	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
s	Segundos
E.T.	Error estándar
Ser	Serina
SCE	Intercambio entre cromátidas hermanas
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TE	Tampón Tris EDTA
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
TBG	Globulina de enlace a la tiroxina
TBPA	Prealbúmina de unión a la tiroxina

TG	Tiroglobulina
TPO	Tiroperoxidasa
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
TSH	Hormona estimulante del tiroides
TSHR	Receptor de TSH
U	Unidad
V	Volumen
Val	Valina
vs	<i>Versus</i>
W	Vatios
XRCC	Complemento cruzado de reparación de los rayos X
Δ	Incremento
8-OHdG	8 oxoguanina ó 7,8-dihidro-8- oxoguanina

Introducción



1. INTRODUCCIÓN

1.1. El tiroides

La glándula tiroidea recibe este nombre por su similitud con un escudo (del griego *thyreos*: escudo), ya que se pensaba constituía un auténtico escudo para la laringe, de la misma forma que lo constituye el cartílago tiroides (Cian *et al.*, 2004).

Es una glándula endocrina típica de los vertebrados que, en el hombre constituye la mayor de las glándulas de secreción interna. Es un órgano de origen endodérmico impar y simétrico, formado por dos lóbulos unidos por un istmo de tejido tiroideo; en el 20% de los casos presenta un lóbulo piramidal. Está situado medialmente en la cara anterior del cuello (Figura 1) y, por debajo del cartílago cricoides. Estando todo encapsulado se mantiene unido por ligamentos a la cara anterior de la tráquea. El peso en el adulto es de 25 a 30 g. A nivel histológico, está formado por los folículos tiroideos, unidades de estructura esférica formadas por células foliculares en su exterior y una sustancia coloide interna. En los folículos se produce la síntesis de las hormonas T3 (triyodotironina), T3 reversa (biológicamente inactiva) y T4 (tiroxina). Entre los folículos encontramos también otro tipo de células, las parafoliculares o células C, en donde se produce la calcitonina.

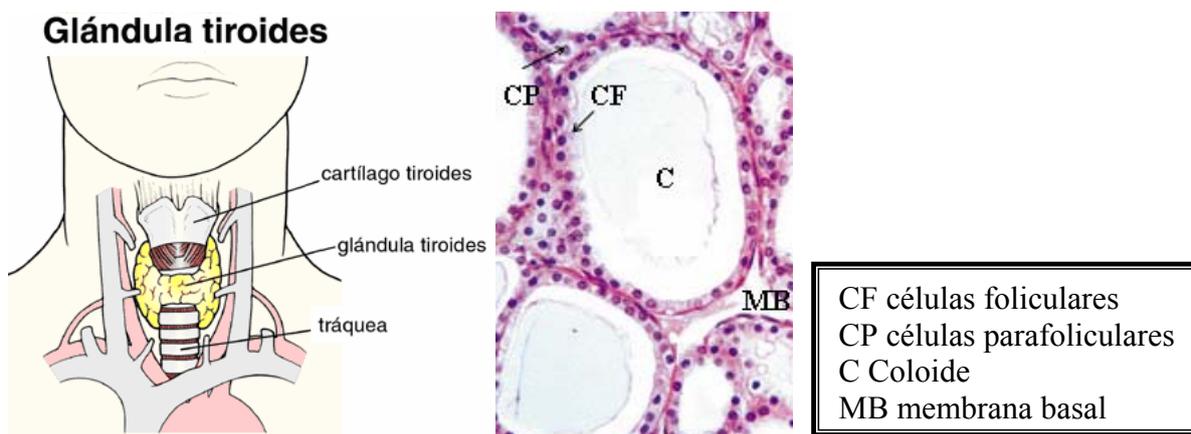


Figura 1: Ubicación anatómica e histología tiroidea (modificado de <http://www.biosbcc.net/barron/physiology/endo> y www.med.umich.edu)

Los niveles plasmáticos de estas hormonas son bastante estables a lo largo de la vida, excepto en el período neonatal y en caso de algunas patologías.

Las hormonas tiroideas circulan, mayoritariamente, unidas a proteínas plasmáticas: TBG, TBPA y a la albúmina (con una unión no específica). Las células del organismo sólo responden a las hormonas tiroideas libres, preferentemente a la T3. El mecanismo de acción de las hormonas tiroideas depende de la unión, preferentemente de T3, a los receptores de la hormona tiroidea a nivel del núcleo celular. Estos receptores son proteínas nucleares ácidas asociadas con la cromatina (factores de transcripción) que, al ser activados pueden unirse a una secuencia específica del DNA localizada cerca de la región del promotor del gen diana.

Estas hormonas son de gran importancia en la regulación del metabolismo basal (procesos energéticos) y del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Asimismo, inducen la diferenciación de tejidos, participan en el desarrollo fetal, en el proceso de mielinización de las fibras nerviosas, favorecen el crecimiento normal neuronal y el desarrollo del encéfalo, y amplifican la respuesta autónoma simpática.

La función tiroidea se regula tanto por mecanismos extrínsecos (fundamentalmente por la hormona estimulante del tiroides (TSH)), como por mecanismos intrínsecos (autorregulación tiroidea).

La TSH es una glucoproteína que se segrega en las células tirotropas hipofisarias. La interacción con su receptor activa el complejo AMPc-proteína G, la cascada Ca⁺⁺/fosfatidil-inositol/ácido araquidónico y las fosforilaciones de proteínas celulares. Estimula la síntesis de hormonas tiroideas, puesto que incrementa la captación de yodo (I), la síntesis de tiroglobulina (TG), su yodación, acoplamiento, endocitosis y proteólisis.

La secreción de TSH está regulada a su vez por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), que se sintetiza en las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventriculares hipotalámicos. La TRH estimula la síntesis y secreción de la TSH a través de la cascada Ca⁺⁺/fosfatidil-inositol. La capacidad de respuesta de la hipófisis a la TRH está regulada por los niveles de T4 y T3 (Mayayo *et al.*, 1998).

Existen otros mecanismos reguladores extrínsecos de menor importancia mediados por norepinefrina, serotonina, estrógenos, dopamina, somatostatina, hormona del crecimiento y glucocorticoides.

La autorregulación tiroidea es un mecanismo intrínseco de regulación mediante el cual el tiroides puede modular la cantidad de yodo que capta y la cantidad de hormona tiroidea que sintetiza, con independencia de TSH. En respuesta a un aumento brusco de la administración de yodo, reduce su transporte activo y, por ende, las concentraciones de yodo intratiroideo por debajo de niveles inhibitorios, alcanzándose así una nueva situación de equilibrio. Disminuye a su vez la formación de AMPc en respuesta a TSH, la síntesis de TG, la yodación y la liberación de hormonas tiroideas (Efecto WOLF-CHAIKOFF) (Eng *et al.*, 1999).

1.1.1. Patologías del tiroides

Las patologías de la glándula tiroidea son variadas, tanto en su etiopatogenia, como en su severidad, pronóstico y tratamiento.

Se manifiestan como una alteración (exceso o defecto) de la secreción hormonal y como un aumento del tamaño de la glándula, de forma independiente o conjunta. Así, la secreción disminuida de la hormona origina hipotiroidismo (o mixedema), y la secreción excesiva produce hipertiroidismo (o tirotoxicosis).

El aumento del tamaño de la glándula puede ser generalizado o focal. Si es generalizado será un bocio. Si es focal puede crecer formando un nódulo o varios. Éstos se originan a partir de células foliculares y se pueden detectar en glándulas tiroideas de tamaño normal y en bocios. El 95% de los nódulos tiroideos son benignos, pero algunos derivan hacia la malignidad (carcinoma tiroideo).

El grupo más vulnerable a estas alteraciones son las mujeres, en éstas la presencia de una disfunción tiroidea alcanza cifras que triplican a las observadas en los hombres.

Las patologías tiroideas pueden ser tratadas médica y/o quirúrgicamente. El hipotiroidismo, hipertiroidismo con bocio difuso o nodular pequeño, el bocio uni o multinodular, son ejemplos de patologías de resolución generalmente médica. Por su parte, el bocio de gran tamaño o sintomático, el hipertiroidismo refractario al tratamiento médico y el cáncer de tiroides son de tratamiento quirúrgico (León, 2005).

1.1.2. El cáncer de tiroides

El carcinoma tiroideo es un cáncer poco frecuente, ya que representa el 2 % de todos los tipos de neoplasias registrados en el mundo (WHO, 1993; ACS, 2005), excluyendo las cutáneas. Sin embargo, algunas estadísticas indican que su incidencia ha ido aumentando durante la segunda mitad del siglo XX y, en particular en el último decenio. Algunos países han llegado a quintuplicar el número de casos respecto a décadas precedentes (NCI, 2004). El cáncer tiroideo se puede presentar asociado con otros cánceres de origen hereditario y síndromes familiares, aunque se trata de un porcentaje muy pequeño de casos. A pesar de su baja incidencia, tiene gran trascendencia en endocrinología, ya que es la neoplasia maligna más común del sistema endocrino (90 % de ellos) y contribuye en más del 50% a las muertes por cánceres endocrinos (Akslen *et al.*, 1993; Nagataki *et al.*, 2002).

Los criterios de Hedinger y Sobin (1974) para la clasificación de tumores tiroideos, adoptados por la Organización Mundial de la Salud, distinguen tres grupos de tumores: a) tumores epiteliales o derivados del epitelio folicular o parafolicular, b) tumores no epiteliales y c) otros tumores (Vassallo y Barrios, 2003) (Figura 2).

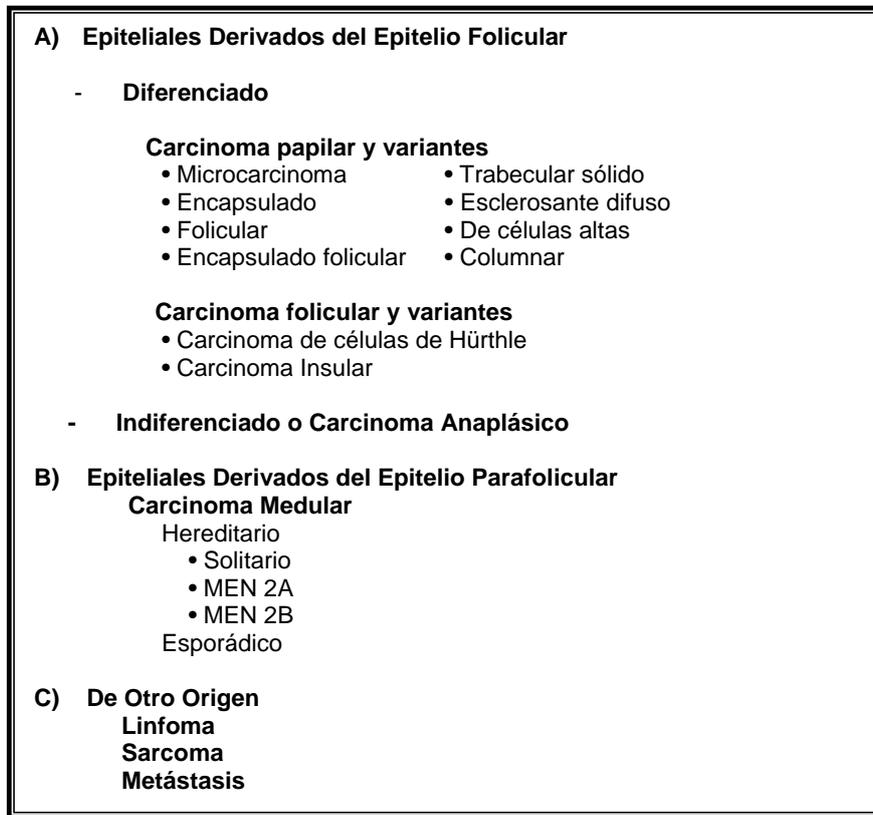


Figura 2: Clasificación del cáncer de tiroides

Los tumores epiteliales son la gran mayoría, representan el 95% de los tumores de la glándula. A su vez, entre el 70% y el 90% corresponden a cáncer papilar, del 10% al 15% al folicular, del 5% al 10% al medular, y del 2% al 5% al anaplásico. Existe una variación geográfica en cuanto a la proporción relativa de carcinomas papilar y folicular, probablemente debida al contenido de yodo en la dieta, ya que en las zonas con deficiencia de yodo se presenta un aumento en la frecuencia de carcinomas foliculares (Roque *et al.*, 1998).

La clasificación histopatológica de los tumores del tiroides es muy importante por sus implicaciones pronósticas. Los tipos histológicos más diferenciados (papilar o folicular) son sumamente tratables y, generalmente, curables. De ellos, el carcinoma papilar es el menos maligno (Vassallo y Barrios, 2003). La edad media de aparición es de 45 años, siendo más agresivo en individuos de mayor edad (McConahey *et al.*, 1986; Mazzaferri y Kloos, 2001). Suele presentar un crecimiento lento y puede extenderse fuera del tiroides, afectando especialmente a los ganglios linfáticos. Existen variedades bien diferenciadas y poco diferenciadas, siendo las últimas las más agresivas (Volante *et al.*, 2004). El carcinoma folicular es el segundo carcinoma de tiroides en frecuencia. La edad media de aparición es de 55 años, pero es más agresivo en los individuos de mayor edad. También se dan casos en individuos jóvenes, en los que se comporta como un carcinoma papilar bien diferenciado. Son tumores encapsulados con una gran tendencia a formar metástasis, con frecuencia en pulmones y huesos (Parthasarathy y Crawford, 2002). En general, se considera que el carcinoma folicular tiene peor pronóstico que el papilar (Hundahl *et al.*, 1998; Lundgren *et al.*, 2006). Dentro del cáncer folicular encontramos el adenoma de Hürtle, una variedad aún más agresiva y que hace metástasis tempranas. La tasa de supervivencia relativa general de los pacientes en Estados Unidos a los 10 años de evolución es del 93% para el cáncer papilar y del 85% para el cáncer folicular.

Los tumores poco diferenciados son muy malignos y constituyen entre el 5 y el 25% de todos los tumores tiroideos. El cáncer anaplásico es poco frecuente y suele aparecer entre los 50 a 70 años de edad, se extiende con mucha rapidez invadiendo estructuras cercanas, y la esperanza de vida tras su diagnóstico es de seis meses. La tasa de supervivencia es baja, tan sólo de un 14 % (Laxman y Crawford, 2002). El cáncer medular se produce en células parafoliculares (hiperplasia de las células C) que secretan calcitonina. Es un cáncer poco frecuente, que se presenta en la forma esporádica y

familiar. También puede formar parte de otro desorden hereditario, la neoplasia múltiple endocrina (MEN) de tipo IIA o IIB (Nix *et al.*, 2005). La edad media de aparición es de 50 años (Negri *et al.*, 2002) y es de evolución rápida, hace metástasis temprana y tiene el peor pronóstico, con una probabilidad de recuperación de sólo un 40-50% y una tasa de supervivencia del 75% (Laxman y Crawford, 2002).

En el grupo de los tumores no epiteliales se encuentran ocasionalmente los siguientes: sarcomas, linfomas, carcinomas epidermoides y teratomas, predominando los fibrosarcomas (Vassallo y Barrios, 2003).

En los últimos 4 años organizaciones como la OMS y la IARC han ido actualizando la clasificación de los cánceres del sistema endocrino (Matias-Guiu, 2005) e introduciendo las siguientes nuevas definiciones:

Carcinoma pobremente diferenciado: Neoplasia folicular con evidencia limitada de diferenciación folicular, y con morfología y comportamiento intermedio entre los carcinomas diferenciados y los indiferenciados.

Carcinoma indiferenciado: Sustituye al término anaplásico e incluye variantes morfológicas: osteoclástica, carcinosarcoma, paucicelular, linfoepitelioide.

Carcinoma medular: Incluye otras variantes morfológicas (papilar o pseudopapilar, glandular, gigantocelular, fusiforme, de células pequeñas, entre otras). Se introduce una nueva clasificación de la hiperplasia de células C (tipo neoplásico y tipo reactivo) (Albores-Saavedra, 2002).

Sin embargo, aún coexisten en la literatura los nuevos términos con los precedentes.

1.1.2.1. Base molecular del cáncer de tiroides

Todavía no se conocen del todo los mecanismos que conducen al desarrollo del cáncer, pero es un hecho demostrado que se produce la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumores y alteraciones en la expresión génica (Bergers *et al.*, 1998). Todos los genotipos tumorales comparten disfunciones de la fisiología celular que conducen a la malignidad: autosuficiencia en generar sus propios factores de crecimiento, insensibilidad a los factores inhibidores de crecimiento, resistencia a la apoptosis, capacidad replicativa ilimitada e inmortalización, angiogénesis continua, e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000).

La transformación de las células del tejido tiroideo normal en células tumorales, en las etapas más tempranas, implica la activación o expresión *de novo* de los factores proliferativos *RAS*, *BRAF*, *RET*, *NTRK*, *cMYC*, *GSP* y *TSHR* (Moretti *et al.*, 2000), la inhibición de factores que controlan el ciclo celular como son los genes supresores de tumores *p21*, *p53*, *Pax8/TTF-1* y los genes reguladores de la apoptosis *PTEN*, *MDM2*, etc y, finalmente, la disrupción en la interacción célula-célula y la inmortalización celular (Segev *et al.*, 2003).

La expresión alterada de estos factores se asocia al desarrollo de neoplasmas diferenciados que van desde adenomas (*GSP* y *TSHR*) hasta carcinomas diferenciados de tipo papilar (*MET*, *NTRK*, *RET*) y folicular (*RAS*) (Segev *et al.*, 2003). El gen *RAS* se halla alterado preferentemente en tumores en fases tempranas del desarrollo, y el *p53* una vez ya más avanzado el estadio del tumor (Bond *et al.*, 1994; Almudevar *et al.*, 2000). La expresión de *p53* es alta en carcinomas indiferenciados, pero baja en carcinomas foliculares y papilares, estando ausente en adenomas, lo cual sugiere que las alteraciones de este gen se hallan implicadas en la progresión tumoral del cáncer de tiroides. Cambios en la P53, junto con cambios en la ciclina D1, pueden ser los responsables de que un tumor diferenciado pase a ser un tumor indiferenciado y, por tanto, de peor pronóstico (Goto *et al.*, 2001).

Otros autores coinciden en que los genes supresores de tumores están implicados en etapas más tardías de la carcinogénesis (Fagin *et al.*, 1993; Moretti *et al.*, 2000) y que los tejidos son altamente inestables debido precisamente a esta causa (Shahedian *et al.*, 2001).

Los pacientes con cáncer de tiroides presentan variaciones en la expresión génica, ya sea sobreexpresión o represión (Aust *et al.*, 2001; Hermann *et al.*, 2001; Rabes, 2001;). Así, por ejemplo, la proteína Bcl-2 muestra siempre expresión en el tejido tiroideo normal peritumoral. En cambio, en los tumores su expresión es heterogénea mostrando intensidades de leves a moderadas en carcinomas papilares y foliculares y expresándose apenas en los carcinomas indiferenciados y medulares (Almudevar *et al.*, 2000). De igual forma, algunos genes involucrados directamente en la función tiroidea, como por ejemplo las quinasas de tirosina *NTRK1*, se expresan a niveles por debajo de lo normal (Rabes, 2001). La expresión del oncogén *RET* (cromosoma 10q1.2) se asocia con la presencia del síndrome MEN2 (neoplasias endocrinas múltiples de tipo 2) y del carcinoma medular tiroideo familiar. De hecho, el polimorfismo G691S de *RET* es un

marcador de riesgo de carcinoma medular de tiroides esporádico y actúa como modificador del fenotipo de la enfermedad (Robledo *et al.*, 2003).

Se han identificado mutaciones en rutas de señales celulares como la de ERK, que transmite señales mitogénicas de la membrana celular al núcleo y regula la proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Xu *et al.*, 2003). Alteraciones genéticas en los componentes de la cascada (*RET*, *RAS* Y *RAF*) producen una activación constitutiva de la vía y la subsiguiente tumorigénesis del tiroides (Williams y Smallridge, 2004; Ciampi *et al.*, 2005; Melillo *et al.*, 2005).

También se ha descrito que los carcinomas de tiroides tienen reordenaciones en el gen del factor de transcripción relacionadas con translocaciones del *PPARgamma*. Se especula que algunos cánceres de tiroides se desarrollan por la co-activación de *RET* y *RAS* y/o *RET* y *PPARgamma* (Kroll, 2004).

Otros trabajos hablan del papel de las mutaciones C1264R y C1996S del gen *TG* en la incidencia de tirocarcinomas. El hipotiroidismo y el bocio que ocasionan estas alteraciones se asocian con cáncer de tiroides (Hishinuma *et al.*, 2005).

Recientemente se ha identificado una mutación en el gen *ARLTS1* (13q14) que podría estar implicada en la leucemia mieloide crónica, en las etapas iniciales de los tumores pancreáticos y en el cáncer colorrectal, de mama, de pulmón, y de tiroides. Este gen es miembro de la superfamilia de genes *RAS* relacionados con la regulación del crecimiento celular. Representa una nueva clase de genes supresores de tumores cuyo producto “busca y destruye” las células que podrían estar a punto de convertirse en malignas. Cuando se altera, pierde esa capacidad y, con ello, da a las células malignas la oportunidad de crecer e implantarse (Calin *et al.*, 2005; De Brakeleer *et al.*, 2005).

La presencia de un elevado porcentaje de reordenamientos y translocaciones cromosómicas distingue al carcinoma tiroideo de otros tumores epiteliales (Moretti *et al.*, 2000). Es bastante frecuente la detección de translocaciones que afectan al cromosoma 19, especialmente en la banda 13 del brazo largo (19q13) (Belge *et al.*, 1995, 1998). También se han encontrado polisomías en los cromosomas 7 y 12 (Belge *et al.*, 1995; Criado *et al.*, 1995; Belge *et al.*, 1998) y, aunque en menor frecuencia, deleciones en el cromosoma 13 (Belge *et al.*, 1991) y 2 (Belge *et al.*, 1996).

En el cáncer de tiroides papilar se ha encontrado que los brazos cromosómicos más afectados por anomalías cromosómicas son el 1q, 4q, 5q, 6p, 10q, 12q, 13q y 14q (Zitzelsberger *et al.*, 1999).

Cáncer papilar

Se han encontrado cuatro tipos de alteraciones genéticas asociadas con el cáncer de tiroides papilar: reordenamientos de los genes *RET* y *TRKA*, mutaciones puntuales del gen *BRAF*, y mutaciones puntuales de *RAS* (Melillo *et al.*, 2005; Adeniran *et al.*, 2006; Fagin, 2006).

Por otro lado, también se han encontrado aberraciones cromosómicas en los cromosomas 1, 3, 4-14, 17, 19 y 20; dándose especial importancia a las regiones 1p11-13, 1p32-36, 3p25-26, 7q34-36 y 10q11.2 (Zitzelsberger *et al.*, 1999; Roque *et al.*, 2001; Rodrigues-Serpa *et al.*, 2003; Foukakkis *et al.*, 2005).

Cáncer folicular

La base molecular del cáncer folicular todavía no está bien establecida. Se piensa que está precedido por adenomas foliculares, al contrario de los carcinomas papilares que surgirían de *novo* (Rodríguez-Serpa *et al.*, 2003). Se han encontrado mutaciones puntuales de *RAS* (*N*-, *H*- o *K*-*RAS*) y *TRγ*, *PTEN*, *PKARIA*, *DDIT3*, *ARG2*, *ITMI* y *C1orf24* (Maciel *et al.*, 2005).

Por otro lado, las aberraciones cromosómicas y pérdidas de heterocigosidad son más frecuentes en los carcinomas foliculares que en los papilares. Estas alteraciones afectan fundamentalmente el brazo p del cromosoma 3 (Rodríguez-Serpa *et al.*, 2003) y los cromosomas 2, 3, 4p, 7q, 8, 9, 11p, 15q, 17p y 22q (Ward *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 2001).

Cáncer medular

Se han encontrado mutaciones somáticas de *RET* en pacientes con cáncer medular esporádico y familiar (Marsh *et al.*, 1997; Frisk *et al.*, 2001). También se han hallado deleciones en los cromosomas 1p, 3q, 4, 9q, 13q y 12q, y amplificaciones del cromosoma 19 (Marsh *et al.*, 2003).

Cáncer anaplásico

La base molecular de este tipo de cáncer no está del todo esclarecida, pero como proviene de la desdiferenciación de carcinomas diferenciados (Kitamura *et al.*, 2000), es

frecuente observar mutaciones en el oncogen β -*catenina* que podrían ser las responsables del proceso de desdiferenciación (García-Rostán *et al.*, 1999). Otro gen que aparece mutado es el *PIK3CA* (fosfatidilinositol 3'-quinasa), que es activado con frecuencia en los carcinomas de tiroides por *RAS* o por la falta de expresión o función de la proteína inhibitoria PTEN (García-Rostán *et al.*, 2005).

1.1.2.2. Factores de riesgo del cáncer de tiroides

La etiopatogenia de este cáncer permanece sin esclarecerse, y lo más probable es que implique la combinación de varios factores.

Aquellos factores que se considera pueden estar implicados en el origen del cáncer tiroideo son los siguientes:

- a) Radiación ionizante sobre la glándula
- b) Daño tiroideo directo por sustancias químicas
- c) Factores genéticos
- d) Factores hormonales
- e) Dieta y hábitos
- f) Afecciones tiroideas benignas previas

En esta lista están incluidas las causas demostradas (radiaciones), probables (hormonales, dieta deficiente en yodo), posibles (el exceso de yodo, el consumo de vegetales y frutas) y sospechadas pero con datos insuficientes (el selenio, y la masa corporal) (Fleites, 1999).

Se maneja la hipótesis de que estos factores actúan a través de una prolongada estimulación de la TSH y de otros potenciales factores de crecimiento (TGFa, EGF, VEGF, IGF-1, HGF, FGF), dando lugar al desarrollo de la neoplasia (<http://www.medynet.com>).

a) Radiaciones ionizantes

El único factor claramente demostrado en la incidencia de cáncer de tiroides es la exposición a radiaciones ionizantes (RI) en la infancia o en menores de 20 años, ya sea terapéutica (Ron y Modan, 1982) o accidental (McTiernan *et al.*, 1984; Cotterill *et al.*,

2001; Rabes, 2001; Preston-Martin *et al.*, 2003). En estos casos, la incidencia de tumores tiroideos se llegó a multiplicar hasta por 400 (Kingman, 1992).

En la primera mitad del siglo pasado, antes de la introducción de los antibióticos en la terapéutica, se usaron los rayos X en el tratamiento de varias afecciones benignas de cabeza y cuello. La tercera parte de los pacientes que recibieron este tratamiento durante la infancia desarrollaron un cáncer tiroideo, usualmente la variante papilar. En estos casos, el período de latencia fue corto, de menos de 3 años, pero el riesgo elevado se mantiene por casi toda la vida. Así, mientras que el riesgo de malignidad para un nódulo tiroideo es del 5 al 10 % en la población general, para personas irradiadas en el cuello durante la infancia es del 30-40 %.

La exposición a la radiación como consecuencia de la lluvia radiactiva también se ha relacionado con un riesgo elevado de contraer cáncer tiroideo, especialmente en niños.

Si bien la radiación es la causa mejor demostrada, actualmente se considera un antecedente poco frecuente, por lo que los factores hormonales y dietéticos cobran mayor valor.

b) Daño tiroideo directo por sustancias químicas

Son numerosos los estudios que han evaluado el riesgo que supone la exposición a agentes químicos para desarrollar distintos tipos de cáncer (Bertram, 2001). Así, por ejemplo, se reconoce que los compuestos de arsénico, benceno o nitrosaminas, entre otros, son responsables de un 80%-90% de los casos de cáncer. Muchas de las sustancias carcinógenas en general, inducen en particular daño tiroideo, este es el caso de la lesión tiroidea ocasionada por el uso de plaguicidas (Fleites, 1999). También se considera factor de riesgo para el carcinoma tiroideo la exposición a algunos compuestos químicos como el 1,4-bis[2-(3,5-dicloropiridoxi)]benceno (Diwan *et al.*, 1996), el tricloroetileno (Wingren *et al.*, 1997), la 2,3,7,8-tetraclorodibenceno-p-dioxina (Schrenk, 1998) y la xilazina (Yasuhara *et al.*, 2001).

c) Factores genéticos

La considerable variación étnica de la prevalencia del cáncer de tiroides (más frecuente en judíos y población indígena de Hawai) puede ser un indicador de que el riesgo de padecerlo está regulado genéticamente. Otra evidencia es que en el denominado síndrome de cáncer familiar, el riesgo supone incrementos de más de 1000

veces (Li, 1990). Se acepta que la historia familiar es el segundo riesgo más conocido para desarrollar esta enfermedad. Alrededor del 5% de los pacientes que desarrollan cáncer papilar y el 20-25% de los que desarrollan cáncer medular tienen un familiar que lo ha padecido. En el caso del carcinoma medular, las causas genéticas están bien estudiadas, tanto para el tipo familiar como para el esporádico. El cáncer medular está relacionado con un desorden conocido como neoplasia múltiple endocrina de tipo 2a (MEN 2a) y, usualmente, resulta de una mutación genética específica en el protooncogén *RET*. En los casos índice (el primer afectado de una familia), si además de existir la mutación en *RET* hay homocigosis para los polimorfismos G691S/S904S, la enfermedad se adelanta en diez años (Patocs *et al.*, 2003; Robledo *et al.*, 2003)

Sin embargo, el carcinoma medular es una neoplasia completamente diferente de los tumores típicamente tiroideos (de origen epitelial folicular: carcinomas folicular, papilar y anaplásico), desvinculada de los mecanismos hormonales importantes para éstos; de lo que se deduce que son otras las alteraciones del genoma que condicionan la aparición y el variado comportamiento biológico de los tres tipos celulares de los carcinomas de origen folicular (Lucas *et al.*, 1995; Sapi *et al.*, 1995; Schmid *et al.*, 1996, Almudevar *et al.*, 2000).

Aunque, con menor frecuencia, el factor genético es también evidente en algunos casos de carcinoma papilar, ya que se ha relacionado con síndromes genéticos conocidos (síndrome de Gardner, carcinoma colónico familiar y síndrome de Cowden).

d) Factores hormonales

El crecimiento y control de la célula tiroidea se realiza mediante una compleja interacción de hormonas y factores de crecimiento; por ello, una alteración en este balance supone una influencia en la tumorigénesis tiroidea. Los análisis epidemiológicos del cáncer tiroideo muestran datos que están a favor de un mecanismo hormonal en su origen, específicamente de carácter estrogénico (National Cancer Institute, 2005, <http://www.cancer.gov>):

- La incidencia es de 2 a 3 veces mayor en mujeres que en hombres, sobre todo entre los 10 y los 50 años. La proporción puede variar mucho en diferentes regiones (desde 1,2:1 a más de 4:1), siempre a favor de las mujeres.
- Por debajo de los 10 años no hay diferencia entre sexos.

- Luego de la menopausia se reduce la diferencia en la proporción de la incidencia entre sexos a 1,5:1 (mujer/hombre).
- El riesgo es doble en mujeres con muchos embarazos, y todavía mayor en aquellas con abortos espontáneos, sobre todo si el primer embarazo terminó en aborto (Kolonel, *et al.*, 1990).
- El riesgo es mayor en mujeres que tuvieron el primer parto antes de los 20 años o antes de los 5 años luego de la menarquia, y en quienes sufrieron una menopausia artificial (por ejemplo por ooforectomía); en este último caso, una posible explicación es que ocurra una acción errónea de los factores liberadores hipotalámicos sobre la hipófisis que la estimulan a producir hormonas dirigidas a los ovarios, pues, en su estructura molecular, estos factores liberadores y el factor liberador de TSH son similares (Galanti *et al.*, 1996).
- El riesgo es mayor en mujeres con sobrepeso u obesas, lo que pueda relacionarse con los mayores niveles de hormonas sexuales, por varios mecanismos (uno de ellos es la síntesis de hormonas sexuales a partir de grasa saturada y colesterol en la dieta).
- El consumo de contraceptivos o de hormonas para combatir los efectos de la menopausia pueden ser potenciadores del riesgo (McTiernan *et al.*, 1984), pero en otros casos no ha sido posible confirmar esta asociación (Galanti *et al.*, 1996; Rossing *et al.*, 1998).
- El mayor riesgo de tener un cáncer de tiroides que se encuentra en las enfermas que han padecido un cáncer de mama y la propia coexistencia de ambos cánceres.

El desarrollo de investigaciones clínicas y experimentales corrobora gran parte de las evidencias epidemiológicas. Hay coincidencia en aceptar que existen básicamente dos factores hormonales vinculados con la aparición de un cáncer tiroideo: la TSH y las hormonas sexuales. Se ha propuesto que la estimulación tirotrópica puede ser un factor importante en la promoción y progresión del cáncer tiroideo y, en este contexto, tendría sentido la acción de la hormona TSH. De hecho, se ha demostrado en animales que la estimulación de la TSH causa cáncer tiroideo (Negri *et al.*, 1999), sin que esté tan clara esta evidencia en humanos.

Los niveles elevados crónicos de TSH (causados por diversos mecanismos, sobre todo por deficiencia de yodo en la dieta) provocan una hiperestimulación crónica del tiroides que causa hipertrofia e hiperplasia. La estimulación sostenida puede generar clones de células foliculares con fenotipo alterado más propenso a la proliferación y puede facilitar la aparición de células con mecanismos defectuosos de reparación del DNA, lo que finalmente conduce a que los clones de crecimiento autónomo deriven en neoplasias. Muchos cánceres tiroideos son hormono-dependientes, o sea, su desarrollo es estimulado por los niveles de TSH (la misma hormona que muchas veces los hizo surgir).

El papel de las hormonas sexuales está aún en proceso de estudio. Se plantea que pudieran actuar a través de una interrelación con la hipófisis y la TSH, o por otros mecanismos. Se ha encontrado un aumento del número de receptores de estrógenos en cánceres de tiroides, particularmente en aquellos bien diferenciados; por otra parte se ha hallado que los estrógenos promueven cáncer de tiroides en animales (Negri *et al.*, 1999). Se sabe que los estrógenos elevan los niveles séricos de TBG, lo que a su vez eleva los niveles de T4, así que las mujeres tienen niveles de TBG entre un 10 y 20 % mayores que los de los hombres, pudiendo aumentar hasta un 50 % más durante el embarazo. Estos incrementos se corresponden con aumentos equivalentes de la TSH, lo que explica el aumento del volumen y la función tiroidea durante el embarazo. Por esto, es lógico pensar que las elevaciones estrogénicas mensuales y durante los embarazos induzcan elevaciones de TSH que estimulen el tiroides y favorezcan a la larga sus afecciones, pero los resultados de los estudios al respecto son discordantes.

Otros factores que estimulan el crecimiento del tejido tiroideo, independientes de TSH, son: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los anticuerpos estimulantes del crecimiento tiroideo, la hormona de crecimiento, la gonadotropina coriónica humana, la insulina, la prostaglandina e, incluso, una deficiente estimulación simpática.

e) Dieta y hábitos de consumo

✓ Contenido de yodo en la dieta

Los mecanismos por los que la dieta podría influir en la aparición de un cáncer tiroideo dependen fundamentalmente del contenido de yodo de los alimentos. Las ingestas muy bajas o muy altas de yodo incrementan el riesgo de cáncer de tiroides, asociándose las deficiencias con la variedad de carcinoma folicular y los excesivos con

la variedad papilar (Ferrís *et al.*, 2001). Una dieta crónicamente deficiente en yodo puede producir bocio e incluso cáncer, no por un efecto directo sobre el tiroides, sino a través de una hiperestimulación mantenida del tiroides por parte de la TSH. La deficiencia de yodo reduce la producción de hormonas tiroideas y, en respuesta, la hipófisis aumenta la producción de TSH, pudiendo como consecuencia desarrollarse un bocio. Puede haber variantes discretas en cuanto a las causas de la deficiencia en la disponibilidad de yodo sérico, pero la hiperestimulación crónica del tiroides por niveles elevados mantenidos de TSH es un mecanismo común.

Se ha observado, tanto en animales de experimentación como en humanos que el bocio incrementa el riesgo de padecer cáncer, riesgo que es mayor si hay antecedentes familiares de bocio, o si se vive en áreas deficientes en yodo (áreas de bocio endémico como los Alpes, los Andes, el Himalaya, zonas del Norte de Sicilia, de Italia, de China y de Suecia).

La tercera parte de la población mundial se encuentra en riesgo de padecer trastornos asociados a deficiencia de yodo y el 14 % sufre bocio o cretinismo por esta causa (WHO/UNICEF/ICCIDD, 1999).

Niveles elevados de yodo en la dieta mantenidos por largos períodos terminan por producir bloqueo de la captación de yodo por el tiroides, lo que a su vez provoca hiperproducción de TSH, que produce bocio y eventualmente cáncer. Sin embargo, se requieren niveles muy elevados (100 veces el normal) de ingreso de yodo para que ocurra un efecto negativo en cuanto a riesgo de cáncer. Algunos estudios señalan que el exceso de yodo parece favorecer el carcinoma papilar; como éste tiene mejor pronóstico que el folicular, el pronóstico general de pacientes con cáncer tiroideo en áreas ricas en yodo debe ser mejor (Hedinger, 1981). Sin embargo, otros autores no encuentran que el riesgo de cáncer de tiroides sea más elevado en las personas que consuman alimentos con altos contenidos de yodo (Preston-Martin *et al.*, 2003).

Cambios rápidos del aporte de yodo también pueden influir en el desarrollo del cáncer. Si de forma abrupta se administra una gran dosis de yodo a personas que sufren una deficiencia crónica del mismo, o a las que tienen un bocio con un nódulo autónomo, puede provocarse un hipertiroidismo y una excesiva replicación celular. Estos efectos se traducen en un aumento de la susceptibilidad al daño en el DNA y al riesgo de un cáncer tiroideo.

La interferencia en la captación de yodo por el tiroides puede ser otro mecanismo que favorezca la carcinogénesis. Los glucósidos cianogénicos, contenidos en ciertos alimentos, provocan la producción endógena de tiocianato, que compite con el yodo por su transporte o por su incorporación en la molécula de tiroglobulina. De esta manera se disminuye la captación de yodo por el tiroides aún con una ingestión adecuada (Fleites, 1999). Sin embargo, en estudios casos control, la dieta rica en vegetales bociógenos se asoció a una disminución del riesgo de cáncer tiroideo (Preston-Martin *et al.*, 1993; Bosetti *et al.*, 2002). Algunos autores han concluido que estos vegetales no parecen tener importancia en el desarrollo de un cáncer tiroideo y que pueden incluso prevenirlo por su contenido en otras sustancias protectoras (Preston-Martin *et al.*, 2003).

✓ Deficiencia de selenio en la dieta

El aporte de alimentos ricos en selenio (Se) disminuye el riesgo neoplásico en pulmón, mama, esófago, estómago, recto, útero, hígado y tiroides (Ferrís *et al.*, 2001).

El selenio, que se encuentra en varios alimentos comunes, parece tener una función importante en la función tiroidea, pues el tiroides normal tiene grandes concentraciones de éste. En los pacientes con cáncer de tiroides, esta glándula tiene menores concentraciones de selenio de lo normal. También se ha indicado que ratas irradiadas que recibieron una dieta enriquecida con selenio tuvieron una incidencia de cáncer de tiroides hasta 3 veces menor (Fleites, 1999). El mecanismo protector del selenio puede ser a través de (Ferrís *et al.*, 2001):

1. Acción antioxidante. Cuatro de las selenoproteínas que han sido caracterizadas son glutatión peroxidasas (Arthur, 1995). Estas enzimas actúan sobre los peróxidos lipídicos y de hidrógeno y, en consecuencia, protegen la célula de los daños oxidativos de los radicales libres generados por diversos carcinógenos (Céspedes y Sánchez, 2001).
2. Efecto supresor de la proliferación celular. Varios autores han encontrado que la defensa antioxidante no es el único mecanismo de protección del selenio, sino que es capaz de reducir el crecimiento tumoral y estimular la apoptosis, inhibiendo el progreso y la promoción del cáncer en estadios tardíos (Solórzano, 2002).
3. Incremento de la respuesta inmune por estimulación del sistema humoral y celular

El Se también forma parte de otras proteínas, como por ejemplo, las desyodasas que están involucradas en la conversión de T4 a la forma activa T3 de tiroxina (Arthur, 1995), de modo que la deficiencia de Se disminuye los niveles de T3 pero incrementa las concentraciones plasmáticas de la TSH y de T4, y este desequilibrio del eje hipotálamico tiroideo desemboca en hipertrofia e hiperplasia glandular.

✓ **Gran masa corporal, obesidad**

El exceso energético se ha asociado a un incremento del riesgo de todas las neoplasias, especialmente de colon, pulmón, mama, endometrio, riñón, páncreas, próstata y vesícula biliar. También para el cáncer de tiroides se ha citado un incremento del riesgo asociado a un alto índice de masa corporal o ganancia de peso, más clara en mujeres que en hombres (McTieran *et al.*, 1987). Se han manejado dos hipótesis para explicar esta asociación:

- Que la obesidad no sea la causa de cáncer, sino que el hipofuncionamiento tiroideo es el que provoca a la vez obesidad y mayor riesgo de cáncer (por hipersecreción crónica de TSH).
- Que la obesidad sea la causa, porque el exceso de tejido adiposo se asocia con mayores niveles circulantes de estrógenos, que a su vez pueden provocar cáncer de tiroides. Según esto, ésta sería una causa dietético-hormonal.

Aunque todavía no hay una explicación adecuada a favor de la obesidad como factor de riesgo, se esgrime que existe relación entre el peso y el aumento del número de células (Dal Maso *et al.*, 2000), que la obesidad incrementa los niveles de triglicéridos plasmáticos, glucosa y la resistencia a la insulina, y estas alteraciones promocionan el crecimiento corporal y el de las células tumorales en las fases iniciales de la carcinogénesis. Además, la hipersecreción de hormonas glucocorticoides y/o dehidroepiandrosterona inhibe la inflamación, fenómeno básico del proceso citotóxico-regenerativo asociado a la inhibición de la carcinogénesis (Ferrís *et al.*, 2001).

✓ **Ingestión de alcohol y tabaco.**

La estimulación directa que ejerce el alcohol sobre la hipófisis para producir TSH es uno de los efectos que pudieran explicar su modulación en la tumorigénesis tiroidea; en este caso se consideraría el alcohol como un factor de riesgo. Aunque varios estudios han encontrado esta asociación entre el alcohol y el cáncer de tiroides, otros no lo han

hecho o, por el contrario, lo han citado como factor que disminuyen el riesgo (Preston-Martin *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2005). Al igual que sucede con el hábito de fumar, el consumo de alcohol actúa en el organismo como anti-estrógeno, y esto explicaría su efecto “protector” (Galanti *et al.*, 1996; Rossing *et al.*, 2000; Picchi *et al.*, 2001). El hábito de fumar habitualmente se ha asociado con un 40% de reducción de riesgo (Mack *et al.*, 2003; Preston-Martin *et al.*, 2003).

f) Afecciones tiroideas benignas previas.

La detección de un nódulo palpable en el tiroides es un hecho frecuente y de gran importancia y, aunque la mayoría son alteraciones estructurales benignas, pueden ser la forma de presentación de un cáncer de tiroides. Una anomalía preexistente en el tiroides puede conducir a la transformación de una lesión benigna, o de bajo grado de malignidad, en una lesión maligna o de alto grado de malignidad. La anomalía previa puede ser un bocio multinodular, un adenoma o un carcinoma bien diferenciado (Preston-Martin *et al.*, 2003). La relación entre bocio y cáncer de tiroides ha sido ampliamente estudiada. En el 80% de los pacientes afectados de carcinoma anaplásico existe evidencia clínica e histológica de bocio nodular o carcinoma bien diferenciado preexistente (Mendoza *et al.*, 2000). El criterio de que el cáncer de la glándula tiroides ocurre con mayor frecuencia en áreas endémicas de bocio, ha sido demostrado clínica y experimentalmente en estudios que muestran la relación entre el bocio nodular y el carcinoma, particularmente de tipo folicular y anaplásico (Association of Cancer Online Resources (ACOR), 2005). Algunos autores señalaron que la tirotoxicosis, la tiroiditis, y especialmente la enfermedad de Graves, puede ser un factor en la malignización del tiroides. Otros autores asocian cáncer y tiroiditis crónica (Franceschi *et al.*, 1999; Mack *et al.*, 2002).

1.1.2.3. Tratamiento del cáncer tiroideo

La manera de tratar los tumores del tiroides varía según el tipo de cáncer. En los **carcinomas diferenciados** el tratamiento inicial es, según el caso, tiroidectomía total, o lobectomía con istmectomía y/o disección modificada de cuello. Tras la resección quirúrgica se rastrea y elimina con I^{131} los restos captantes de tejido tiroideo y/o captaciones patológicas en otras localizaciones. En el carcinoma de Hürthle las células no tienen capacidad para concentrar radioyodo, pero se emplea esta terapia con la

esperanza de que exista una acción por contigüidad entre los restos de tejido tiroideo normal que captan el radioyodo y las células tumorales. Después de la terapia, se compensa la falta de hormonas tiroideas con T3, y se instaura tratamiento con T4 para suprimir la TSH hasta alcanzar niveles normales ($0,1 \mu\text{U/mL}$) (Besic *et al.*, 2006). En el caso del **carcinoma tiroideo anaplásico**, el tratamiento es la exéresis quirúrgica del tumor, asociada a radioterapia externa y quimioterapia, pero los resultados en cuanto a supervivencia no son esperanzadores (Guerra, 2001). Para el **carcinoma medular de tiroides**, el tratamiento de elección es una tiroidectomía total con resección ganglionar de cuello. En caso de metástasis única se acude a exéresis local y, en caso de metástasis diseminada, se recurre al empleo de dosis terapéutica de un radioisótopo. La radioterapia y quimioterapia es el tratamiento adecuado para el **linfoma** (Graf, 2005).

1.1.2.4. Factores pronóstico

La edad, por sí sola, parece ser el factor de pronóstico más importante. El género femenino, el tipo histológico del carcinoma, la multifocalidad y la complicación de los ganglios regionales son otros factores importantes (Schlumberger *et al.*, 1999). Sin embargo, es algo polémica la idoneidad pronóstica del estado ganglionar linfático, porque otros estudios muestran que la complicación de los ganglios linfáticos regionales no tiene ningún efecto en la supervivencia (Voutilainen *et al.*, 2001).

Según los criterios de riesgo de edad, metástasis, diseminación y tamaño (AMES, por sus siglas en inglés), los pacientes que corren mayor riesgo son las mujeres mayores de 45 años, con carcinoma indiferenciado o folicular, tumor primario de más de 4 cm y metástasis distante. El pronóstico para el carcinoma diferenciado es mejor para los pacientes menores de 40 años sin extensión extracapsular o invasión vascular. La tasa de supervivencia a los 20 años es del 98% en los pacientes de bajo riesgo y del 50% en los de alto riesgo (ACOR, 2005).

El factor de crecimiento endotelial vascular en pacientes con cáncer papilar se relaciona con un alto porcentaje de recurrencia local y metástasis distante. Asimismo, la concentración elevada de tiroglobulina sérica en pacientes operados de cáncer tiroideo diferenciado se correlaciona fuertemente con la recurrencia del tumor. Los índices de tiroglobulina son más sensibles cuando los pacientes tienen hipotiroidismo y concentración sérica elevada de la hormona estimulante del tiroides.

La expresión del gen de supresión tumoral *p53* también se ha relacionado con un pronóstico adverso en los pacientes con cáncer tiroideo (Godballe *et al.*, 1998; NCI, 2005).

1.2. Marcadores de susceptibilidad

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, incluido el cáncer (Taningher *et al.*, 1999).

La etiología multigénica del cáncer incluye genes de alta y baja penetrancia. Un bajo porcentaje de la población sufre mutaciones en genes directamente implicados en los procesos carcinogénicos (oncogenes o genes supresores de tumores); sin embargo, un alto porcentaje presenta polimorfismos que afectan a genes de baja penetrancia (con polimorfismos asociados a un pequeño o moderado riesgo relativo al desarrollo de la enfermedad). Aunque su efecto es mucho menos “drástico” en la susceptibilidad al cáncer que las mutaciones raras, precisamente su alta frecuencia hace que ganen en relevancia como moduladores del riesgo (Taningher *et al.*, 1999; Shields y Harris, 2000; Hemminki y Shields, 2002).

El DNA presenta variaciones (polimorfismos) que constituyen la base genética de nuestra individualidad. Los polimorfismos más frecuentes son cambios de una única base, a los que se les llama polimorfismos de un único nucleótido (*single nucleotide polymorphism* (SNP)). Su frecuencia y distribución en el genoma, así como la relativa facilidad de su estudio, los han convertido en potentes herramientas para localizar genes o regiones genómicas que pudieran ser responsables de algún tipo de enfermedad o del incremento de la susceptibilidad de ciertos individuos a padecerla (Judkins *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Suh y Cantor, 2005).

El Grupo Internacional de Mapeo de SNP ha localizado 1,42 millones de ellos, y Celera 2,1 millones. El número estimado de SNPs en la región exónica está en un rango de 20.000 a 60.000, por lo que si asumimos que existen unos 30.000 genes en el

genoma humano, cada uno podría contener de 1 a 2 SNPs (ISMWG, 2001; Venter *et al.*, 2001). La densidad de SNPs en el genoma se estima que es de 1/1000 pares de bases, así que hay más de un millón de posibles sitios de variación (Venter *et al.*, 2001; MacAuley y Ladiges, 2005). Muchos de los cambios son neutros, lo que dificulta la identificación funcional de los SNPs (Pritchard 2001; Lohmueller *et al.*, 2003); no obstante, se cree que casi el 50 % provoca un cambio aminoacídico y que en el 45% de los casos este cambio es no conservativo.

Si bien los SNPs codificantes y los no sinónimos son importantes por sus consecuencias funcionales, no lo son menos los cambios genéticos intrónicos que afectan regiones del promotor u otras secuencias reguladoras de la transcripción y de la expresión génica (MacAuley y Ladiges, 2005).

Si la presencia de polimorfismos aislados, o la combinación de varios de ellos (haplotipos), se asocian a un cambio en la manifestación de una enfermedad, entonces es posible inferir que tales polimorfismos actúan como modificadores de susceptibilidad.

Las variantes genéticas no sólo modifican el riesgo, también actúan sobre la evolución de la enfermedad y el carácter de las respuestas a los tratamientos (Donnelly, 2004; MacAuley y Ladiges, 2005; Suh y Cantor, 2005).

El descubrimiento y utilización de los SNPs en el diagnóstico de enfermedades es la piedra angular de la genética molecular moderna. Así pues, es de suma importancia desarrollar metodologías rápidas, fiables, sensibles y no costosas para el estudio de los SNPs. Existen numerosas publicaciones acerca de las técnicas disponibles, de sus ventajas e inconvenientes (Ye *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2002; Latorra *et al.*, 2003).

En muchos estudios se ha concluido que hay una fuerte asociación entre la presencia de un determinado SNP y un mayor riesgo de padecer cáncer (Mohrenweiser *et al.*, 2003) y, en consecuencia, de esta asociación se pueden derivar elementos para comprender los mecanismos carcinogénicos.

Hasta hace relativamente poco, el análisis de polimorfismos se centraba en genes implicados en el metabolismo, como los genes codificantes de las enzimas de fase I y II, genes del metabolismo de esteroides y genes de reparación (Loktionov, 2004); pero cada vez se abunda más en el estudio de polimorfismos en todo tipo de genes (Imyanitov *et al.*, 2004).

1.2.1. Daño en el DNA y mecanismos de reparación

Los agentes genotóxicos de naturaleza diversa, tanto exógenos como endógenos, operan de distintos modos sobre la molécula de DNA. La rotura de cadenas constituye el tipo de lesión más frecuente. La alteración de las bases o de los azúcares, los puentes intra o intercatenarios, los dímeros de pirimidinas y los aductos constituyen otras formas de daño en el DNA.

La conducta de la célula frente al daño genético comprende una etapa inicial de reconocimiento del sitio afectado, seguida de la puesta en marcha de una respuesta apropiada: reparación del DNA o muerte celular. La severidad de la lesión en el DNA y el momento del ciclo celular en el cual ésta tiene lugar puede inducir una estrategia de reparación que priorice la supervivencia, aún a expensas de incurrir en un cambio genético, por lo que la ocurrencia de mutaciones y reordenamientos cromosómicos no debe ser interpretada como una simple respuesta pasiva frente al daño.

La alteración de bases individuales puede ser corregida mediante el mecanismo de **reparación por escisión de bases (BER)**. Las roturas simples con frecuencia se asocian a la pérdida de una base en el sitio de corte y no pueden ser reparadas por la sola acción de ligasas sino que ponen en marcha el mecanismo BER. Cuando las lesiones de una sola cadena causan distorsión de la hélice del DNA, pueden ser corregidas mediante el mecanismo de **reparación por escisión de nucleótidos (NER)**. En ambos casos la indemnidad de la cadena complementaria permite que la DNA polimerasa restituya con fidelidad la secuencia original. La reparación de roturas dobles involucra dos tipos de procesos: **recombinación homóloga (RH)** y **recombinación no-homóloga o ilegítima (RNH)** (Webb *et al.*, 2005). La recombinación homóloga, mecanismo principal de reparación de estas lesiones, se sustenta en la identidad de secuencias entre ciertas regiones del genoma. La secuencia de DNA de la cual se toma la información para la reparación debe tener una identidad de más de 200 bases respecto del sitio dañado. Mediante este mecanismo, los extremos del DNA son parcialmente eliminados y la nueva cola de simple cadena 3' (extremo roto de una de las cadenas del DNA) invade la doble hélice de la homóloga y, a partir de este molde, es extendida por la polimerasa, restituyendo la cadena dañada. Este proceso genera 2 moléculas de DNA. La recombinación no-homóloga de los extremos rotos del DNA, mecanismo más frecuente de reparación de roturas dobles en células de mamíferos, no requiere la compleja maquinaria enzimática implicada en la recombinación homóloga pero, mientras que esta

última permite reparar con una alta tasa de fidelidad, las recombinaciones ilegítimas causan con frecuencia alteraciones o pérdidas en la secuencia del DNA (Pérez *et al.*, 2002; Vodicka *et al.*, 2004).

Las cuatro formas básicas de reparación del DNA comprenden la acción de un complejo sistema de proteínas especializadas, cuya actuación a su vez está ligada a las funciones de duplicación y transcripción del DNA (Hoeijmakers, 2001). Estas proteínas son codificadas por más de 80 genes con un papel directo en la reparación del daño y más de 30 con un papel indirecto.

Hasta 2002 se había caracterizado la secuencia del DNA de 115 de los más de 130 genes involucrados en la reparación (Wood *et al.*, 2001; Loktionov, 2004). La gran variación encontrada en las regiones codificadoras de estos genes condiciona la existencia de genotipos muy complejos. Se conoce que hay individuos que sufren graves alteraciones en los sistemas de reparación y se caracterizan por tener alteradas las capacidades de reconocimiento y/o reparación de las lesiones producidas por agentes genotóxicos (Ej: ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi, y xeroderma pigmentosum, entre otros) (Berwick y Vineis, 2000). Sin embargo, estas mutaciones son raras en la población, no así los polimorfismos que producen un cambio aminoacídico en proteínas de reparación con ligeras variaciones en su funcionalidad (Shen *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 1999; Ford *et al.*, 2000; Norppa, 2004). Cabe citar, a modo de ejemplo, que se han encontrado al menos 135 polimorfismos en 17 genes relacionados con la reparación (Ruttan y Glickman, 2002; Smith *et al.*, 2003).

1.2.2. Genes de reparación y SNPs

1.2.2.1. Genes del mecanismo de reparación BER

Hasta el momento se conoce que en el mecanismo de reparación BER están involucrados, al menos, 25 genes cuyas proteínas forman parte de las 2 vías de que dispone este mecanismo en las células de mamífero (Hu *et al.*, 2002). Ambas vías difieren por el tipo de polimerasa que participa. La vía corta involucra la DNA Pol β , XRCC1 y DNA ligasa III, mientras que la vía larga requiere DNA Pol β o δ , PCNA, DNAsaIV (FEN1) y DNA ligasa I. El hecho de que el mecanismo de reparación se derive por una u otra vía está influenciado, *in vitro*, por la ausencia o presencia de otra proteína, la XRCC1 (Kubbota *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2001; Dianota *et al.*, 2004).

1.2.2.1.1. Gen XRCC1

El gen *XRCC1* (*X-ray repair cross-complementing*) fue identificado por su capacidad de restaurar la función reparadora en la línea celular CHO mutante EM9 (Lamerdin *et al.*, 1995). El gen fue clonado y mapeado en el cromosoma 19 humano (19q13.2-13.3) (Siciliano *et al.*, 1987; Stern *et al.*, 2001), tiene 17 exones y 32.252 pb y codifica para una proteína con peso molecular de 70 kDa (Lamerdin *et al.*, 1995; Duell *et al.*, 2001). Pertenece al grupo de genes con acción indirecta en la reparación del DNA.

Las funciones de la proteína XRCC1 en la reparación del daño en el DNA no están del todo dilucidadas, aunque se reconoce que está involucrada en la reparación de roturas de simple cadena producidas directamente por la radiación ionizante o, indirectamente, por la acción de especies reactivas de oxígeno endógenas y/o agentes alquilantes (Duell *et al.*, 2000; Matullo *et al.*, 2001; Vidal *et al.*, 2001; Caldecott, 2003).

Hasta el momento no se le ha atribuido ninguna actividad enzimática (Duell *et al.*, 2001; Caldecott, 2003). Su característica más notable es la capacidad para interactuar con otras proteínas reparadoras del DNA; actúa como “armario” de enzimas que participan en cada una de las etapas del mecanismo de reparación. (Figura 3).

XRCC1 interactúa con al menos 4 enzimas involucradas en BER: la DNA polimerasa β , PARP, la DNA ligasa III, y la polinucleótido quinasa (PNK) (Vidal *et al.*, 2001) (Figura 3 y 4). XRCC1 estimula la actividad de PNK y, por consiguiente, puede acelerar el proceso de reparación, siendo esencial para la estabilización de la ligasa III. La interacción de XRCC1 con la Pol β pudiera definir otro papel de XRCC1 en BER. Durante la reparación BER *in vitro* la presencia de XRCC1 limita a uno el número de nucleótidos reemplazados por la Pol β , lo que sugiere una actividad distinta que la de la estabilización de la ligasa (Dantzer *et al.*, 2000; Prasad *et al.*, 2001). A pesar de estas observaciones, el papel bioquímico de XRCC1 en la coordinación de BER no está del todo esclarecido.

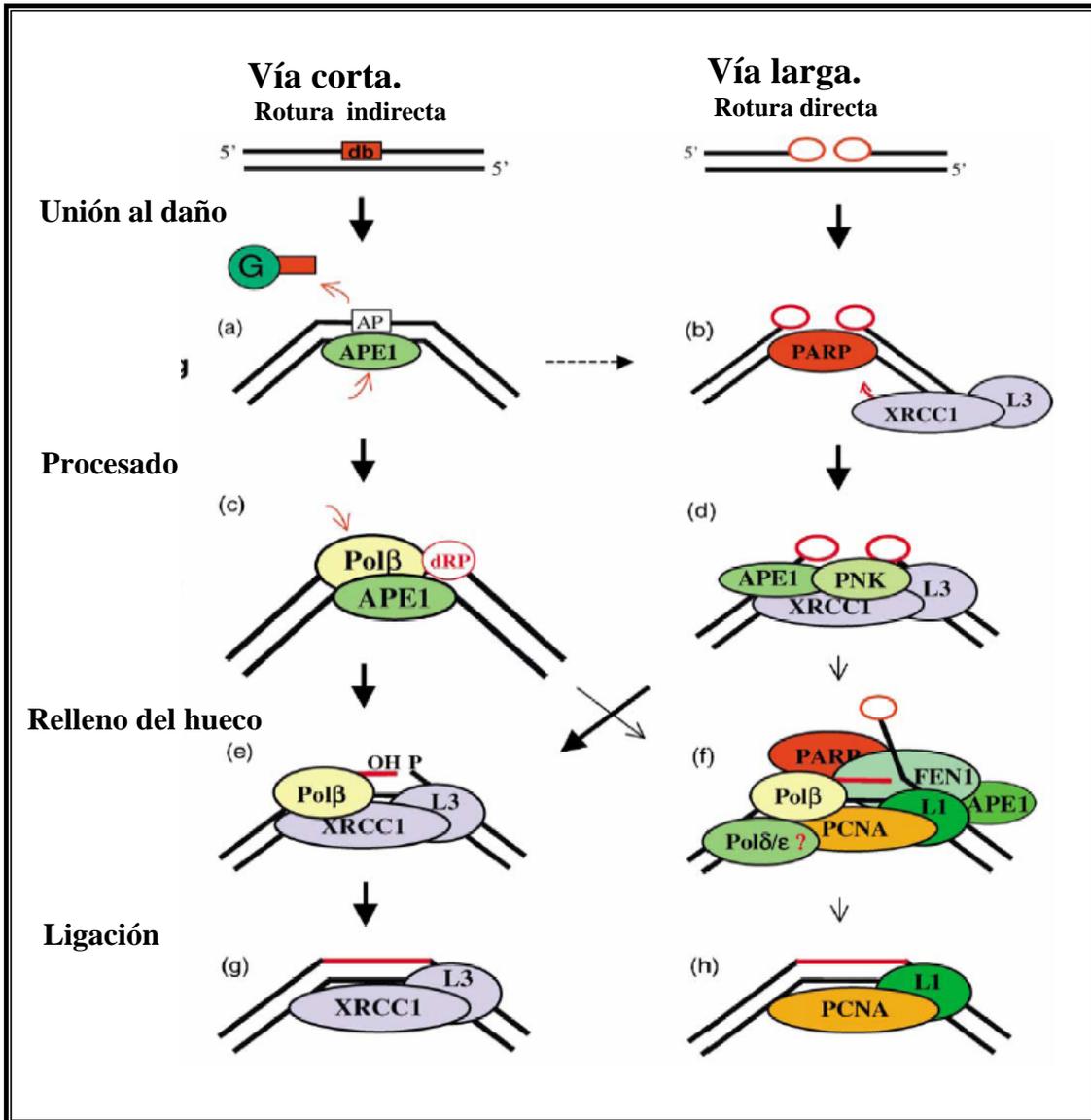


Figura 3: Modelo de rotura de simple cadena del DNA. Roturas indirectas: Mediante BER la base dañada (db) es eliminada por una glicosilasa (G), la cual es desplazada del sitio abásico por APendonucleasa (APE1), la que a su vez recluta la Pol β y abre el sitio abásico. La Pol β inserta un nucleótido y repara el extremo 5'fosfato desoxirribosa creado por APE, la mella ligable resultante es sellada por la participación de la XRCC1-ligasalIII(L3). Sin embargo, bajo determinadas circunstancias la polimerasa no puede eliminar el extremo 5'dRP (cuando está oxidado o reducido) y, en este caso, se reclutan PARP, PCNA y FEN, que estimulan la extensión del gap de 2 a 15 nucleótidos y eliminan el terminal de cadena resultante (vía larga). El ligamiento lo hace la ligasa1 (L1). Roturas Directas: Resultan de daños en el azúcar o algunas son consecuencia de BER (ej. sitios abásicos que no acoplan con APE1 o que son abiertos por la AP liasa (flecha de puntos), estas roturas se enlazan a PARP1 que se automodifica. PARP modificada recluta a XRCC1-ligasalIII y actúa como "andamio o chaperona molecular". Los extremos 3' y 5' dañados son modificados a 5' fosfato y 3' hidroxilo por la APE 1 y PNK. La polimerasa posibilita el relleno del gap seguido por ligación con la Lig IIIα (Caldecott, 2003).

La estructura completa de XRCC1 no se conoce en su totalidad; sin embargo, se sabe que posee tres dominios globulares (Callebaut *et al.*, 1997). Tiene un dominio N terminal (NTD) y 2 dominios BCRT, característicos de proteínas involucradas en el control del ciclo celular y en la respuesta al daño inducido. Las dos regiones de enlace entre los dominios globulares se han denominado “bisagras” y se ha predicho que están desestructuradas (Figura 4).

La Pol β interactúa con el dominio N terminal de XRCC1, la DNA ligasa III y la PARP lo hacen con los 2 dominios BRCT. La proteína PARP contacta, a través del dominio marcado por zinc en el extremo N terminal o por su porción central, con la región BRCT I de XRCC1 (Masson *et al.*, 1998; Duell *et al.*, 2001). La interacción XRCC1-DNA ligasa se produce a través de sus respectivos C terminales contenidos en el módulo BRCT II (Masson *et al.*, 1998). El dominio BRCT es una unidad autónoma homóloga a la región carboxiterminal del gen *BRCA* y se encuentra ampliamente distribuido en la superfamilia de proteínas de control del ciclo celular y de respuesta al daño en el DNA, incluida la p53 (Stern *et al.*, 2001). La interacción con APE1 no requiere ni del dominio N terminal ni del BCRTII.

XRCC1 interactúa física y funcionalmente con OGG1, que es la glicosilasa humana que inicia la reparación BER de la lesión mutagénica 8-oxoguanina (Marsin *et al.*, 2003). Esta interacción incrementa 3 veces la actividad de OGG1.

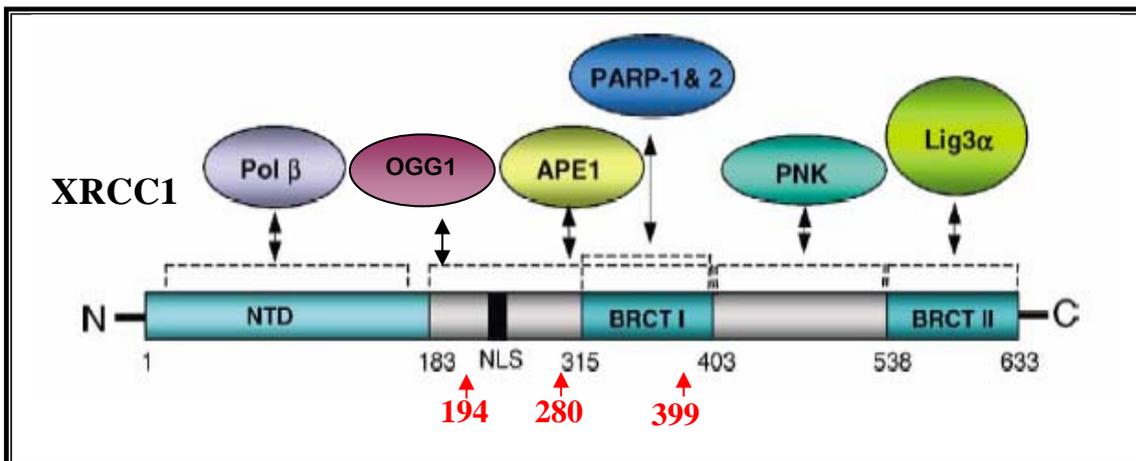


Figura 4: Interacciones Proteína-Proteína mediadas por la XRCC1 humana. NTD: Dominio N terminal, NLS: Señal de localización nuclear (modificado de Caldecott, 2003).

El gen *XRCC1* es altamente polimórfico, se han descrito en diferentes bases de datos más de 60 SNPs, de los cuales aproximadamente 30 se localizan en exones o

regiones promotoras. Los tres polimorfismos más estudiados para este gen se localizan en: codón 194 (exón 6, base 26304 C por T, *Arg* por *Trp* rs1799782), codón 280 (exón 9, base 27466 G por A, *Arg* por *His* rs25489) y en el codón 399 (exón 10, base 28152 G por A, *Arg* por *Gln* rs25487). Lamerdin *et al.* (1995) y Stern *et al.* (2001) señalan que estos polimorfismos están ubicados en residuos conservados tanto en hámster, como en ratón y en humanos. Estos polimorfismos representan cambios de aminoácidos no conservativos que pudieran afectar la función de XRCC1. No obstante, permanecer desconocidas sus consecuencias funcionales, el reconocimiento de su relación con incrementos en la incidencia de distintos tipos de cáncer ha despertado una atención considerable (MacAuley y Ladiges, 2005). El polimorfismo de mayor frecuencia en la población caucásica es el *Arg399Gln* (34,1%), seguido por el *Arg194Trp* (7,2%) y en menor frecuencia se halla el *Arg280His* (Shen *et al.*, 1998; Lunn *et al.*, 1999; David Beabes y London, 2001).

Los codones 194 y 280 están localizados en la vecindad del dominio de interacción con la Pol β y con la PARP. El codón 194 polimórfico reside específicamente en la región entre el dominio N terminal del XRCC1 que se enlaza con la pol β y el dominio de unión a PARP (Marintchev *et al.*, 1999 a,b; Lee *et al.*, 2001; Laffon *et al.*, 2004). Se ha considerado que es poco probable que las sustituciones de aminoácidos en esta región causen un cambio significativo en la función de reparación de XRCC1 (Shen *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003).

El polimorfismo *Arg399Gln* se localiza dentro de la región de interacción con PARP en el dominio carboxiterminal de BRCT 1 (Duell *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003). Los resultados de asociación con riesgo de cáncer más numerosos y coherentes son los referidos para *Arg399Gln* (Goode *et al.*, 2002; Ladiges *et al.*, 2003).

1.2.2.1.2. Gen *OGGI*

Las especies reactivas de oxígeno formadas como consecuencia del metabolismo aeróbico y la exposición a mutágenos, ocasionan daños oxidativos en las bases y roturas de simple cadena. Entre las distintas bases susceptibles al daño, son los residuos de guanina los más particularmente vulnerables al ataque de los radicales libres, siendo la principal lesión que así se produce la 8-oxoguanina (8-OHdG), también llamada 7,8-dihidro-8-oxoguanina o simplemente 8-hidroxiguanina, cuando se presenta en su forma tautomérica alternativa.

Esta lesión no impide la elongación de la cadena, pero causa un falso apareamiento con la adenina durante la replicación, lo cual conduce a la transversión de G:C a T:A (Wood *et al.*, 1992; Radicella *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Le Marchand *et al.*, 2002). El daño no reparado o mal reparado puede tener un papel significativo en los procesos de carcinogénesis y de envejecimiento.

La reparación de estos daños corre a cargo del mecanismo BER, que en una primera etapa produce la remoción de la base alterada por la acción de una glicosilasa. La 8-oxoguanina-DNA glicosilasa 1 (OGG1), es la principal enzima reparadora de 8-OHdG, tanto a nivel nuclear como mitocondrial.

El gen *OGG1* ha sido identificado recientemente como un homólogo del gen de la levadura *MMH/OGG1* y es el gen que codifica para la glicosilasa con actividad intrínseca AP liasa. Este gen fue clonado y mapeado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p25/26) y se expresa de forma ubicua en múltiples órganos humanos (Lu *et al.*, 1997; Roldán-Arjona *et al.*, 1997). Posee 8 exones y produce dos transcritos diferentes mediante procesado alternativo de la región C-terminal. Dependiendo del último exón de la secuencia se clasifican en tipo 1 (o α) y tipo 2 (o β). La isoforma α -Ogg1 es transcrita del exón 1 al 7 y la β -OGG1 del 1 al 6 más el 8. La isoforma α es una proteína de 345 aminoácidos (39 kDa) que se localiza principalmente en el núcleo, mientras que la β -OGG1 es una proteína de 424 aminoácidos (47 kDa) que se localiza exclusivamente en la mitocondria (Hashiguchi *et al.*, 2004). Todas tienen una región N-terminal que contiene una señal diana mitocondrial (Shinmura *et al.*, 2000; Jaiswal *et al.*, 2001; Shinmura y Yokota, 2001).

Esta proteína cataliza la eliminación de los aductos de 8-oxoG (OG) y la apertura del DNA en el sitio abásico (apurínico/apirimidínico (AP)) resultante de la β -eliminación (Radicella *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2003). OGG1 tiene dos dominios de enlace al DNA, uno es un dedo C_2H_2 de zinc y el otro una hélice-horquilla-hélice (que además tiene actividad catalítica) (Jaiswal *et al.*, 2001), posee además una señal de localización nuclear y una diana mitocondrial (Shinmura y Yokota, 2001). El grupo *Gly/Pro-rico en Asp* de su sitio catalítico es característico de la superfamilia de proteínas que participan en BER con similar geometría y actividad. OGG1 tiene, además, un grupo tiol que es necesario para su actividad enzimática. La proteína opera a través de un mecanismo catalítico clásico glicosilasa/liasa, y las mutaciones en el residuo lisina de su sitio catalítico provocan una pérdida de la actividad catalítica,

aunque se mantenga el poder de enlace a oligonucleótidos que contienen OG (Lu *et al.*, 1997).

Tanto la OGG1 humana como la de ratón exhiben una exquisita selectividad por la base opuesta a OG en el DNA, y operan con eficiencia sólo cuando la base apareada a la OG es la citosina. Por consiguiente, ambas OGG1 son incapaces de procesar otras lesiones, incluyendo la 8-oxoadenina.

La región donde se localiza el gen *OGG1* muestra pérdida de heterocigosidad en una gran variedad de cánceres humanos (Jaiswal *et al.*, 2001). Las células con este daño tienen reducida la capacidad de contrarrestar los efectos mutagénicos de las ROS y con ello su inestabilidad genómica se incrementa (Lu *et al.*, 1997). Estas deleciones se acompañan frecuentemente de la transversión GC→TA y de otras mutaciones en las células cancerosas. Así, por ejemplo, se han identificado mutaciones en el gen *OGG1* en el cáncer gástrico, de pulmón y de riñón, lo que sugiere que las alteraciones en la función de OGG1 contribuyen al proceso carcinogénico.

Además, el gen se caracteriza por ser altamente polimórfico en las poblaciones humanas. Varios estudios han revelado la presencia de polimorfismos en este locus: cambio G/A que provoca sustitución de arginina por glutamina en el codón 229 (*Arg229Gln*), un cambio C/T que produce sustitución de alanina por valina (*Ala288Val*), otro cambio G/A en el codón 322 (*Asp322Asn*) y el cambio C/G en la posición 1245 del exón 7 de la primera isoforma, que provoca la sustitución de serina por cisteína en el codón 326 (*Ser326Cis*) (Kohno *et al.*, 1998). Algunos autores no observan diferencias catalíticas entre estas variantes (Dherin *et al.*, 1999). Otros, sin embargo, refieren que la proteína OGG1 codificada por el alelo *Ser326* exhibe más actividad que la de la variante *Cis326*, lo que pudiera influir en la carcinogénesis humana (Sugimura *et al.*, 1999; Janssen *et al.*, 2001; Shinmura y Yokota, 2001). Este polimorfismo se ha asociado a varios tipos de cánceres y, particularmente, con cáncer de próstata (Evans, 2005).

1.2.2.2. Genes del mecanismo de reparación por recombinación homóloga

La estabilidad genómica se garantiza por la reparación eficiente de las roturas de doble cadena que se producen durante la replicación o que son consecuencia de agentes que dañan el DNA. Las células eucariotas han desarrollado los mecanismos RH y RNH

para reparar las roturas de doble cadena del DNA. La reparación por RH es un proceso complejo que involucra interacciones con la cromátida hermana, la cual actúa como cebador para la reparación (van Gent *et al.*, 2001) y es de gran importancia en la prevención de daños por fragmentación cromosómica, translocaciones y deleciones que conducen a la carcinogénesis (Winsey *et al.*, 2000). La RNH es un proceso relativamente simple que promueve la religación del DNA roto. Esto hace que la RH sea particularmente eficiente en la fase S cuando el DNA se replica (Takata *et al.*, 1998; Essers *et al.*, 2000); por ello, las roturas inducidas durante la replicación son un importante iniciador de la RH (Cox *et al.*, 2000).

En humanos, el reconocimiento y señalización de la doble rotura se lleva a cabo por un complejo de proteínas que incluyen la MRE11 y RAD50, y constituye la primera etapa en ambas vías de reparación: la homóloga y la no homóloga (Featherstone y Jackson, 1998; Kuschel *et al.*, 2002). Esta vía involucra más de 16 moléculas incluyendo los productos de BRCA1, BRCA2, XRCC2 y XRCC3 (Goode *et al.*, 2002). Un componente esencial en la RH es la proteína de intercambio de cadena, RecA (en bacterias) o Rad51 (en levaduras). La RH es promovida, presuntamente, por un grupo de genes evolutivamente conservados denominados grupo epistático RAD52. La reacción de intercambio entre las cadenas es catalizada por la RAD51 y facilitada por la RAD52, a través de una interacción directa. La RAD54 (ATPasa DNA dependiente) también interactúa directamente con RAD51 y la estimula. Las proteínas relacionadas con RAD51, como son RAD51B-D, XRCC2 y XRCC3, están también involucradas en la RH (Han *et al.*, 2004 a, b) (Figura 5). Tanto XRCC2 como XRCC3 tienen actividad ATPasa y actúan de forma similar en la reparación.

Los genes en humanos que tienen homología con la secuencia del *Rad51* y son responsables de detectar estos daños fueron clonados por complementación y son conocidos como *XRCC2* y *XRCC3* (Tebbs *et al.*, 1995; Tambini *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 1999). La significativa homología de sus productos proteicos con la recombinasa celular RAD51 indica que probablemente provienen de la duplicación de genes y divergencias en la evolución (Cartwright *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; O'Regan *et al.*, 2001).

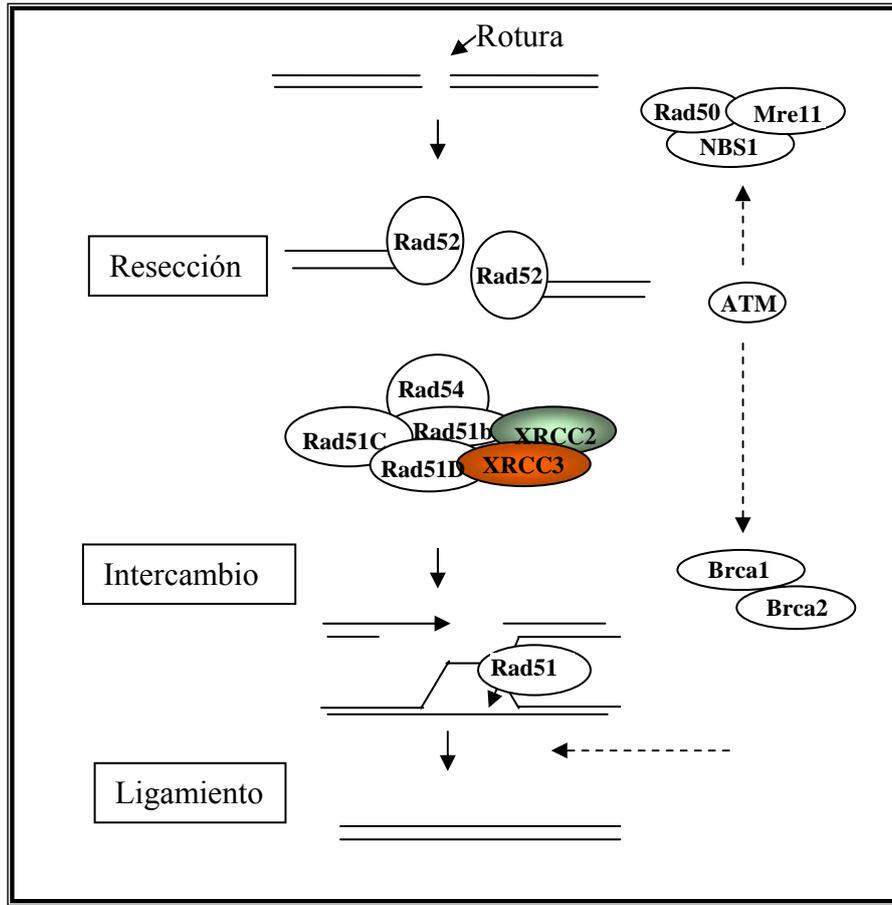


Figura 5: La recombinación homóloga en células somáticas consiste en un intercambio entre cadenas catalizado por Rad52 y Rad51 y que involucra XRCC2 y XRCC3 e, indirectamente BRCA1 y BRCA2. adaptada de <http://www.nih.gov/sigs/dna-rep.html> (Goode et al., 2002)

Las líneas celulares mutantes para estos genes son medianamente sensibles a la radiación ionizante (2 veces más), aunque extremadamente sensibles (100 veces) a agentes que producen entrecruzamientos como el cisplatino, la mostaza nitrogenada o la mitomicina C. Además, exhiben velocidades de crecimiento lento, fenotipo deficiente en recombinación/repación, inestabilidad cromosómica y acumulación de roturas espontáneas, presumiblemente atribuibles a deficiencias en la reparación en la horquilla de replicación (Liu *et al.*, 1998; Brenneman *et al.*, 2000; Deans *et al.*, 2000; Takata *et al.*, 2000, 2001). En los ratones, la disrupción de RAD51B, RAD51D, o XRCC2 produce letalidad embrionaria (Shu *et al.*, 1999; Pittman y Schimenti, 2000).

1.2.2.2.1. Gen XRCC2

El gen *XRCC2* fue mapeado en el cromosoma humano 7 (7q36.1). Tiene 3 exones (76.850 pb) y codifica para una proteína de 280 aminoácidos, con un peso molecular de 32 kDa (Jones *et al.*, 1995). Este gen pertenece al grupo de genes de la familia *Rad 51*, es un parálogo del *Rad 51* que codifica para un miembro de la familia de proteínas RecA/Rad51 (Liu *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2001; Johnson y Jasin, 2001). Funcionalmente complementa al mutante (deficiente de la reparación) *irs1SF* de hámster chino que es cromosómicamente inestable (Jones *et al.*, 1987; Fuller y Painter, 1988). Las líneas celulares de hámster deficientes de *XRCC2* muestran una reducción de 100 veces en la RH, en comparación con las líneas celulares parentales.

XRCC2 interactúa directamente con *RAD51L3* catalizando el apareamiento homólogo entre un oligonucleótido de simple cadena y la cadena doble del DNA (Kurumizaka *et al.*, 2002). Por microscopía electrónica se ha observado que *RAD51L3* y *XRCC2* forman una estructura anular multimérica en ausencia de DNA, y forman estructuras filamentosas en presencia de DNA de simple cadena.

Se han descrito varios polimorfismos para el gen *XRCC2*, tanto en la región 3' como en la 5'UTR, y otros en región codificante. De ellos, los mas estudiados son: el cambio de G por C en el nucleótido 4234 del extremo 5'UTR, otro en el codón 188, donde el nucleótido 31479 del exón 3 cambia de G a A, generando un cambio de arginina por histidina; y el tercero en la región 3'UTR donde el nucleótido 41657 cambia de C a T (Kuschel *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004b). El polimorfismo de mayor frecuencia en la población caucásica es el de la región 5' (0,22), siendo las frecuencias del *Arg188His* y del SNP de la región 3'UTR de 0,07 y 0,06, respectivamente (Kuschel *et al.*, 2002). Los estudios de asociación entre estos polimorfismos con la incidencia de cáncer han mostrado una asociación marginalmente significativa entre la variante rara del polimorfismo *Arg188His* y la inducción de cáncer de mama (Kuschel, *et al.*, 2002).

1.2.2.2.2. Gen XRCC3

El gen *XRCC3* fue clonado y mapeado en el cromosoma humano 14 (14q32.33) (Tebbs *et al.*, 1995). Tiene 7 exones y 36.628 pb y codifica para una proteína de 346 aminoácidos con peso molecular de 38 kDa (Hu *et al.*, 2001).

La proteína XRCC3 facilita la formación de los *foci* RAD 51 y la estabilización del multímero de RAD51 con el sitio dañado del DNA (Liu *et al.*, 1998, Masson *et al.*, 2001, Sonoda *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2004).

XRCC3 es un gen polimórfico, siendo los polimorfismos más descritos los siguientes: *Thr241Met*, que implica el cambio de C por T en el nucleótido 18067 (codón 241) ubicado en el exón 7; *Arg94His* donde en el nucleótido 10371 se cambia G por A; *IVS5-14* caracterizado por un cambio de A por G en el nucleótido 17893 del intrón 4; otro polimorfismo no conservativo en el nucleótido 4541 de la región 5'UTR, en el que se cambia A por G y varios en el extremo 3'UTR a nivel de los nucleótidos 19204 (cambio de C por T), 19288 (cambio de G por A), y 19510 (cambio de C por T) (Kuschel *et al.*, 2002, Han *et al.*, 2004). Para este gen se ha descrito también un polimorfismo de microsatélite raro el cual se ha asociado con cáncer en pacientes que exhiben diversa radiosensibilidad (Price *et al.*, 1997). El polimorfismo de mayor frecuencia (0,38%) en la población caucásica es *Thr241Met* (Shen *et al.*, 1998), que representa un cambio no conservativo en un residuo hidrofílico con un grupo hidroxilo por uno hidrofóbico con un grupo sulfurmetilo; sin embargo, el cambio no reside en los dominios de enlace con el ATP, los cuales son los únicos dominios funcionales descritos hasta el momento para la proteína (Shen *et al.*, 1998; Winsey *et al.*, 2000). Los estudios de los cambios estructurales y funcionales en la proteína que pudieran derivarse de la sustitución han sido insuficientes (Matullo *et al.*, 2001b; Stern *et al.*, 2002). Las consecuencias funcionales del polimorfismo *IVS5* y del cambio no codificante de la región 5' también permanecen desconocidas (Liu *et al.*, 1998; Matullo *et al.*, 2001 a, b).

1.2.3. Genes relacionados con la síntesis hormonal del tiroides

Virtualmente, todos los genes que codifican proteínas tiroideas, ya sean enzimáticas o estructurales, que participan en la síntesis hormonal del tiroides, pueden estar involucrados en la dishormonogénesis, patología y, en particular, en la carcinogénesis de la glándula. El estudio de los procesos celulares, de síntesis, y de secreción hormonal del tiroides, a la par del desarrollo de las técnicas de clonación molecular está conduciendo al mejor conocimiento de las proteínas implicadas en la fisiología tiroidea. La tiroglobulina (TG), la tiroperoxidasa (TPO), el receptor de TSH (TSHR), o la proteína Gs acoplada a este receptor, junto al transportador de yodo

dependiente de sodio (NIS (Na^+/I^- symporter)), son moléculas identificadas como importantes en la funcionalidad del tiroides (Figura 6) (Moreno, 2001).

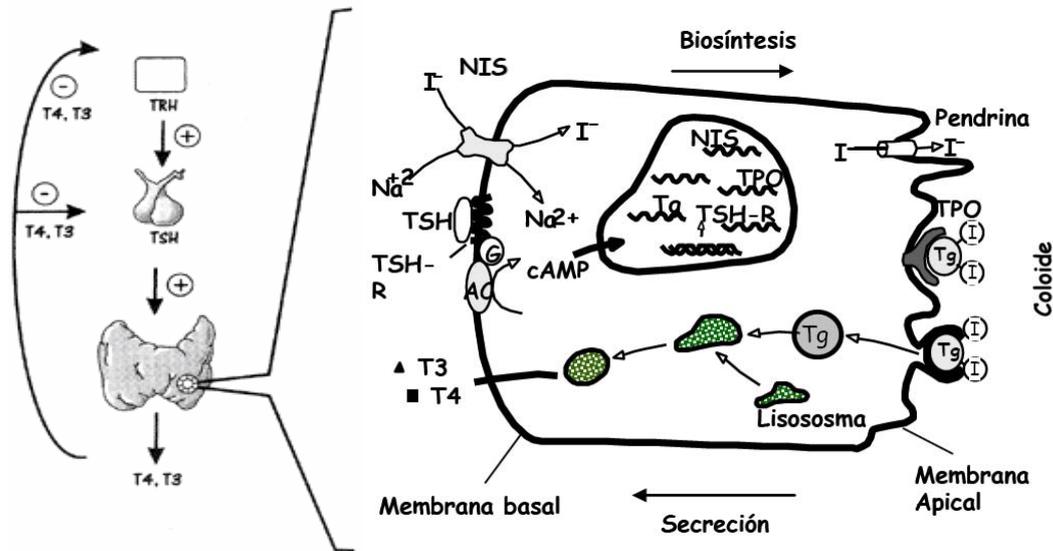


Figura 6. Se representan las proteínas específicas del tiroides TG, NIS, TPO y TSHR que participan en la biosíntesis y secreción de las hormonas tiroideas T3 y T4. Modificado de Kopp (2001).

1.2.3.1. Gen *TSHR* (Receptor de TSH)

Como se ha descrito en párrafos anteriores, la actividad funcional de la glándula y su crecimiento están sometidos a un fino control hormonal, siendo TSH la principal hormona reguladora. La regulación TSH-dependiente sigue la vía TSHR-adenilciclase-AMPC, de lo que se deriva que el receptor TSHR también tiene un papel crucial en los procesos de desarrollo, diferenciación y funcionalidad de las células tiroideas (Kopp, 2001). De esta importancia funcional se dedujo que el gen *TSHR* tiene implicación en las enfermedades benignas y malignas tiroideas. Para las primeras, por ejemplo, se ha descrito que *TSHR* está involucrado en la patogénesis de la enfermedad de Graves, hipotiroidismo autoinmune, hipertiroidismo no autoinmune esporádico y familiar, adenomas tóxicos, etc. Las referencias de su asociación con la carcinogénesis tiroidea han suscitado, desde su clonación en 1989, un inusitado interés por su estudio (Kopp, 2001). De este modo, se ha considerado como un candidato a ser marcador de susceptibilidad para el cáncer tiroideo, sobre todo, para su variante no medular (Matakidou *et al.*, 2004).

El gen codificador del receptor TSH se encuentra en el cromosoma 14 (14q31) (Akamizu *et al.*, 1990; Libert *et al.*, 1990, Rousseau-Merck *et al.*, 1990; Kopp, 2001) y está formado por 191 Kb distribuidas en 13 exones y 12 intrones. Los primeros 9 exones codifican la mayoría del dominio extracelular, el exón 10 lo hace para el grupo carboxiterminal de este dominio (Kopp, 2001; Kakinuma y Nagayama, 2002). Su producto proteico es una glicoproteína que se expresa en la membrana basal de las células foliculares tiroideas, en cerebro, ojos, glándulas adrenales, riñón, timo, miocitos cardíacos, tejido adiposo, epitelial y nervioso (Nagayama *et al.*, 1989).

El receptor de TSH es un miembro de la superfamilia de receptores de membrana acoplados a proteínas G; tiene 764 aminoácidos, un peso molecular de 86,8 kDa y una estructura compleja, constituida por 7 segmentos intramembranosos, 5 sitios de glicosilación, 3 asas extracelulares, 3 asas intracelulares, una porción intracelular carboxiterminal y una extracelular aminoterminal, que le confiere una alta capacidad de unión. El dominio extracelular está codificado por los 9 primeros exones y los demás dominios por el exón 10.

TSHR actúa como un receptor funcional que activa la adenilciclase en respuesta a TSH. Con cantidades normales de TSH el receptor se une a la subunidad α de la proteína $G_{s\alpha}$, la cual activa la adenilciclase y aumenta la producción de AMP cíclico (Kopp, 2001; Arturi *et al.*, 2003). Este segundo mensajero regula la expresión de los factores de transcripción, los que a su vez regulan la expresión de los genes tiroideos (Santisteban, 2006). Sin embargo, con niveles elevados de TSH, la unión es a una subunidad de $G_{q/11}$ dando como consecuencia la activación de la fosfolipasa C (Kattah, 2004)

La TSH, tras unirse a su receptor TSHR acoplado a proteínas G induce la cascada AMPc/PKA, o la del Ca^{2+} y PKC. La activación de la adenilciclase aumenta el AMPc intracelular que fosforila la PKA, la cual, en última instancia, es la responsable de activar factores de transcripción en el citosol y el núcleo, tales como el factor CREB. Para el caso de los genes tiroideos *TG*, *TPO* y *NIS*, no se han descrito elementos CRE, pero sí para *TSHR*. La función tiroidea está regulada, además, por otras hormonas como la insulina o factores de crecimiento (IGF-1, TGF β , etc). La insulina actúa a través del receptor de IGF-1, siendo por tanto esta citoquina la funcional, en un mecanismo que implica principalmente la vía PI3K y Akt (Figura 7).

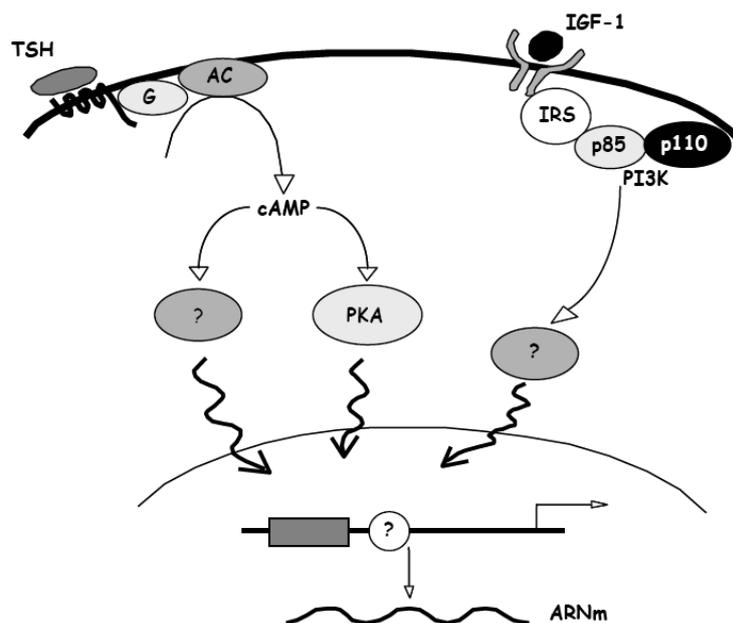


Figura 7: Vías de transducción de señales más estudiadas en tiroides. La TSH tras su unión al receptor acoplado a proteínas G induce la actividad adenilato ciclasa con el consiguiente aumento de AMPc y la activación de la PKA. La insulina y el IGF-1 tras su unión a su receptor de tirosina quinasa, induce la activación de la vía PI3K/Akt. Ambas vías convergen en la regulación transcripcional de genes tiroideos.

Estudios recientes sugieren que las alteraciones en el gen *TSHR* son capaces de inducir de forma constitutiva la activación de la cascada regulatoria de AMPc independiente de TSH (Mühlberg *et al.*, 2000). Se ha descrito que estas mutaciones cosegregan con hipertiroidismo, hiperplasia y tumores. Como consecuencia del permanente estímulo del AMP cíclico se produce hiperplasia de las células tiroideas y sobreviene el hipertiroidismo. El mejor ejemplo de lo anterior es la enfermedad de Graves en la cual los anticuerpos dirigidos contra el receptor ejercen una acción estimuladora permanente sobre él, incrementando la susceptibilidad a esta enfermedad (Kattah, 2004). Algunas mutaciones somáticas en el gen de *TSHR* también se han relacionado con tumores benignos (adenomas) con hiperactividad tiroidea, caracterizados por crecimiento autónomo TSH-independiente, hipersecreción de hormonas y supresión de TSH (Mühlberg *et al.*, 2000).

Por el contrario, ciertas mutaciones en *TSHR* en personas resistentes a la hormona estimulante del tiroides, causan hipotiroidismo congénito

La mayoría de las mutaciones del gen *TSHR* se han mapeado en el exón 10, de forma más particular se han localizado en los segmentos membranosos y en el dominio

C terminal. Más recientemente se ha descrito una gran frecuencia de polimorfismos germinales (33,3%) que se localizan en la cola citoplasmática del TSHR en pacientes con bocio multinodular tóxico (Muhlberg *et al.*, 2000).

Después de una década de la primera descripción de mutaciones en el gen *TSHR* en adenomas autónomos esporádicos, la patogénesis de los adenomas permanece sin esclarecerse; sin embargo, hay consenso general en atribuir un papel principal en la carcinogénesis tiroidea a las mutaciones que activan constitutivamente el receptor humano de la TSH.

En el adenoma tiroideo tóxico se ha identificado la sustitución de alanina por asparagina en el codón 593 (*Ala593Asn*), correspondiente a la quinta hélice transmembrana de TSHR. Esta mutación activa constitutivamente a TSHR, y reside en el alelo en el que se localiza también el polimorfismo *Asp727Glu*. Este SNP es un cambio de C por G en el nucleótido 2181 del exón 10, que produce la sustitución de ácido aspártico por glutámico en el codón 727, correspondiente al dominio C terminal intracelular (Sykiotis *et al.*, 2003). Dicho cambio se ha asociado con un incremento de AMPc en respuesta a la estimulación por TSH; esto subraya el papel de este polimorfismo en la patogenia de la enfermedad de Graves (Ban *et al.*, 2002; Chistiakov 2003).

Se han descrito, además, otras variantes polimórficas como *Asp36His* y *Pro52Thr* localizadas en el exón 1 (Simanainen *et al.*, 1999) que afectan el dominio extracelular (Chistiakov 2003). En el primer caso, el cambio de C por G en el nucleótido 205 provoca el cambio de *Asp* a *His* en el codón 36, mientras que en el segundo se sustituye la C del nucleótido 253 por A provocando cambio de prolina (Pro) por treonina (Thr) en el codón 52. Respecto al papel de estos polimorfismos, se sugiere una asociación con la enfermedad de Graves y la oftalmopatía de Graves, respectivamente (Heldin *et al.*, 1991; Bahn *et al.*, 1994). Sin embargo, otros autores no encontraron ninguna asociación para estos polimorfismos (Simanainen. *et al.*, 1999).

1.2.3.2. Gen TG

La TG es la proteína más expresada en la glándula tiroidea y funciona como almacén 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 desordenes son importantes factores de riesgo para el desarrollo de carcinomas tiroideos, sobre todo no medulares (Matakidou *et al.*, 2004).

El gen de la *TG* humana está ubicado en el brazo largo del cromosoma 8 (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 ARNm de 8.7 Kb, lo que indica que el 97 % de las secuencias del gen corresponde a intrones (47 intrones) (Targovnik *et al.*, 2001). En los últimos años se ha completado la determinación de la organización estructural del gen de la *TG* humana por caracterización de recombinantes, por sondas de RT-PCR y secuenciación. Además de confirmarse que el gen está compuesto por 48 exones, en su mayoría de 100-200 pb (Mayayo *et al.*, 1998), se delimitaron los exones de las secuencias intrónicas lindantes. Los sitios hormonogénicos aceptores fueron establecidos en los exones 2, 18, 44, 45 y 48. Se identificaron tres potenciales sitios dadores en tirosinas de los exones 4, 10 y 21, respectivamente.

El proceso de transcripción del gen también ha sido objeto de estudio. El promotor es un fragmento de DNA de unos 200 pb en el extremo 5', delante del sitio de iniciación de la transcripción, al que se unen distintos 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. El IGF-1 actúa aditivamente con la TSH en la regulación de *TG* induciendo, por tanto, la expresión de este gen (Santisteban, 2006).

El gen codifica para 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. Se sintetiza exclusivamente en el tirocito, a nivel del retículo endoplásmico, y se glicosila en el aparato de Golgi de la célula folicular, constituyendo casi la totalidad del coloide tiroideo. Una vez formada, se localiza en la interfase célula-coloide en donde se produce la yodinación y, posteriormente, la organificación y el acoplamiento de las yodotironinas para la síntesis de hormonas tiroideas. A través de exocitosis se deposita en el coloide (Figura 6) (Ieiri, 1991; Santisteban, 2006). Se comporta como una prohormona cuya hidrólisis completa

produce solamente de 2 a 4 moléculas de yodotiroxinas T4 y T3, por lo que se dice que su síntesis y metabolismo tienen características aparentemente derrochadoras.

La clonación molecular ha permitido saber que la tiroglobulina pertenece a una superfamilia de serina hidrolasas, incluso acetilcolinesterasa. 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 aminoterminal 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 carboxiterminal no presenta zonas de homología interna y tiene características constitutivas diferentes a la región aminoterminal, lo que sugiere distintos orígenes evolutivos de las dos regiones. Este extremo, sin embargo, tiene similitud con la acetilcolinesterasa y repeticiones tipo 3 (Park y Arvan, 2004). La organización proteica repetitiva hace a la TG 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 patogenia de la glándula tiroidea. La primera mutación identificada en el gen *TG* fue la delección del exón 4 debido 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 defecto en el transporte intracelular de TG (Targovnik *et al.*, 2001). Por otra parte, estudios recientes han proporcionado evidencias de que diversos marcadores dentro del gen *TG* están asociados con susceptibilidad a enfermedades autoinmunes del tiroides (Sakai *et al.*, 2001; Ban *et al.*, 2004). La presencia de SNPs en este gen se ha asociado a tiroiditis autoinmune, tanto en ratones como en humanos (Tomer y Greenberg, 2004 a, b). Se han identificado 14 SNPs en el gen *TG* y más específicamente un grupo de SNPs en el exón 10-12 y otro en el 33 que tienen una asociación significativa con la tiroiditis autoinmune; por tanto, se ha concluido que *TG* es un marcador de susceptibilidad para enfermedades autoinmunes del tiroides (Ban *et al.*, 2003). (Tabla 1).

El hipotiroidismo también se ha correlacionado con mutaciones de diversa índole en el gen *TG*, sean tanto delecciones de un pequeño segmento del gen como cambios en un único par de bases.

Tabla 1. SNPs del gen *TG* asociadas a enfermedades autoinmunes del tiroides.

SNP	Alelo	Localización	Posición nucléotido	Posición aminoácido	Sustitución
E10SNP24	T/G	Exon 10	2200	734	Ser/Ala
E10SNP158	T/C	Exon 10	2334	778	Pro/Pro
E12SNP	A/G	Exon 12	3082	1027	Met/Val
E18SNP-20	T/C	Intron 17			
E18SNP88	A/G	Exon 18	3935	1293	Asp/Gly
E21SNP	T/C	Exon 21	4506	1501	Ala/Ala
E27SNP-30	C/T	Intron 26			
E29SNP	G/A	Exon 29	5512	1837	Asn/Asp
E33SNP	C/T	Exon 33	5995	1980	Arg/Trp
E34SNP+33	A/G	Intron 34			
E34SNP+73	G/A	Intron 34			
E43SNP4	C/T	Exon 43	7408	2469	Leu/leu
E43SNP97	T/C	Exon 43	7501	2500	Arg/Trp
E46SNP	C/T	Exon 46	7920	2621	Tyr/Tyr

Tomado de Ban *et al.*, 2003

La sustitución de G por T en el nucleótido 2610, que implica un cambio de histidina por glutamina en el codón 870 (*His870Gln*), es la alteración más frecuentemente descrita en el gen. Este cambio modifica la conformación tridimensional de la tiroglobulina y por ende su disponibilidad para la hormonogénesis, con lo cual se favorece la aparición de desórdenes tiroideos benignos.

Son varios los polimorfismos de *TG* que se han asociado con la incidencia de bocio. Que el bocio se observe con frecuencia en asociación con casos de cáncer tiroideo no medular y se considere un factor de riesgo para el desarrollo de estos tumores es un modo de sustentar 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 sutiles variaciones 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 observada 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 aparte de la radiación ionizante en la infancia, son los nódulos benignos y el bocio 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).

Considerando lo anteriormente expuesto, es lógico plantearse el estudio de los polimorfismos de *TG* como posibles marcadores de susceptibilidad al cáncer de tiroides.

1.2.4. Genes de control del ciclo celular

1.2.4.1. Gen *PTPRJ* (Receptor de fosfatasa de tirosina tipo j)

La fosforilación reversible de proteínas es un proceso dinámico implicado en la regulación de múltiples funciones celulares. De las miles de proteínas que se expresan en una célula típica de mamífero, un tercio contiene un grupo fosfato unido covalentemente. Los tres aminoácidos que pueden ser fosforilados en las proteínas son: Ser, Thr y Tyr. La fosforilación en residuos Ser/Thr es mucho más frecuente que en residuos Tyr. Sin embargo, aunque estos últimos sólo representan el 0,01-0,05% del total de fosfoaminoácidos, regulan procesos cruciales para el funcionamiento de la célula y de cualquier organismo como son el crecimiento, la diferenciación y la transformación celular. Los niveles de fosforilación en tirosina son el resultado de la acción coordinada y regulada de dos tipos de enzimas: proteínas tirosinas quinasas (PTKs) y proteínas tirosinas fosfatasas (PTPs). Inicialmente, la mayoría de los estudios se centraron sobre las PTKs, mientras que las PTPs no despertaron un especial interés en la comunidad científica. Se las consideraba un componente poco sofisticado en las reacciones de fosforilación, incluso se dudaba de su especificidad al pensar que sólo unas pocas tirosinas fosfatasas, relativamente inespecíficas, eran capaces de terminar el trabajo de numerosas tirosinas quinasas. Sin embargo, los resultados de los últimos años han demostrado que las PTPs forman una gran superfamilia de enzimas, sometidas a una compleja regulación, que van a intervenir en el control de múltiples rutas de señalización celular y que participan en una notable variedad de procesos celulares incluyendo el crecimiento, el mecanismo de inhibición por contacto del crecimiento celular, la diferenciación, el ciclo mitótico, y la transformación oncogénica. Además, presentan una elevada especificidad de sustrato, llegando incluso a diferenciar el lugar de fosforilación que será hidrolizado dentro de cada sustrato.

Actualmente, la superfamilia de las PTPs está formada por las denominadas PTPs clásicas, PTPs de especificidad dual y las PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10*). Las PTPs clásicas se caracterizan por tener al menos un dominio de 240-250 aminoácidos muy conservados que rodean a la secuencia consenso y que se denomina dominio catalítico o dominio PTP. Esta familia puede subdividirse en 2 grupos, dependiendo de la localización celular: las PTPs intracelulares y las PTPs transmembrana o similares a un receptor. Las PTP no receptor son enzimas intracelulares que tienen un solo dominio catalítico. Las PTP transmembrana presentan una estructura similar a la de un receptor típico de membrana: un dominio extracelular variable, un dominio transmembrana y uno o dos dominios catalíticos intracelulares. Los dominios extracelulares pueden interactuar con ligandos que regulan la actividad de los dominios catalíticos (Zapata *et al.*, 2004).

Estas fosfatasas interactúan con las quinasas y el balance de la actividad de las fosfatasas de tirosina y quinasas de tirosina es lo que permite el correcto funcionamiento, la proliferación celular, así como la transducción de señales. Por el contrario, la existencia de un desequilibrio funcional puede derivar en un proceso oncogénico, y los genes cuya correcta funcionalidad depende de este balance se constituyen en marcadores de susceptibilidad para tumores. Si, en un sentido, se ha sugerido que las quinasas pueden actuar como oncogenes, en otro, se plantea que las fosfatasas pudieran funcionar como genes supresores de tumores (Powell *et al.*, 2004).

Uno de esos genes es, precisamente, el que codifica para el receptor para la fosfatasa de tirosina (PTPRj). Honda *et al.*, (1994) clonaron y caracterizaron el gen en humanos y lo designaron *HPTP-eta*. Este gen tiene además otros símbolos sinónimos *DEP1*, *SCC1*, *CD148*, *R-PTP-ETA* (HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC))

El gen, que tiene 187,56 Kb y está compuesto por 26 exones, se ha mapeado en el cromosoma 11 (11p11.2) por hibridación *in situ* fluorescente. La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de las fosfatasas de tirosina, tiene una masa molecular de aproximadamente 220 a 250 kDa y contiene una región extracelular con 9 repeticiones de fibronectina tipo III, una región transmembrana y una región citoplasmática que contiene un dominio catalítico fosfatasa y así representa un receptor de tipo PTP.

La proteína PTPRJ ha sido identificada como la proteína que es codificada por el gen murino *Scc1* (*susceptibility to colon cancer-1*) que confiere susceptibilidad al cáncer de colon (Lesueur *et al.*, 2005). Aunque, curiosamente, no hay evidencias de LOH en *Ptprj* en tumores de colon de ratón, en humanos si se ha relacionado la presencia de mutaciones y pérdida de heterocigosidad de *PTPRJ* con el cáncer de mama, de pulmón y colon (Ruivenkamp *et al.*, 2002; van Puijenbroek *et al.*, 2005). Se ha encontrado, asimismo, una fuerte asociación entre la pérdida de heterocigosidad (LOH) del gen *PTPRJ*, la pérdida cromosómica de 18q12-21 y la progresión del tumor en el cáncer colorectal (Demant, 2003). También se ha descrito que la pérdida cromosómica es más frecuente en adenomas con LOH en *PTPRJ* que en adenomas sin ningún cambio aparente en *PTPRJ*.

En rata este gen está involucrado en la tumorigénesis de la glándula tiroidea, probablemente por estabilización de p27Kip1. El fenotipo neoplásico de células transformadas de tiroides de rata que han perdido la expresión de PTPRJ se revierte por la expresión de esta proteína (Trapasso, 2000). Tanto en ratas como en humanos, la expresión del gen se correlaciona con la inhibición del crecimiento celular y de la tumorigénesis en varios tipos celulares (Trapasso, 2000). En humanos la presencia de polimorfismos en este gen se ha asociado con diversos carcinomas (Lesueur *et al.*, 2005; van Puijenbroek *et al.*, 2005). Varios autores coinciden en que el perfil genotípico de *PTPRJ* afecta la susceptibilidad en el caso de carcinomas tiroideos y que la pérdida alélica de este gen influye en la carcinogénesis tiroidea (Iuliano *et al.*, 2004). También se ha señalado que tener un haplotipo específico para *PTPRJ* confiere efecto protector sobre el riesgo de cáncer de mama. Más recientemente se ha observado que este gen afecta también la angiogenesis (Takahashi *et al.*, 2003)

Se ha encontrado deleciones, desbalances alélicos con pérdida de heterocigosidad o mutaciones sin sentido de *PTPRJ* en adenocarcinomas colorectales y carcinomas de pulmón y mama. Así, por ejemplo, en líneas celulares humanas derivadas de individuos con cáncer de mama, la inducción de la diferenciación incrementa la expresión de PTPRJ y su transfección en células indiferenciadas induce la diferenciación e inhibe el crecimiento (Ruivenkamp *et al.*, 2002). Estos resultados avalan la evaluación de genes humanos homólogos a genes modificadores de cáncer en ratón como marcadores de susceptibilidad para el cáncer (Lesueur *et al.*, 2005). Por ello, *PTPRJ* puede

considerarse un gen de baja penetrancia de susceptibilidad en la carcinogénesis humana (Ruivenkamp *et al.*, 2002; Demant, 2003; Lesueur *et al.*, 2005).

En los estudios de este gen se han identificado 5 mutaciones somáticas sin sentido en el cáncer de colon. Los alineamientos de secuencias, la predicción de estructuras secundarias y la modelación de homólogos predicen que la mayoría de estos cambios se localizan en la porción extracelular del producto del gen, porción que está involucrada en interacciones con ligandos u otras proteínas y que pudieran afectar el proceso de señalización. Una de las mutaciones descritas es un cambio de arginina a cisteína en el codón 214 (*Arg214Cis*) con la consiguiente pérdida de la carga positiva. Otra es la correspondiente al cambio de glutamina por prolina en el codón 276 (*Gln276Pro*).

Ambos cambios no conservativos se corresponden con algunos de los polimorfismos más estudiados en este gen, que se localizan en los exones 5, 6 y 13. Precisamente, la sustitución de glutamina por prolina en el codón 276 (antes mencionada) es consecuencia de un cambio de A por C en el nucleótido 1176 del exón 5. En el exón 6, G se cambia por A en el nucleótido 1326 y provoca que la arginina tome la posición de la glutamina en el codón 326 (*Arg326Gln*) y, finalmente, en el exón 13 a nivel del nucleótido 2965 hay un cambio de G por C que hace en el codón 872 se sustituya aspártico por glutámico (*Asp872Glu*) (Ruivenkamp *et al.*, 2002).

1.3. Estudio de la asociación de los marcadores de susceptibilidad y el cáncer de tiroides

1.3.1. Evaluación de marcadores de susceptibilidad

1.3.1.1. Métodos convencionales

Las metodologías moleculares han revolucionado el análisis genético y se han usado para la construcción de mapas de ligamiento, para trazar estrategias de selección asistida por marcadores, para pruebas de parentesco, y también para la identificación de especies y estudios de genética de poblaciones. Los marcadores del DNA constituyen la nueva generación de marcadores moleculares que han solucionado el problema de la poca variabilidad que tenían las isoenzimas, siendo capaces de generar una cantidad muy grande de marcadores. Existen varias técnicas para identificar marcadores del DNA, que se pueden agrupar en tres categorías: las de hibridación tipo Southern y más

recientemente los microarrays, las de reacción de polimerización en cadena (PCR) y las que combinan PCR o sus productos con la hibridación.

1.3.1.1.1. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue ideada en 1989 por Kary B. Mullis y se puede considerar como la técnica más revolucionaria en el campo de la biología molecular de los últimos años. Consigue amplificar más de un millón de veces el DNA de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. No cabe duda de lo acertado de la definición: "*una técnica que consigue encontrar la aguja en el pajar, al tiempo que produce un pajar de agujas*". Por su factibilidad, flexibilidad y versatilidad ha dado nuevas alas a la Ingeniería Genética y a toda la Biología Molecular.

La PCR es un método enzimático que permite la síntesis *in vitro* de múltiples copias de una secuencia determinada de DNA. Se basa, en su forma más simple, en la realización de tres reacciones sucesivas: desnaturalización, hibridación y extensión, llevadas a cabo a distintas temperaturas (Figura 8).

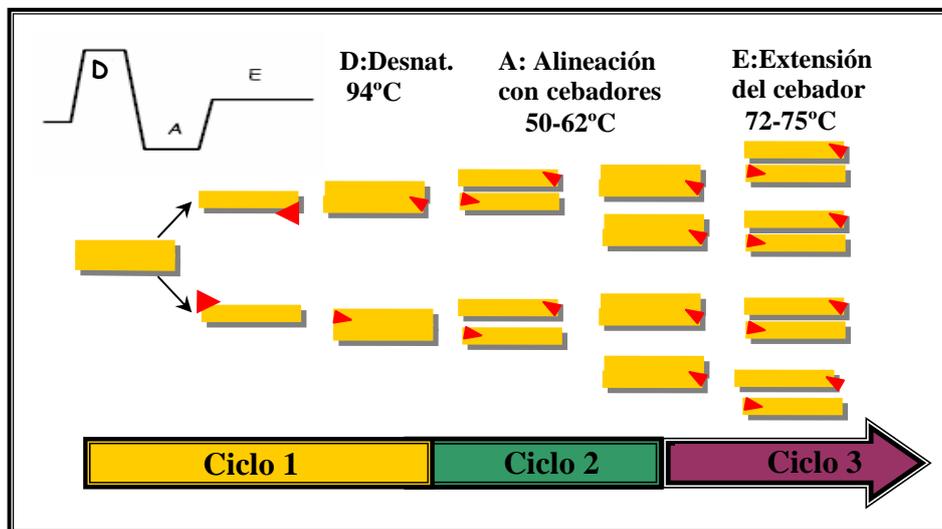


Figura 8: Reacción en Cadena de la Polimerasa

La muestra se calienta hasta lograr la separación de las dos cadenas del DNA, seguidamente se reduce la temperatura permitiendo el apareamiento de cada una de las dos cadenas cortas de oligonucleótidos (cebadores) con las hebras complementarias del DNA molde. La enzima DNA polimerasa sintetiza la secuencia complementaria al DNA

molde por extensión de los cebadores, incorporando desoxidonucleósidos trifosfato (dNTPs). La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquella a la que funciona la DNA polimerasa. La aplicación de numerosos ciclos en cadena da lugar a la amplificación geométrica del segmento de DNA delimitado por los cebadores (Leonardo y Kornbliht, 1993).

La PCR es una técnica versátil que admite combinación con otras metodologías para el estudio de los polimorfismos. Hasta la fecha, los análisis basados en geles de electroforesis son de las técnicas mejor establecidas y más empleadas para detectar tanto polimorfismos multialélicos (micro y minisatélites) como polimorfismos reconocidos por enzimas de restricción (Pharoah *et al.*, 2004).

Los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) son marcadores moleculares que empezaron a ser usados a finales de la década de 1970. La metodología **PCR-RFLP** combina la amplificación por **PCR** de una secuencia conocida de DNA y la digestión del amplificado con una enzima con actividad endonucleasa específica (**enzima de restricción**). Puesto que las deleciones, sustituciones o mutaciones pueden alterar significativamente las dianas para las enzimas de restricción, ya sea por generación o por pérdida de sitios de restricción, el análisis de los productos de digestión permite la rápida detección de mutaciones puntuales en la secuencia que fue amplificada por PCR. La especificidad de reconocimiento y corte hace posible que se generen diferentes patrones de banda para cada alelo, identificables por electroforesis en geles de agarosa y, con ello, se consiga detectar el polimorfismo.

Sin embargo, existe una gran demanda de técnicas más rápidas y eficientes que permitan el análisis de cientos o incluso miles de muestras en un solo día. Algunas de estas técnicas más novedosas son la PCR a tiempo real, la espectrometría de masas y los microarrays (Imyanitov *et al.*, 2004).

1.3.1.2. PCR en tiempo real en la detección de SNPs

Hasta hace relativamente pocos años, la detección de mutaciones puntuales se hacía exclusivamente por medio de técnicas electroforéticas en geles, (PCR-RFLPs, análisis conformacional de cadena sencilla (SSCP), electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) y HPLC desnaturizante (DHPLC).

A pesar de su efectividad, estas técnicas necesitan pasos adicionales para el análisis de los resultados y tienen mayor probabilidad de que se produzcan contaminaciones, por lo que su idoneidad se limita a estudios de pequeña escala (De Silva y Wittwer, 2000).

Si consideramos el mayor conocimiento que hoy tenemos de los SNPs y el incremento de los estudios sobre su asociación con diversas enfermedades, no es de extrañar el impulso que han experimentado otros métodos para estudiar los mismos (Syvanen, 2001; Tsuchihashi y Dracopoli, 2002).

Entre estos nuevos métodos, aquellos que no implican la realización de geles se perfilan como los mejores candidatos a estudios de gran escala (Shi, 2001). La técnica conocida como PCR a tiempo real es una de las metodologías de mayor aceptación por su versatilidad, eficacia y robustez. Combina ciclos rápidos de PCR con el uso de colorantes fluorescentes o sondas fluorogénicas, y su diseño permite completar la amplificación y el análisis del resultado en el mismo vial, lo que ha acelerado el proceso analítico, reducido el riesgo de contaminación y de otros errores humanos.

La amplificación en la PCR a tiempo real concibe la detección de la amplificación por fluorescencia, ya sea empleando agentes intercalantes o sondas específicas marcadas con fluorocromos. Al igual que la PCR clásica, ésta se desarrolla en varios ciclos de tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión, pero los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial, sin necesidad de ninguna acción posterior. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realiza la amplificación. La emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Figura 9).

El sistema Lightcycler de [Roche Molecular Biochemicals](#) es uno de los sistemas que realizan PCR a tiempo real. La innovadora tecnología fluorescente combinada con el termociclador ultra-rápido (Figura 10 y 11), permite la completa amplificación y análisis de las muestras en 20-30 minutos.

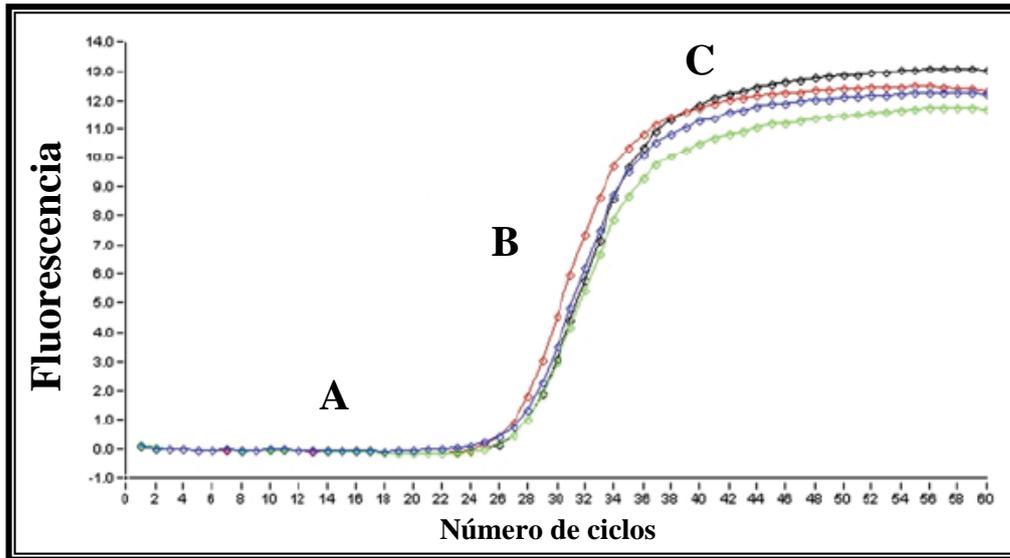


Figura 9: Curva de amplificación en la PCR a tiempo real (fluorescencia vs. número de ciclos). Es una curva sigmoidal donde: A: no puede verse la amplificación debido a que la fluorescencia es demasiado baja y el fluorímetro no la puede diferenciar de la fluorescencia de fondo; B: fase de crecimiento exponencial equivalente al aumento del número de moléculas, la fluorescencia alcanza un nivel suficiente para ser detectada; C: los cebadores y la enzima comienzan a ser limitantes en la reacción, se pasa de una fase de transición a una de meseta, donde tiene lugar muy poco o ningún aumento de la fluorescencia (Mackay et al., 2002).

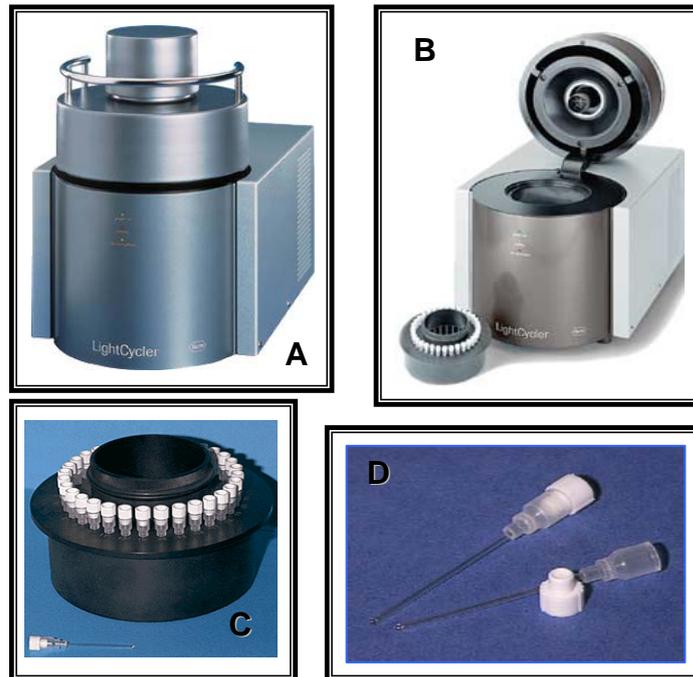


Figura 10: Termociclador LightCycler de Roche. A. LightCycler cerrado; B. LightCycler abierto, mostrando la cámara térmica en la que se inserta el carrusel con los capilares C. Carrusel con los 32 capilares; D. Capilares de 20 µL de capacidad y su tapa. <http://www.roche-mb.com>

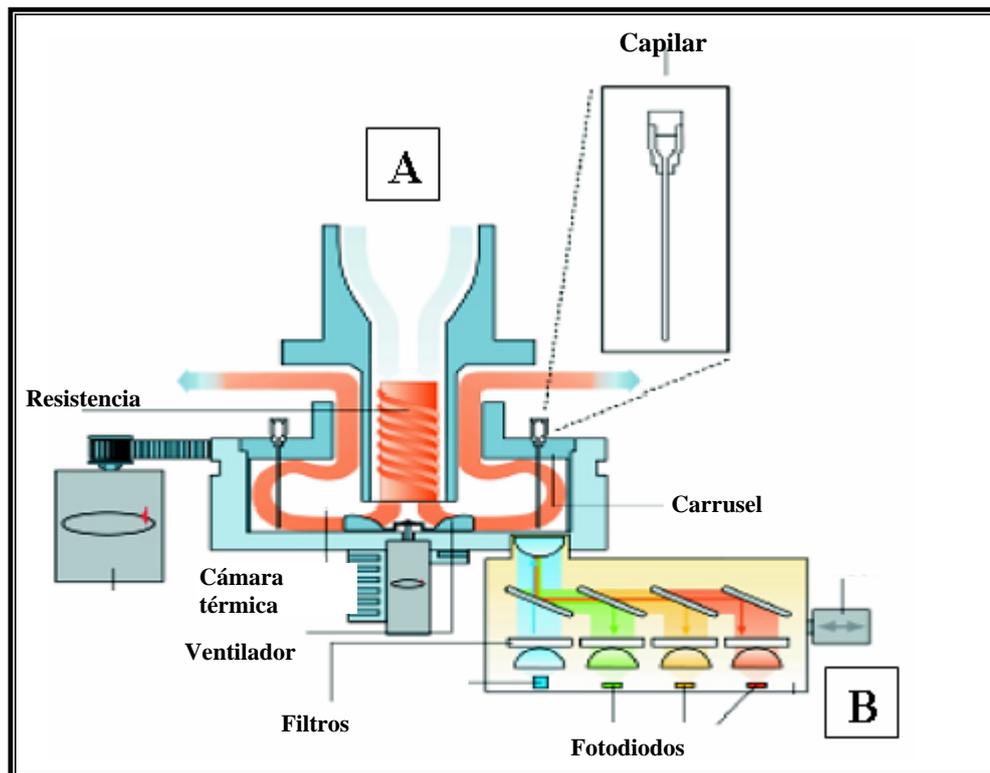


Figura 11: Esquema del interior del termociclador LightCycler Roche. A. Cámara térmica donde va colocado el carrusel, la espiral y los ventiladores; B. El fluorímetro con la LED y los canales de detección de fluorescencia. <http://www.roche-mb.com>

Este sistema se caracteriza por:

Rapidez: los ciclos son más cortos (duran entre 20 y 60 segundos) gracias a que el **termociclador** (de alta velocidad) utiliza un sistema de transferencia de calor por aire altamente eficaz. La temperatura se alcanza diez veces más rápidamente que en un termociclador convencional (Bernard *et al.*, 2001; Wittwer, 2001). Además, los **capilares** de 1,5 mm de diámetro tienen una elevada relación superficie/volumen que permite el rápido y uniforme calentamiento y enfriamiento de la muestra, pudiéndose conseguir cambios de temperatura de hasta 20°C por segundo (Lay y Wittwer, 1997; Wittwer, 2001; Bernard *et al.*, 2001; Wittwer *et al.*, 1997b). Estos capilares se colocan en la placa giratoria en el interior de la cámara térmica y así quedan expuestos al aire (Figuras 10 y 11).

Detección de diversas longitudes de onda: se puede conseguir por la combinación de varias características de la técnica y el equipo: a) al uso de sondas marcadas con fluorocromos (FRET, TaqMan, Molecular Beacon y sondas Scorpion) o un agente intercalante fluorescente (SYBRGreen); b) la presencia de la unidad óptica avanzada que contiene un diodo LED (light emitting diode), que emite luz azul (470nm) que

excita los fluorocromos amarillos, fluoresceína (FAM, FITC) y SYBR Green y c) a tres canales que detectan la luz emitida por los fluorocromos o el SYBRGreen en tres diferentes longitudes de onda: luz verde (530 nm, fluoresceína y SYBRGreen), luz roja (640 nm, LightCycler® Red 640) y cerca del infrarrojo (710 nm, LC Red 700).

Cuantificación rápida y exacta: Las lecturas de fluorescencia efectuadas en cada ciclo y en cada muestra se hacen en tan sólo 20 milisegundos (Lay y Wittwer, 1997; Wittwer *et al.*, 1997a; Bernard *et al.*, 2001; Wittwer, 2001).

Análisis flexible. La transferencia térmica de alta velocidad y el sistema de medida mediante fluorescencia posibilitan la observación de la evolución de la PCR en tiempo real y en la pantalla del ordenador.

Total eliminación de riesgos de contaminación. Los capilares se pueden usar de cubeta espectrofotométrica, por lo que la amplificación y detección de fluorescencia se desarrollan en el mismo tubo sin necesidad de abrirse, lo que impide el riesgo de contaminación.

El sistema Lightcycler permite usar distintos protocolos para la incorporación y detección de fluorescencia. Las dos técnicas más comunes son:

- **Agentes que se intercalan en la molécula de DNA:** Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el **SYBR Green I** (Figura 12). El incremento de DNA en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. La señal será detectable a partir de un número determinado de ciclos, dependiendo de la concentración de partida. Las mediciones pueden hacerse una vez por ciclo o continuamente. Esta característica permite no sólo genotipar sino también cuantificar el número de moléculas en la muestra, usando estándares externos de concentración conocida se puede determinar la concentración de la muestra mediante comparación de las curvas de fluorescencia.

El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Sin embargo, tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y, además, es más barato que las sondas específicas.

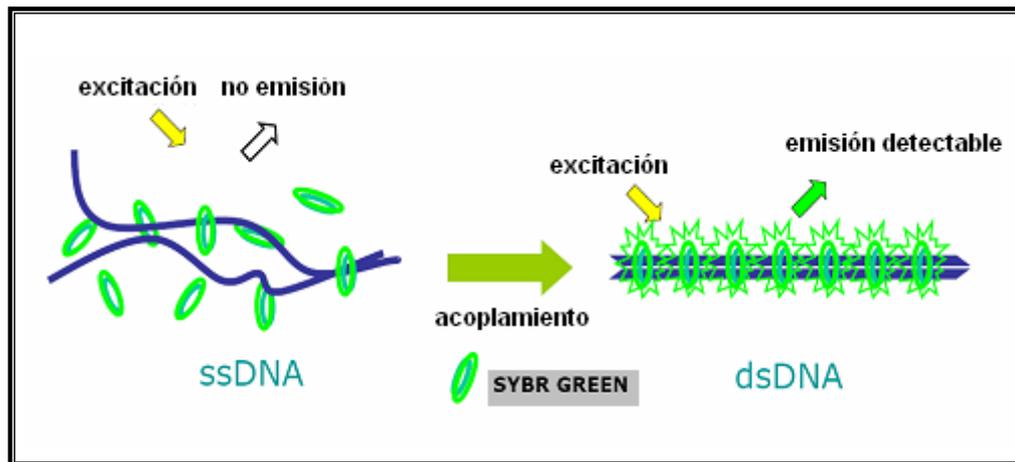


Figura 12: Detección de amplificación por SYBR Green

- **Análisis con sondas de hibridación específicas.** Básicamente, son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis (denominadas también sondas Taqman), las sondas *molecular beacons* y las sondas basadas en la transferencia de energía resonante fluorescente (FRET). Se basan en el principio de que el fluoróforo donador, excitado por una fuente de luz externa, emite una luz con longitud de onda que se solapa con la de excitación del segundo fluoróforo próximo a él, denominado aceptor.

El sistema de sondas FRET se compone de dos sondas que están marcadas en uno de sus extremos y que se unen a secuencias adyacentes del DNA diana. Una de las sondas lleva un fluorocromo donador en el extremo 3' y la otra uno aceptor en el extremo 5'. Las secuencias de ambas sondas se diseñan para que estén muy próximas al hibridar con la región complementaria del amplicón. Durante la desnaturalización, ni sondas, ni cebadores están unidos a la cadena complementaria, no hay transmisión de energía, ni emisión de fluorescencia. En el siguiente paso, antes de llegar a la temperatura de hibridación de los cebadores, la pareja de sondas (Mackay *et al.*, 2002) se une a su secuencia complementaria, de manera que los fluorocromos de ambas sondas quedan enfrentados a menos de 5 bases de distancia, produciéndose la transmisión de energía. Tras las sondas, los cebadores hibridan con su cadena complementaria, y a medida que avanza la extensión por la polimerasa se van desplazando las sondas. La medida de fluorescencia que tiene lugar en cada fase de hibridación permite ver, en tiempo real, que es lo que ocurre con la amplificación.

Cuánto más avanzado sea el ciclo más fluorescencia se detecta porque, obviamente, hay más moléculas de DNA a las que se puede unir la pareja de sondas y emitir fluorescencia. Así, la señal FRET será directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR específico. Si el DNA no es específico, no se producirá hibridación de las sondas y por tanto no habrá reacción.

El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el SYBR Green y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil. (Lay y Wittwer, 1997; Wittwer *et al.*, 1997; Bernard *et al.*, 1998, 1999; Mangasser-Stephan *et al.*, 1999; Bernard y Wittwer, 2000; Bernard *et al.*, 2001; Wittwer, 2001; Mackay *et al.*, 2002; Costa, 2004) (Figura 13).

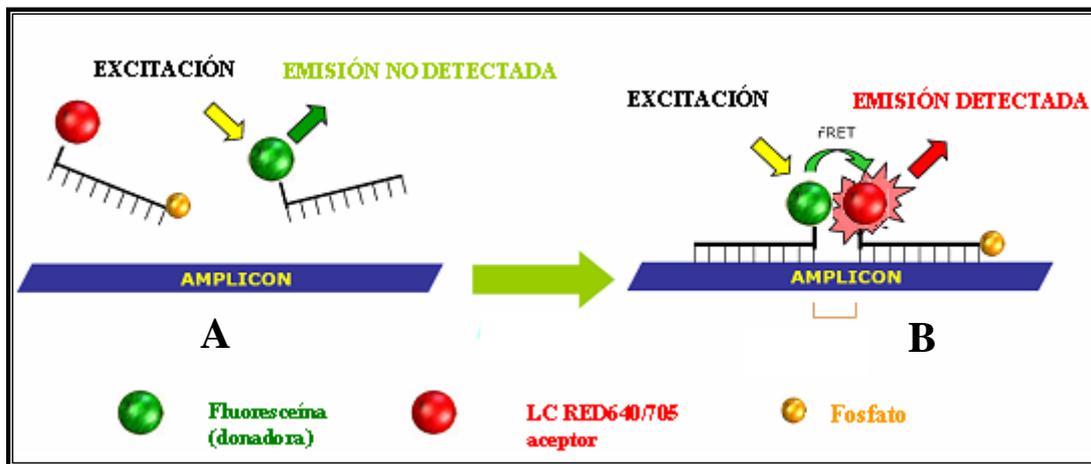


Figura 13: Transmisión de fluorescencia de las sondas FRET. A. Las sondas se encuentran separadas, no se transmite la energía de resonancia y no hay emisión de fluorescencia por el fluorocromo aceptor; B. Durante la hibridación, la distancia entre fluorocromos de las sondas es menor de 5 nucleótidos, se produce la transferencia de energía, el fluorocromo aceptor emite fluorescencia que la detecta el canal correspondiente del LightCycler.

1.3.1.2.1. Diseño de sondas FRET

La metodología con sondas FRET implica el uso de dos oligonucleótidos, de más o menos 20 nucleótidos, marcados con fluorocromos diferentes en uno de sus extremos y diseñados especialmente para ser complementarios a secuencias adyacentes del DNA diana delimitado por los cebadores no marcados. Comúnmente, el extremo 3' de la sonda donadora se marca con fluoresceína y el extremo 5' de la sonda aceptor con LC Red 640 o LC Red 705. Las dos sondas están diseñadas para hibridar en sus dianas

específicas en un arreglo cabeza-cola que permite que ambos fluoróforos estén en estrecha proximidad. La transferencia de energía es mejor cuando la distancia no excede los 5 nucleótidos (distancia molecular de 4 a 25 Å). Es posible detectar fluorescencia incluso estando los fluorocromos separados entre 15 y 25 bases, pero hay reducciones de hasta un 50 % en la fluorescencia cuando la separación es de entre 5 y 10 bases (Figura 14).

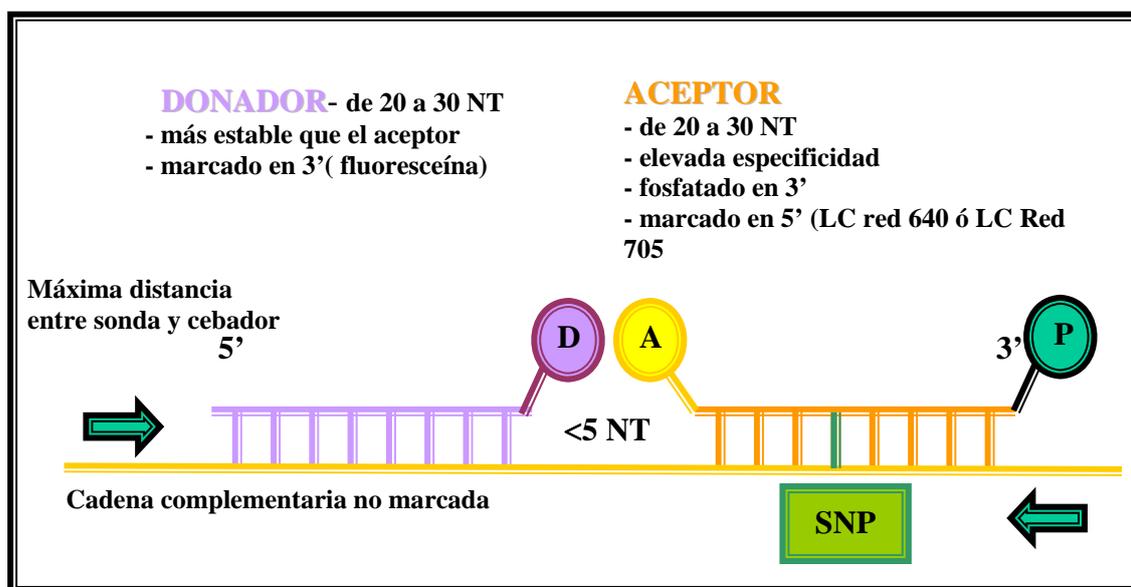


Figura 14: Diseño de las sondas FRET.

La sonda donadora es importante que esté lo más alejada posible del cebador directo para evitar ser desplazada por la polimerasa antes de que se tome la medida de fluorescencia durante la fase de hibridación (Lay y Wittwer, 1997; Wittwer *et al.*, 1997b, 2001; Bernard *et al.*, 1998, 1999, 2001; Mangasser-Stephan *et al.*, 1999; Bernard y Wittwer, 2000; Wittwer, 2001; Mackay *et al.*, 2002). La sonda aceptora debe estar fosforilada en el extremo 3' para evitar la acción de la polimerasa. Su T_m debe ser más baja que de la sonda donadora, pero ambas deben tener una T_m unos 10°C por encima de la de los cebadores (Mackay *et al.*, 2002).

Como cada sonda FRET está marcada con un único fluorocromo, tanto su síntesis, caracterización, y control de calidad, es más fácil que las de sondas doblemente marcadas.

1.3.1.2.2. Detección de mutaciones con sondas FRET

Ya se ha comentado que el uso de sondas es adecuado para realizar la cuantificación del amplicón sea DNA o RNA. Sin embargo, la PCR a tiempo real abre grandes posibilidades a la detección de mutaciones mediante monitorización de los cambios en el comportamiento de disociación de las sondas de hibridación. Para esta aplicación, una de las sondas, preferentemente la sonda aceptora, debe cubrir la zona en la que se encuentra la mutación objeto del estudio. La sonda se diseña, normalmente, para ser complementaria al alelo más frecuente, de forma que se generaría el falso apareamiento en los alelos que presenten el cambio de base (Figura 15).

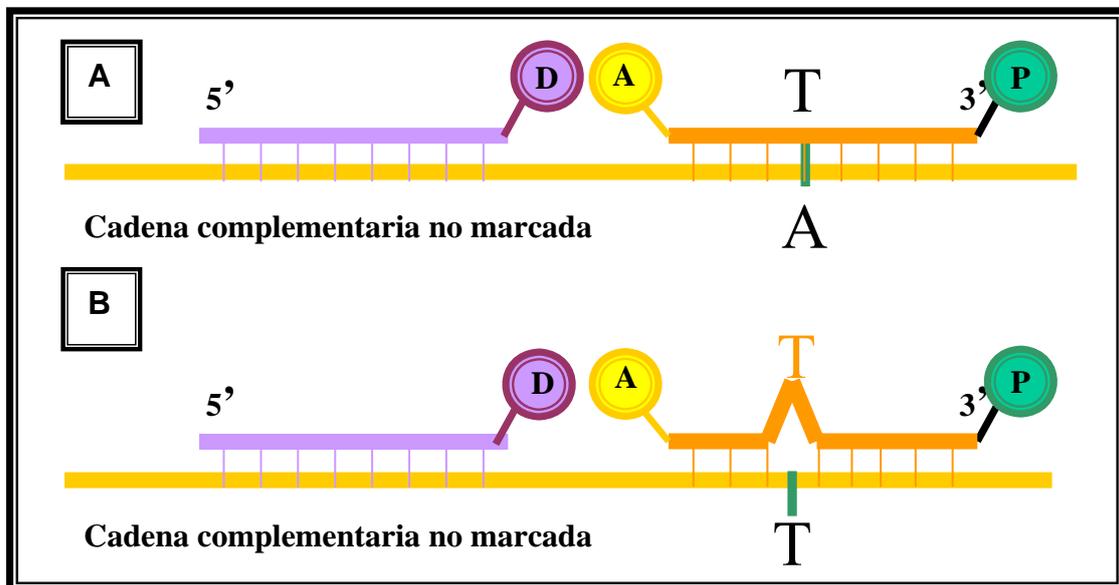


Figura 15: Las dos posibles situaciones que se pueden generar al hibridar la pareja de sondas con la cadena complementaria. A. Alelo más frecuente, la pareja sonda/DNA es totalmente complementaria; B. Alelo con el cambio de base, se genera un falso apareamiento en la pareja sonda/DNA.

Durante la fase de hibridación de cada ciclo se generan dos situaciones diferentes, una hibridación perfecta si no existe mutación en el DNA diana, y una zona de desapareamiento si el cambio de base está presente. Esas diferencias en la complementariedad sonda/DNA producen diferentes curvas de disociación, lo que permite diferenciar el genotipo de la muestra.

1.3.1.2.3. Análisis de las curvas de disociación

Las curvas de disociación se obtienen a partir de la medición continua de la fluorescencia en una fase consecutiva a la amplificación y en la que se aplica un gradiente de temperaturas creciente que permite monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Al inicio de esta fase la temperatura es muy baja y tanto sondas como cebadores están unidos a su cadena complementaria, la fluorescencia emitida será máxima; sin embargo al aumentar la temperatura progresiva y paulatinamente, de 0,1-0,2°C/s durante 10 minutos hasta una temperatura de 80°C, se alcanza la T_m de las estructuras híbridas sonda/DNA. En este punto se inestabilizan estas estructuras con el consiguiente descenso de la emisión de fluorescencia del aceptor (Bernard *et al.*, 1998, 2001; Mangasser-Stephan *et al.*, 1999). La T_m del par sonda/DNA es característico de cada pareja y depende de distintos factores como la longitud, el contenido en GC, el orden de la secuencia y los apareamientos Watson-Crick (Bernard *et al.*, 1998; Bernard y Wittwer, 2000).

El análisis de las curvas permite determinar la especificidad de los amplicones, por su T_m . La mayor estabilidad del par sonda/DNA totalmente complementario se traduce en una temperatura de fusión (T_m) más alta que la del par con falso apareamiento (Lay y Wittwer, 1997a; Wittwer *et al.*, 1997, 2001; Bernard *et al.*, 1998, 1999; Mangasser-Stephan *et al.*, 1999; Bernard y Wittwer, 2000; Mackay *et al.*, 2002) (Figura 15 y 16). Esta diferencia en las T_m permite discriminar los genotipos.

Para hacer más notable la disminución de la T_m del par con el falso apareamiento, el diseño de las sondas puede optimizarse, ya sea por la naturaleza y posición de las bases adyacentes al falso apareamiento, como por el acortamiento de la sonda (Lay y Wittwer, 1997; Bernard *et al.*, 1998; Bernard y Wittwer, 2000; Wittwer *et al.*, 2001).

El sistema LightCycler transforma las medidas de fluorescencia (F) en las derivadas negativas ($-dF/dT$) de la curva de fusión y así transforma los puntos de inflexión en picos. Esos picos permiten determinar el genotipo del individuo, uno solo indica homocigosis y, en dependencia de la temperatura de fusión, será homocigoto salvaje (mayor T_m), u homocigoto para el cambio de base (menor T_m). Los heterocigotos se distinguen por presentar ambos picos (Figura 16).

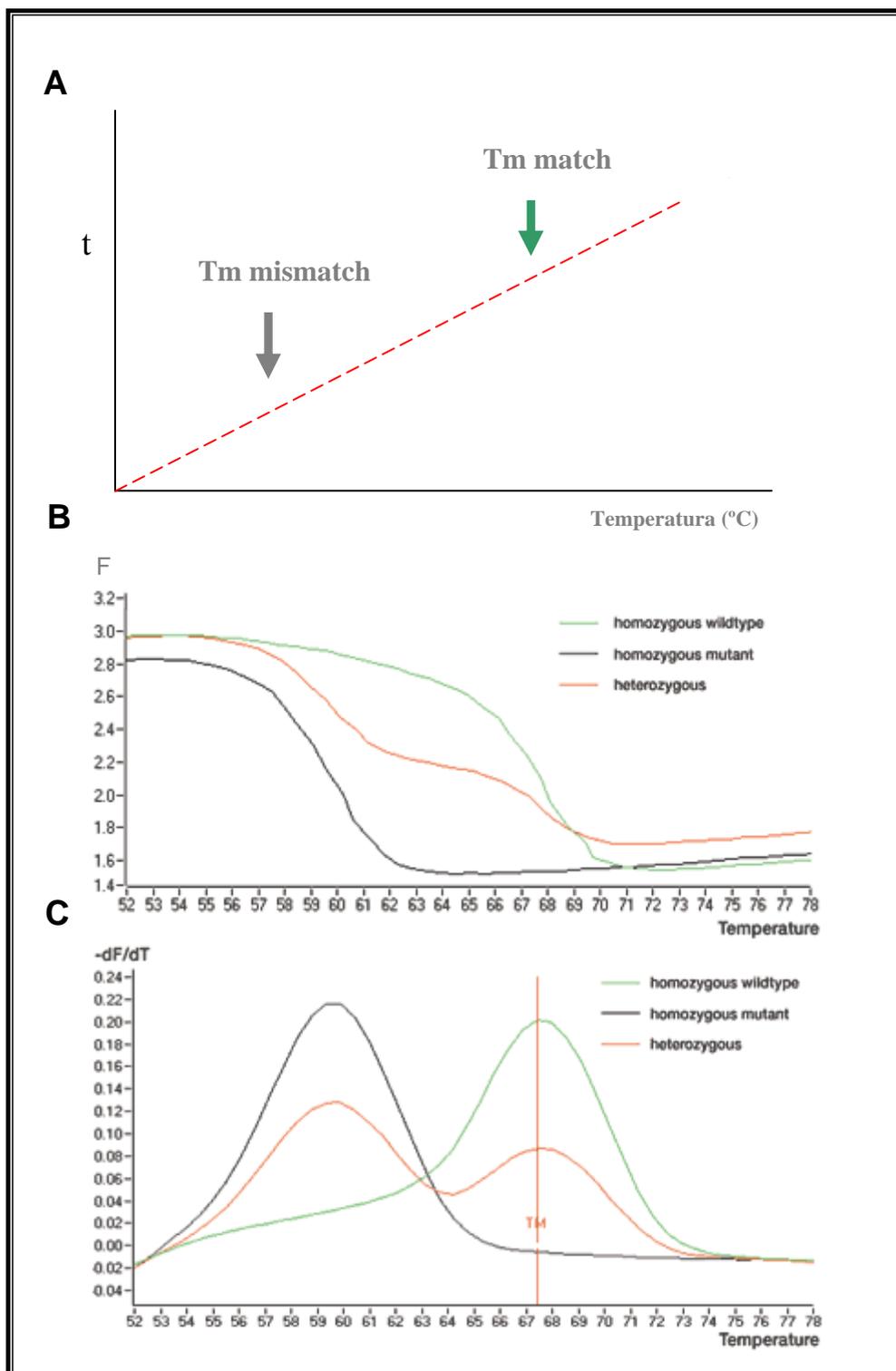


Figura 16: Obtención de una curva de disociación. A. Calentamiento progresivo a lo largo de la fase de disociación. La menor T_m es la del par sonda/DNA que contiene el falso apareamiento, la más alta es la del par completamente complementario; B. Las T_m de los pares sonda/DNA se observan como un punto de inflexión en la gráfica que relaciona la fluorescencia con la temperatura; C. Derivadas negativas ($-\text{dF}/\text{dT}$) de la curva de fusión, se observa un pico con T_m mayor si la muestra corresponde a un homocigoto salvaje, u otro con T_m menor si es homocigoto para la sustitución. Ambos picos se observan en un caso heterocigoto.

1.3.1.3. PCR alelo específica

Una estrategia conceptualmente sencilla de genotipado es la denominada PCR alelo específica (*Allele-specific PCR*, AS PCR). Esta estrategia es adecuada para el análisis de mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones en el DNA genómico, y es especialmente útil para casos donde se dispone de pequeñas muestras de sangre, tejidos u otras fuentes orgánicas.

Tiene la ventaja de combinar amplificación y detección, sin necesidad de recurrir a sondas o enzimas adicionales. La técnica requiere el uso de 3 cebadores para dos reacciones de PCR separadas y complementarias, uno es común (el reverso), y dos son específicos para cada una de las variantes alélicas.

Los dos cebadores específicos difieren uno del otro en sus extremos 3', los cuales llevan la base propia de cada variante. De esta manera, los cebadores coinciden perfectamente sólo con un único alelo, y tienen un despareamiento en el extremo 3' con el alelo alternativo (Figura 17).

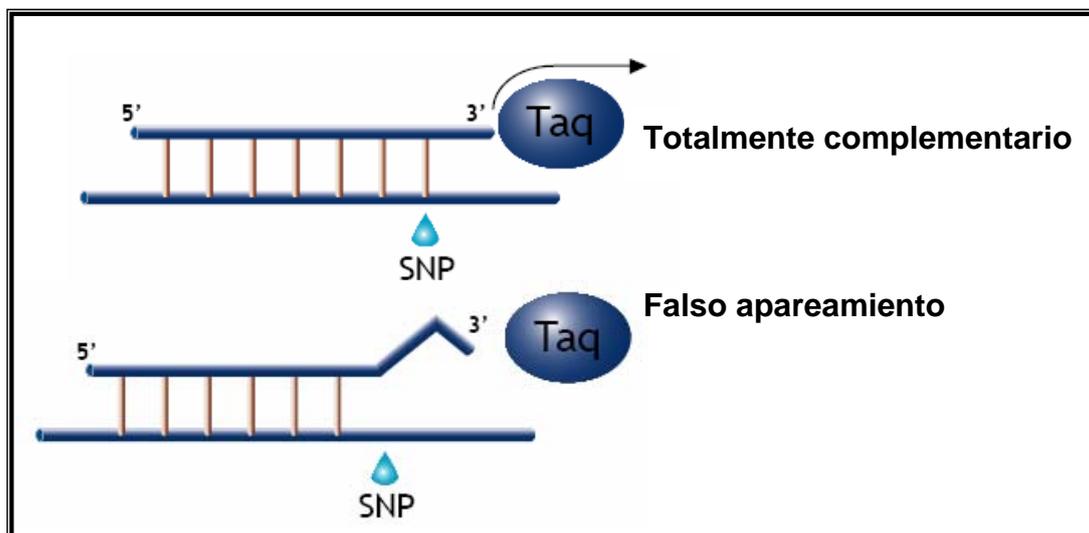


Figura 17: Cebadores para AS PCR, con bases perfectamente complementarias y falsamente apareadas.

En condiciones de PCR estrictamente controladas, los cebadores perfectamente coincidentes amplifican la secuencia diana, mientras que los no coincidentes no lo hacen. Después del proceso de PCR, los fragmentos amplificados se separan por electroforesis en gel de agarosa y se visualizan por tinción con bromuro de etidio y

exposición a la luz ultravioleta. La interpretación de los resultados de la AS-PCR se basa en la presencia o ausencia de un fragmento específico de DNA amplificado.

Sin embargo, en ciertos contextos, la Taq Polimerasa extiende a pesar del falso apareamiento, con lo cual el alelo no perfectamente complementario amplifica. Son pues los falsos positivos el grave inconveniente de esta atractiva metodología. Sólo un buen diseño puede evitarlos, pero la optimización de las condiciones experimentales consume tiempo, recursos y se necesitan ciertas habilidades.

Para evitar las amplificaciones inespecíficas en una PCR alelo específica se han seguido varias estrategias: incorporación de falsos apareamientos adicionales cerca del extremo 3' en el cebador específico (Newton *et al.*, 1989); desarrollo de la PCR con sus componentes a niveles límite (Bottema y Sommer, 1993); uso de Taq polimerasa con pérdida de la actividad exonucleasa 5'-3' (Lawyer *et al.*, 1993); uso de nucleótidos análogos que faciliten el desapareamiento en el extremo 3' (Day *et al.*, 1999); uso de una apirasa que degrada dNTP cuando la cinética de la reacción se hace lenta (es el caso en de cuando hay desapareamiento en 3') (Ahmadian *et al.*, 2001; Waterfall y Cobb, 2002).

Cada una de las estrategias de optimización de la AS PCR tiene sus limitaciones. La incorporación de falsos apareamientos adicionales exige un diseño cuidadoso para no crear problemas de inestabilidad. La búsqueda de las concentraciones óptimas de los componentes es un proceso laborioso y largo, que conlleva complicados diseños de PCR multiplex. El uso de la Taq con pérdida de actividad exonucleasa requiere de altas concentraciones de enzima y no es compatible con las sondas TaqMan usadas en AS-PCR en tiempo real (Matsubara *et al.*, 1999). Las otras variantes necesitan o costosos reactivos o instrumental específico para la detección.

Una de las más novedosas y recientes formas de ganar en especificidad en la AS PCR es la introducción del análogo de ácido nucleico de alta afinidad conocido como *Locked Nucleic Acid*TM (LNATM) en la posición 3' o 3'-1. En ambos casos, el LNA debe coincidir con la posición del polimorfismo (Braasch y Corey, 2001; Petersen y Wengel, 2003). La compañía Proligo ha introducido los cebadores TrueSNP que se caracterizan por tener este análogo de base.

1.3.1.3.1. Cebadores LNA. Aplicación en PCR alelo específica a tiempo real

Wengel y colaboradores describieron por primera vez, en 1998, el LNA como una nueva clase de análogos de oligonucleótidos de conformación restringida (Vester *et al.*, 2004). Su característica estructural más notable es la incorporación de un puente metileno C4'-O2'-en el anillo del nucleósido (Figura 18).

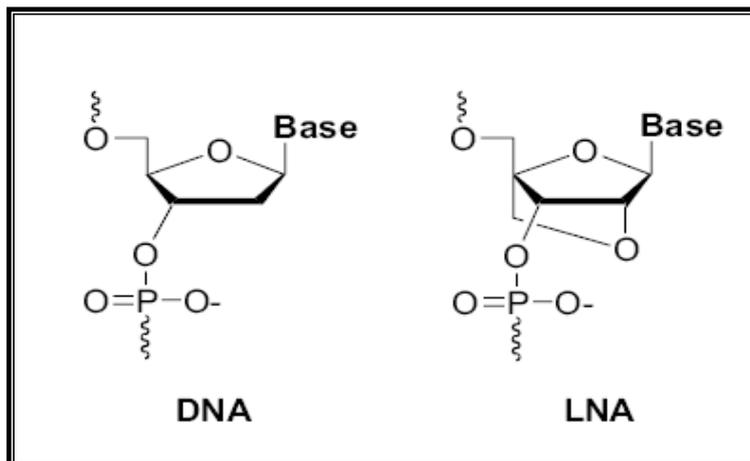


Figura 18: Estructura molecular de LNA. El puente metileno C4'-O2'-en el anillo cierra el grupo ribosa en una conformación C3'-endo.

Este puente limita la flexibilidad del anillo ribofuranósico y cierra la estructura en una formación rígida bicíclica (forma 3'-endo), lo cual facilita su hibridación (mayor afinidad hacia la cadena complementaria) y le confiere una mayor bioestabilidad

La estructura híbrida del LNA y su complementario (tanto DNA o RNA) exhibe una estabilidad térmica sin precedentes (mayor T_m) lo cual permite utilizar una mayor T de hibridación en la PCR con una consiguiente mejor discriminación de alelos (Singh *et al.*, 1998). El LNA reduce dramáticamente la probabilidad de que el cebador desapareado en 3' se una a la secuencia complementaria y se inicie la extensión por la polimerasa, incrementándose la especificidad, en relación con los cebadores de DNA convencional. La probabilidad de amplificaciones ilegítimas (falsos positivos) con estos cebadores se reduce notablemente.

Se han aplicado varios métodos a la detección de SNPs usando LNA para discriminación alélica. Por ejemplo, se ha usado el ensayo ELISA para capturar sondas de LNA que hibridizan con amplicones de PCR dentro de placas multipocillos (Orum *et al.*, 1999; Jacobsen *et al.*, 2002; 2002b, Letertre *et al.*, 2003). También se han hecho

genotipados por medio de la combinación de estos análogos con polarización fluorescente (Simeonov y Nikiforov, 2002). Más recientemente, con el desarrollo de la tecnología de microchips, se han integrado al ensayo de microarrays (Moller y Mouritzen, 2002; Mouritzen *et al.*, 2003)

La realización de la AS PCR en tiempo real usando estos análogos también ha sido investigada con buenos resultados (Latorra *et al.*, 2003; Ugozzoli *et al.*, 2004). Estos autores sustituyeron en el cebador la base de DNA del extremo 3' o 3'-1 (correspondiente al polimorfismo) por LNA. Además utilizaron SYBR Green para la detección fluorescente de la disociación del amplicón. La validez y efectividad de este método en la discriminación ha sido verificada por electroforesis (www.proligo.com).

En las curvas de amplificación (número de ciclos versus fluorescencia) de una AS PCR en tiempo real se aprecia la diferencia de *crossing point* (Ct) entre el alelo que se aparea perfectamente respecto de aquel que tiene el falso apareamiento. Estas diferencias, expresadas como ΔCt , son más notables cuando se usan cebadores con LNA y es lo que minimiza el riesgo de falsos positivos (Figura19).

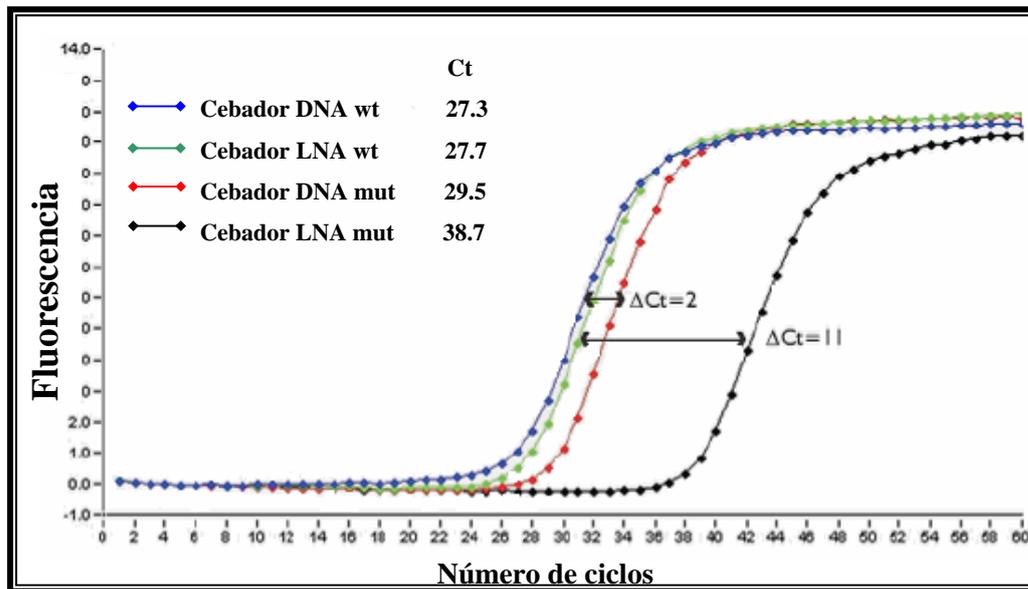


Figura 19: Reacciones de AS PCR por separado que contienen cebadores con DNA o LNA.. La Ct del alelo sin cambio (total apareamiento) es más baja que la del alelo con el cambio. El ΔCt es mayor cuando se utilizan cebadores LNA.

Por observación de las curvas de amplificación con estos cebadores podemos inferir el genotipo de la muestra. El ΔCt es más apreciable en caso de homocigosis ya

que el Ct es más bajo en la reacción con el alelo perfectamente apareado (sea salvaje o mutante), en relación con la del alelo con falso apareamiento (Figura 19). Para muestras heterocigotas, el Ct para ambas reacciones (ambos alelos) es muy similar y en consecuencia el ΔCt es mínimo (Figura 20).

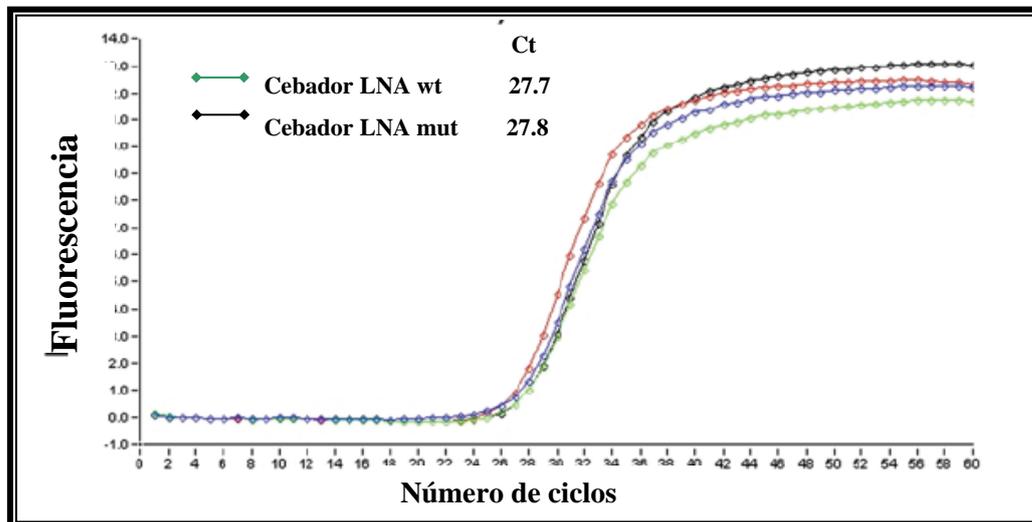


Figura 20: Reacciones de AS PCR por separado que contienen cebadores con DNA o LNA. La Ct de ambos alelos es muy similar. El ΔCt es mínimo.

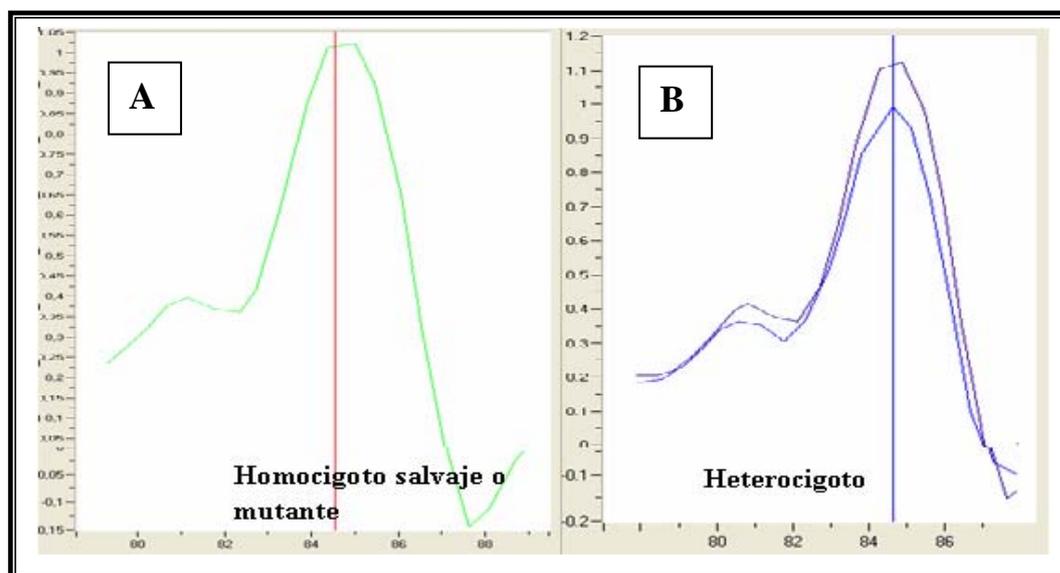


Figura 21: Reacciones de AS PCR con cebadores LNA. A: Amplificación sólo en la reacción donde hay total complementariedad, ya sea alelo salvaje o mutante (homocigoto para uno u otro alelo), B: Amplificación en ambas reacciones (muestra heterocigota).

Por su parte, en las curvas de disociación obtenidas para ambas reacciones se aprecia amplificación sólo en aquella reacción donde hay perfecta complementariedad.

Sin embargo, en caso de una muestra heterocigota, hay amplificación en ambas reacciones y se observan sendos picos (Figura 21).

1.3.2. Análisis estadístico de SNP en estudios epidemiológicos

El análisis estadístico de los SNPs permite identificar qué genes confieren mayor susceptibilidad a desarrollar una determinada enfermedad. Para estos análisis es importante obtener evidencias de que, en la patogenia de la enfermedad hay un componente genético. Para ello son útiles los estudios de agregación familiar, los de gemelos o los de emigrantes. En segundo lugar, hay que identificar dónde están los genes de interés para la enfermedad. En esta fase se realizan estudios denominados de ligamiento que emplean como marcadores genéticos una serie de polimorfismos repartidos por todo el genoma. En estos estudios se suelen emplear familias grandes con varios miembros afectados, y su análisis permite identificar zonas del genoma de interés, pero tienen poca resolución.

Para identificar con mayor precisión los genes de interés y, dentro de esos genes, el o los polimorfismos responsables, se emplean estudios de asociación (Dunning *et al.*, 1999; Houlston y Tomlinson, 2000, Iniesta *et al.*, 2005).

En cuanto a la metodología de estudio, se suelen emplear diseños epidemiológicos clásicos basados en individuos no relacionados, como estudios de casos y controles o de cohortes. También se pueden emplear diseños basados en familias, en los que los individuos de control son parientes de los casos, como los diseños de casos y hermanos sanos o tríos (caso y padres) (Iniesta *et al.*, 2005).

Independientemente de la estrategia elegida, estos estudios conllevan la realización previa de una estadística descriptiva del SNP (estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas) y la evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg.

1.3.2.1. Estudios de asociación alélica

El principal objetivo de los estudios de asociación alélica es comparar la frecuencia de diferentes factores de riesgo entre un grupo de individuos afectados por la enfermedad de interés y un grupo control. La evaluación de los factores de riesgo puede

incluir marcadores genéticos basados en secuencias de DNA (ya sean SNPs o microsatélites) y exposiciones ambientales (Wyszynski 1998; Iniesta *et al.*, 2005).

El análisis estadístico en un estudio de asociación es sencillo y puede resumirse en una tabla de 2x2 que permite contrastar la hipótesis mediante un test de χ^2 o, en su lugar, puede cuantificarse la magnitud de la asociación de cada genotipo por el cálculo de la *odds ratio* (OR). Si es necesario ajustar los análisis por posibles variables de confusión, entonces es preferible emplear modelos de regresión logística por su versatilidad. Además, estos modelos permiten evaluar fácilmente si hay interacciones entre el polimorfismo y otros factores.

La interpretación de una asociación positiva no es trivial. Las asociaciones pueden surgir por tres razones, una de las cuales es completamente artificial

- 1) El alelo en cuestión es realmente la causa del fenotipo.
- 2) El alelo no causa el fenotipo, pero está en desequilibrio de ligamiento con otro alelo que sí lo causa. El desequilibrio de ligamiento ocurre cuando el alelo causante del fenotipo está físicamente cercano (o ligado) al alelo en estudio.
- 3) Existe una mezcla poblacional. En una población mezclada, cualquier fenotipo común a un grupo étnico resultará en una asociación positiva con cualquier alelo que también sea más frecuente en dicho grupo étnico.

Los estudios de asociación tienen más potencia que los de ligamiento para detectar efectos pequeños, pero para ello requieren un mayor número de marcadores y de muestras (Cordell y Clayton, 2005).

1.3.2.2. Análisis simultáneo de múltiples *loci*

El desconocimiento de cual o cuales son los polimorfismos realmente responsables de influir o modificar el riesgo de la enfermedad ha motivado que se analicen simultáneamente varios polimorfismos en un gen o región candidata de un gen. Suele observarse cierto grado de correlación o asociación estadística (desequilibrio de ligamiento) entre diferentes polimorfismos localizados en el mismo cromosoma y relativamente próximos entre sí. Con lo cual, si hay asociación entre un polimorfismo y la enfermedad, es posible que otros polimorfismos cercanos también estén asociados con ella.

El riesgo incrementado asociado a un SNP puede deberse a otro cambio ligado al SNP en estudio, o ser el resultado de la combinación con otros alelos. A este conjunto de alelos que se transmiten conjuntamente se le denomina haplotipo. La estimación de las frecuencias para cada haplotipo sería sencilla si no se dieran casos en los que no es posible determinar la pareja de haplotipos que lleva el individuo, debido a que éste tiene 2 o más *loci* heterocigotos. Para estimar la frecuencia de los haplotipos en estos casos de incertidumbre, se hace una estimación estadística mediante el algoritmo esperanza-maximización o mediante métodos de Montecarlo basados en cadenas de Markov. Entonces, estos haplotipos pueden analizarse en relación con la enfermedad mediante modelos de regresión logística.

Es por ello más informativo el diseño de estudios que evalúen las potenciales interacciones entre SNPs, además de entre SNPs y exposición ambiental (MacAuley y Ladiges, 2005).

Objetivos



2. OBJETIVOS

El cáncer es de las patologías que más comúnmente afectan a la glándula tiroidea y que por su morbilidad y mortalidad destaca dentro de las enfermedades endocrinas. La base genético-ambiental de su etiología supone que el riesgo en determinados escenarios puede estar modulado por los polimorfismos genéticos de baja penetrancia. Sin embargo, son escasos los estudios de asociación entre incidencia de cáncer de tiroides y variaciones en diferentes tipos de genes.

De lo anterior se deduce el interés en determinar qué polimorfismos son candidatos a ser marcadores moleculares de susceptibilidad para el cáncer de tiroides.

Objetivo general

- Evaluar diferentes polimorfismos en genes de reparación, de la fisiología tiroidea y de control del ciclo celular, mediante estudios de asociación alélica y análisis de múltiples *loci*, en un diseño epidemiológico caso-control.

Objetivos específicos

- Genotipar casos y controles para polimorfismos de genes de reparación de los mecanismos BER y RH: ***XRCC1, OGG1, XRCC2 y XRCC3***.
- Genotipar casos y controles para polimorfismos de genes propios de la fisiología del tiroides: ***TG, TSHR***.
- Genotipar casos y controles para un polimorfismo del gen de control del ciclo celular: ***PTPRJ***.
- Evaluar el efecto de las interacciones entre genes sobre el riesgo de cáncer de tiroides.
- Evaluar la modulación de los factores ambientales (edad, género, alcohol y tabaco) sobre el riesgo de cáncer de tiroides asociado a los genotipos.

Materiales y Métodos



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Población estudiada

Para este estudio se reclutaron, en el período del 2000 al 2002, un total de 458 adultos de etnia caucásica residentes en España, concretamente en la provincia de Barcelona. La población se dividió en dos grupos: el primer grupo se formó con 251 individuos con cáncer de tiroides, diagnosticados y tratados, en el Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona). El diagnóstico se hizo en base a la anamnesia, examen físico y pruebas de imagenología (ecotomografía y cintigrafía) complementadas con punción biopsica del nódulo tiroideo. La clasificación del cáncer se realizó por análisis histopatológico siguiendo los criterios de la OMS. El grupo control incluyó a 207 voluntarios sanos, residentes en la misma provincia y lo más similares, en cuanto a hábitos, al grupo de pacientes. El criterio de exclusión que se aplicó a este grupo es que no padecieran o hubiesen padecido ninguna alteración del tiroides.

El protocolo para realizar los diferentes análisis incluidos en este trabajo cumple con los principios de Helsinki, por lo que fue aprobado por los Comités de Ética de las instituciones participantes (UAB y Hospital Vall d'Hebron). Todos los individuos que participaron en los estudios dieron su consentimiento previo por escrito.

3.2. Cuestionarios

A cada participante se le realizó una encuesta (anexo 1) con el fin de obtener información demográfica (edad, sexo, lugar de residencia etc), del historial médico (enfermedades, medicación, antecedentes familiares de cáncer), e información relacionada con la ocupación, actividades de ocio, dieta, hábitos de consumo, exposiciones peligrosas y sobre cualquier otro factor que pudiera crear confusión con los resultados del estudio.

3.3. Metodologías

El diseño experimental que se siguió en el estudio se esquematiza en la Figura 22.

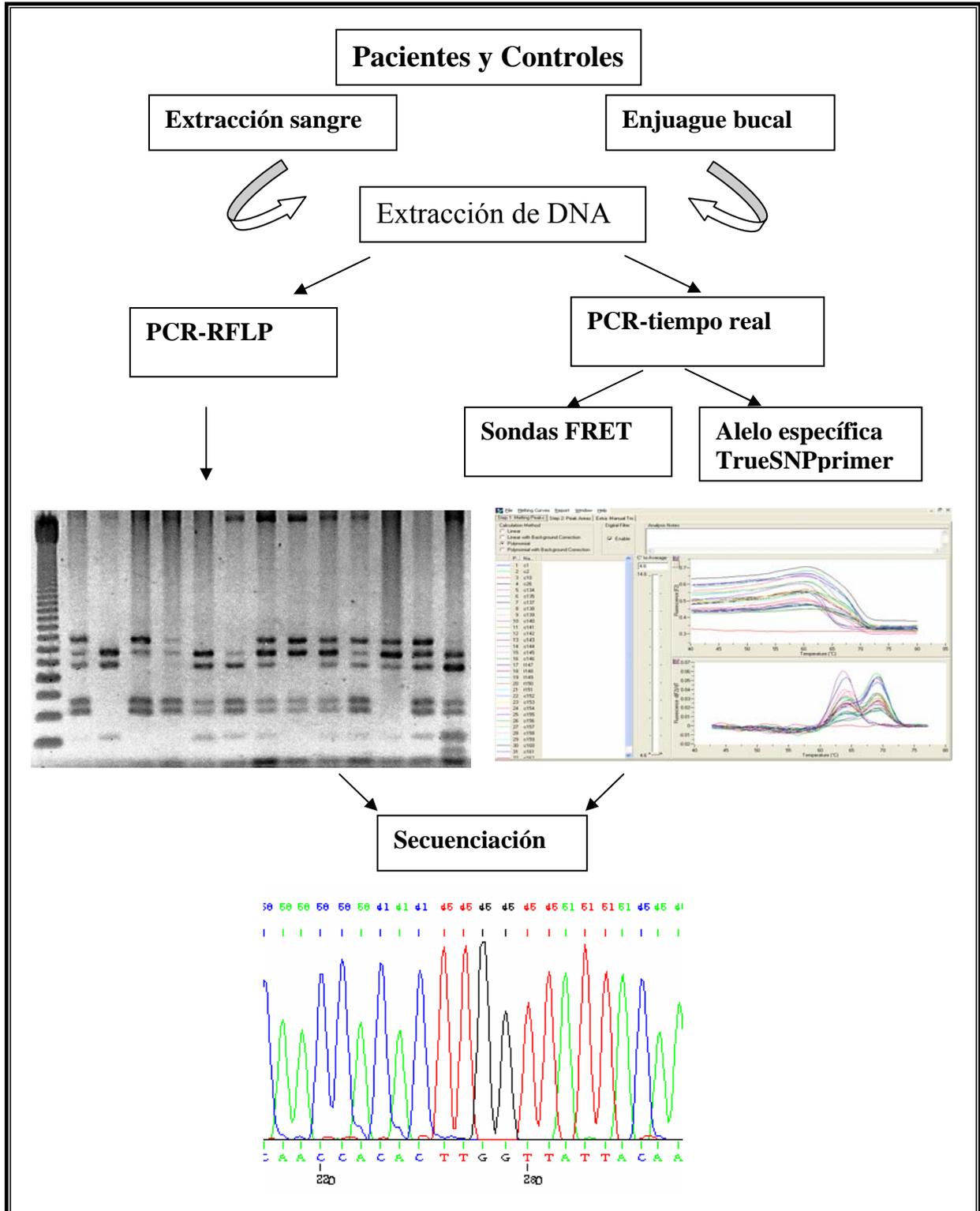


Figura 22: Métodos usados. Las PCR convencionales se realizaron en un termociclador Programmable Thermal Controller PTC-100TM (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) y las de tiempo real en un termociclador LightCyclerTM (Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Alemania).

3.3.1. Extracción de DNA

El DNA genómico usado en el estudio se obtuvo, fundamentalmente, a partir de linfocitos aislados de sangre venosa periférica, aunque en algunos casos se usaron células de mucosa bucal.

Para estudios epidemiológicos la mejor forma de obtener DNA genómico es a partir de linfocitos de sangre periférica; este espécimen ofrece la ventaja de rendir suficiente cantidad de DNA de alto peso molecular, además de proporcionar otros componentes (suero, plasma y eritrocitos) útiles para evaluar la relación entre exposición ambiental y genotipo/fenotipo. Sin embargo, cuando hay reticencia a la punción sanguínea, o cuando las personas objeto de estudio están dispersas geográficamente, es preciso recurrir a otras fuentes; con lo cual ganan en aceptación métodos menos invasivos, que tienen la ventaja añadida de ser menos costosos y complejos. Hasta hoy la búsqueda se ha enfocado hacia la obtención de células exfoliadas, siendo las células bucales la alternativa más utilizada. La obtención de estas células es muy conveniente para estudios a gran escala porque su obtención es sencilla y su estabilidad apreciable (de días a temperatura ambiente y de un año a -80°C) (Holland *et al.*, 2003).

El raspado de la mucosa con un cepillo o similar, y el enjuague bucal, son las formas de recolectar las células bucales, siendo el último el método que tiene mejor rendimiento en relación a la concentración de DNA obtenido (García-Closas *et al.*, 2001; King *et al.*, 2002).

3.3.1.1 A partir de sangre

Se extrajeron por punción venosa 9 mL de sangre usando Vacutainers con EDTA (BD Vacutainer Systems, UK). La sangre se procesó por el método de extracción de DNA con cloroformo-etanol (Figura 23). La muestra se guardó a 4°C cuando la extracción del DNA no fue inmediata. El método se divide en tres fases:

1) Aislamiento de linfocitos

- La sangre se distribuye en volúmenes iguales (4,5 mL) en 2 tubos de 10 mL.
- Se lavan con 6 mL de solución salina fisiológica.
- Se centrifuga a 4°C durante 7 min a 2.500 rpm y se desecha el sobrenadante.
- Para eliminar los eritrocitos, se añade a la capa celular 6mL de solución de lisis de eritrocitos recién preparada y se agita suavemente el tubo hasta disolver totalmente la mezcla.
- Se centrifuga el tubo a 4°C durante 15 min a 3.000 rpm.
- Se decanta el sobrenadante y se repite el centrifugado con lisis de eritrocitos, desechando nuevamente el sobrenadante.
- Los linfocitos sedimentados se pueden guardar a -20 o -80° C (si la extracción no es inmediata).

2) Digestión proteica

- A los linfocitos aislados se les añade 3 mL de solución de lisis de leucocitos, 0,2 mL de SDS al 10% y 0,5 mL de solución de proteinasa K a 2mg/mL. El tubo se mezcla muy bien con el vórtex y se incuba a 37°C durante una noche.

3) Precipitación del DNA (método manual de las sales)

- Al tubo con la mezcla digerida se le añade 1 mL de NaCl (5,5 mol/L) que compete con los S en la formación de puentes disulfuros. Se agita con el vórtex.
- Se centrifuga a 4°C durante 15 min a 3.500 rpm.
- Se traspasa cuidadosamente la fase superior a un tubo y se vuelve a centrifugar a 4°C 15 min a 3.500 rpm (este paso se repite las veces necesarias en caso de que sigan apareciendo proteínas y sal en el sedimento).
- Se le añade igual volumen de cloroformo y se agita manualmente. Se centrifuga a 4°C durante 15 min a 3.500 rpm.
- Se traspasa cuidadosamente la fase superior (no acuosa) a otro tubo y se añaden 2 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA.
- Se agita suavemente hasta observar la aparición de fibras de DNA. Estas se recogen y se lavan con etanol al 70%; el exceso de etanol se elimina.
- El DNA se coloca en tubo de 1,5 mL, se le añade 0,1 mL de tampón Tris 0,01 mol/L, EDTA 0,001mol/L, pH 7,2 (TE) y se deja disolver mediante agitación a 37°C. Si la solución queda muy viscosa se puede añadir más TE.

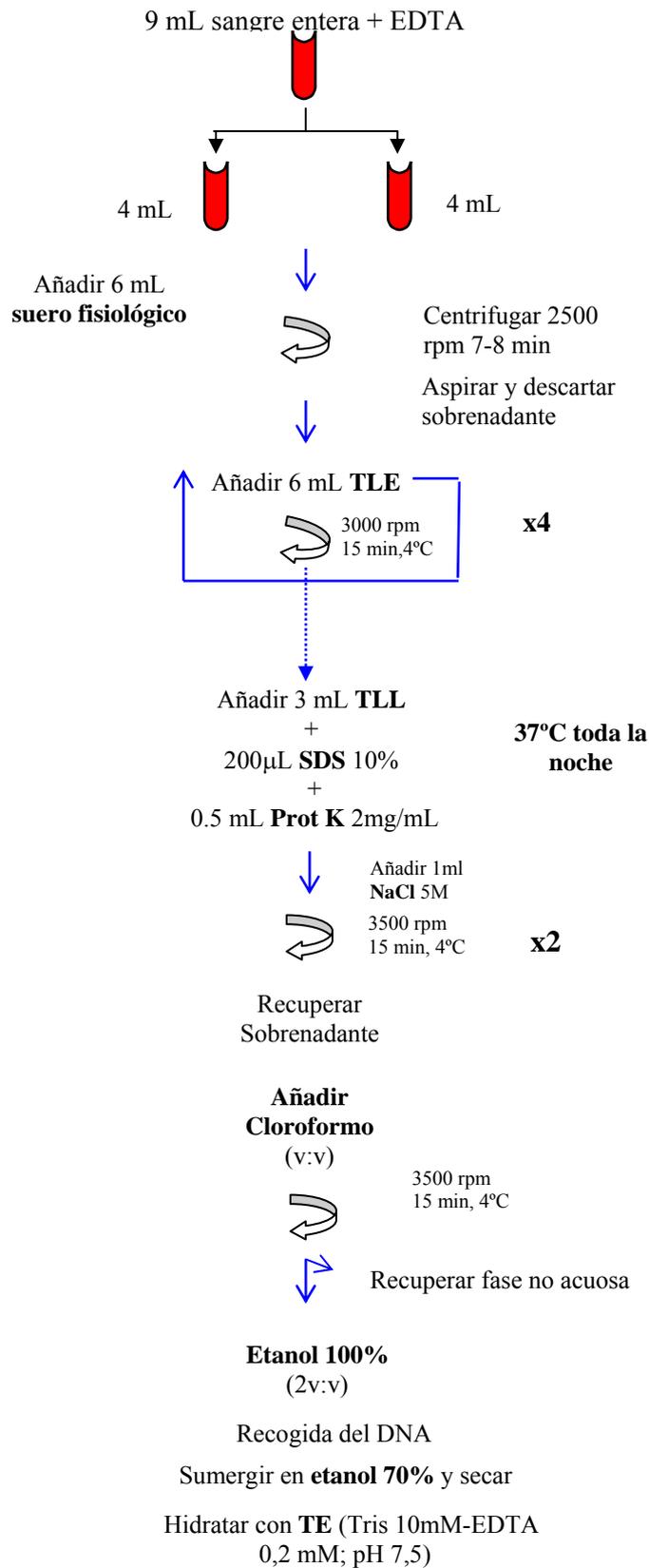


Figura 23: Extracción de DNA a partir de sangre entera. (Anexo 2: Composición de las soluciones y casas comerciales).

3.3.1.2 A partir de células de la mucosa bucal

Las muestras obtenidas a partir de mucosa bucal proporcionan concentraciones de DNA menores que las obtenidas a partir de linfocitos ($\approx 30 \mu\text{L}/\text{mL}$ sangre versus $\approx 16 \mu\text{L}/\text{enjuague bucal}$). Se ha estimado que a partir de enjuagues bucales se obtiene $50 \mu\text{g}$ de DNA de buena calidad, lo cual es suficiente para ser usado en ensayos basados en PCR, puesto que estas reacciones necesitan de $50\text{--}100 \text{ ng}$ de DNA (García-Closas *et al.*, 2001; Le Marchand *et al.*, 2001; Andrisin *et al.*, 2002; King *et al.*, 2002; Brooks *et al.*, 2003).

Para optimizar la cantidad de DNA obtenida a partir de dicho enjuague, se recomienda que la recogida de la muestra se efectúe antes de lavarse los dientes y al menos una hora después de comer o beber (Feigelson *et al.*, 2001).

Procedimos según el protocolo que se describe a continuación, que es una adaptación del protocolo descrito por Gentra Systems (PuregeneTM DNA *purification from bucal cells in mouthwash*) (Figura 24):

- Enjuague bucal durante 1 min con 10 mL de Oraldine. Pasar el enjuague a un tubo de 50 mL.
- Centrifugar a 3.500 rpm por 10 min y descartar el sobrenadante.
- Agitar y añadir 3 mL de solución de lisis celular y resuspender en vórtex a velocidad media durante 5 seg.
- Adicionar 150 mL de proteinasa K (2 mg/mL) e incubar a 55°C por 1 h.
- Adicionar 25 mL de solución de RNasa A (0,5 mg/mL) y mezclar por inversión del tubo varias veces (≈ 25), incubar a 37°C durante 15 min.
- Añadir 1,5 mL de solución de precipitación de proteínas (perclorato sódico 4M y SDS 4%), y agitar. El perclorato tiene una fuerza iónica que compite con los S en la formación de puentes disulfuros, y el SDS arrastra las proteínas desnaturalizadas.
- Centrifugar a 3.500 rpm durante 10 min. Recuperar el sobrenadante (descartar el precipitado de proteínas).
- Añadir igual volumen de fenol y agitar suavemente
- Aplicar un pulso de centrifuga y recuperar la fase acuosa. Añadir cloroformo isoamilalcohol (24:1) v:v, agitar y centrifugar. El isoamilalcohol incrementa la hidrofobicidad y facilita la separación de la fase acuosa.

- Recuperar fase acuosa y añadir 3 mL de isopropanol 100% que contiene 5 mL de solución de Glicógeno (20 mg/mL).
- Mezclar por inversión del tubo varias veces, mantener el tubo a temperatura ambiente al menos 5 min.
- Centrifugar a 3.500 rpm durante 10 min, decantar el sobrenadante y secar el tubo con papel absorbente. Añadir 3 mL de etanol al 70% e invertir el tubo varias veces.
- Centrifugar a 3.500 rpm por 3 min y decantar el etanol, invertir el tubo y secar sobre papel absorbente.
- Añadir 20 μ L de solución de hidratación de DNA (Tris 10mM-EDTA 0,2 mM; pH 7,5) y dejar rehidratar toda la noche a 37°C.
- Guardar a 4°C.

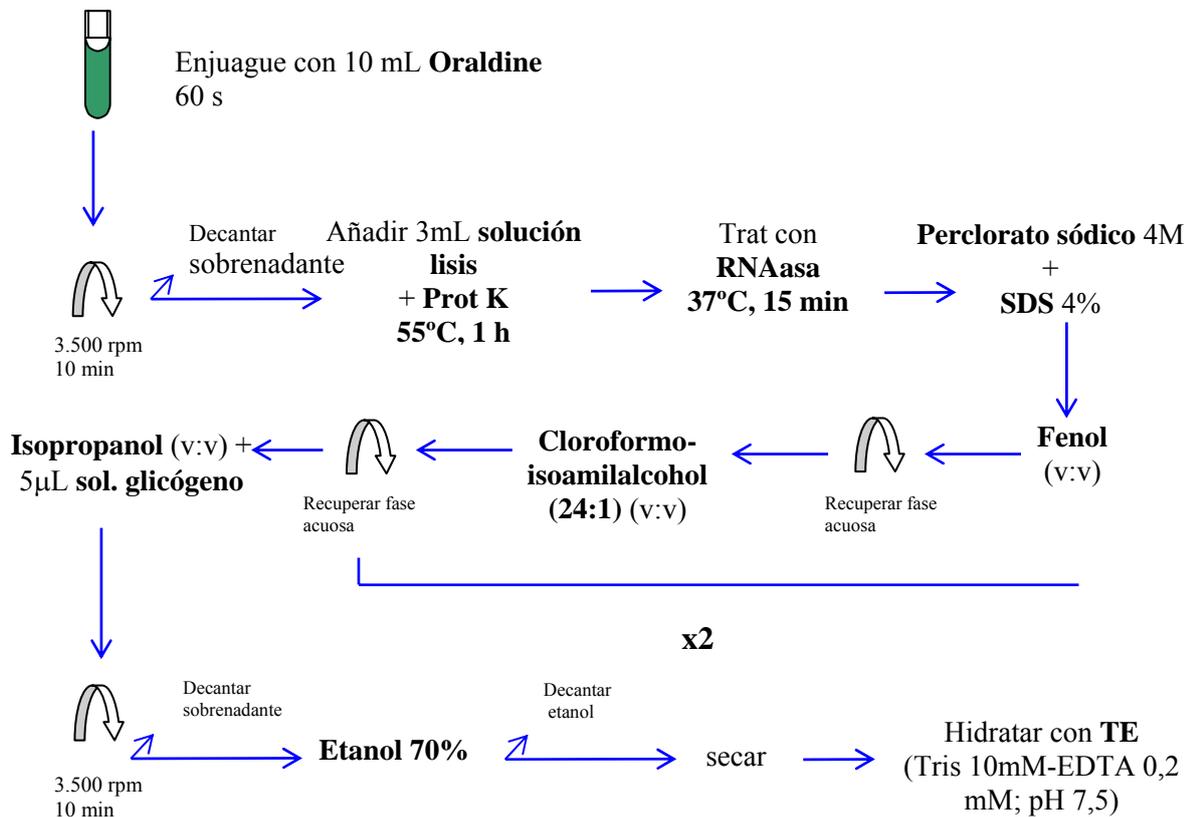


Figura 24: Protocolo de extracción de DNA a partir de células bucales. (Anexo 2: Composición de las soluciones y casas comerciales)

La muestra de DNA de cada donante se etiquetó con su código, se le ajustó la concentración a 1 μ g/ μ L y se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

3.3.2 Análisis de los genotipos

3.3.2.1 Análisis de los genotipos de *XRCC1*

Evaluamos los polimorfismos no conservativos *Arg194Trp* (rs1799782), *Arg280His* (rs25489) y *Arg399Gln* (rs25487) localizados exón 6, 9 y 10, respectivamente, de *XRCC1*.

Genotipado por PCR RFLP

Los polimorfismos *Arg194Trp* y *Arg280His* se estudiaron a la par mediante PCR dúplex con posterior análisis de RFLP.

En la Figura 25 se resumen las características del programa de PCR y las condiciones de reacción. La secuencia de los cebadores utilizados, así como el tamaño de los amplicones, las enzimas y sus fragmentos de digestión se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencia de los cebadores, enzimas y fragmentos de restricción de los SNPs de *XRCC1*.

Gen	SNP cambio	Cebadores	Producto PCR (pb)	Enzimas restriccc.	Fragmentos (pb)
<i>XRCC1</i>	<i>Arg194Trp</i> C → T Nt 26304	F 5'-ACCTATAATACTGACCTTGCG-3' R 5'-TCATAGTCACAGCCAGCG-3'	463	<i>Msp I</i>	CC = 120, 343 CT = 120, 343, 463 TT = 463
	<i>Arg280His</i> G → A Nt 27466	F5'-CCAGTGGTGCTAACCTAATC-3' R 5'-CCGAGCTGCGAGATAAG-3'	239	<i>Rsa I</i>	GG = 55, 184 GA = 55, 184, 239 AA = 239

Abreviaturas: PCR = reacción en cadena de la polimerasa; F = directo; R = reverso; pb pares de base

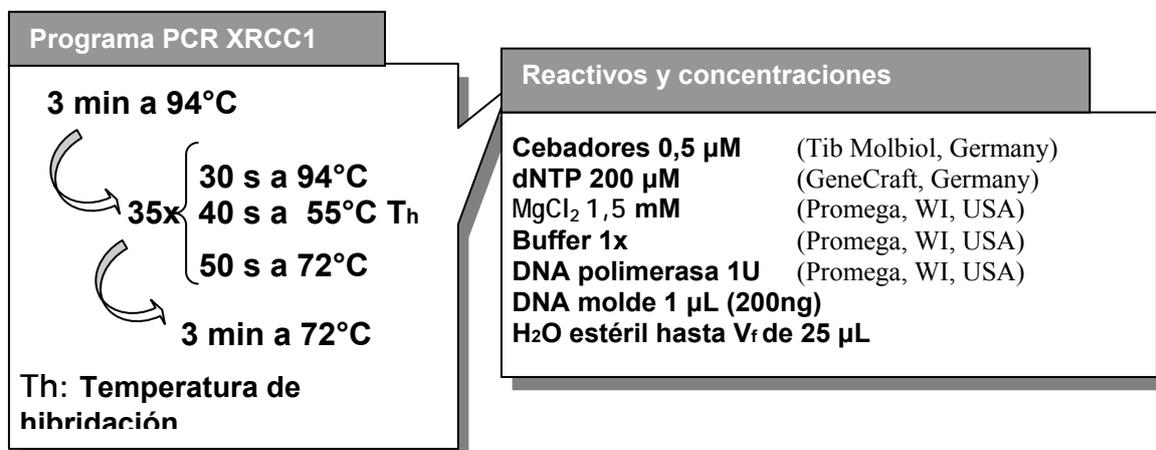


Figura 25: Programa y componentes de la PCR dúplex.

Ambos exones se amplificaron en la misma reacción de PCR, pero la digestión para cada polimorfismo se realizó por separado, usándose la enzima *Msp I* para *Arg194Trp* y la *Rsa I* para *Arg280His*. Las condiciones de digestión se establecieron según las indicaciones de la casa comercial, en un volumen total de 70 μ L. El producto de la PCR dúplex (16 μ L) se incubó con la correspondiente enzima (10 U de *Msp I* ó 5 U de *Rsa I*) en tampón de digestión 1 \times (New England Biolabs, Hertfordshire, UK), durante toda la noche a 37°C.

El sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *Msp I* sólo lo presenta el alelo salvaje *Arg194*; por consiguiente, la digestión de este alelo genera productos de 120 pb y 343 pb. En cambio, el alelo mutante *Trp194* no se digiere y se reconoce por un fragmento de 463 pb. La diana de restricción de *RsaI* está presente en el alelo salvaje *Arg280*, dando su digestión productos de 184 y 55 pb, mientras que el alelo mutante *His280* se distingue por un producto sin digerir de 239 pb.

Los fragmentos se visualizan por electroforesis en gel de agarosa al 3,5% (FMC Bioproducts Rockland, USA). Para ello se cargan en el gel 12 μ L de producto de digestión en 3 μ L de tampón de carga (10% de TAE 50x, 60% de agua miliQ, 30% de glicerol -Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania-, y azul de bromofenol -Sigma, MO, USA), y se someten a 100 voltios durante aproximadamente 40 min. Se tiñen con una solución 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio (Pharmacia Biotech AB, Suecia) durante 15-20 minutos.

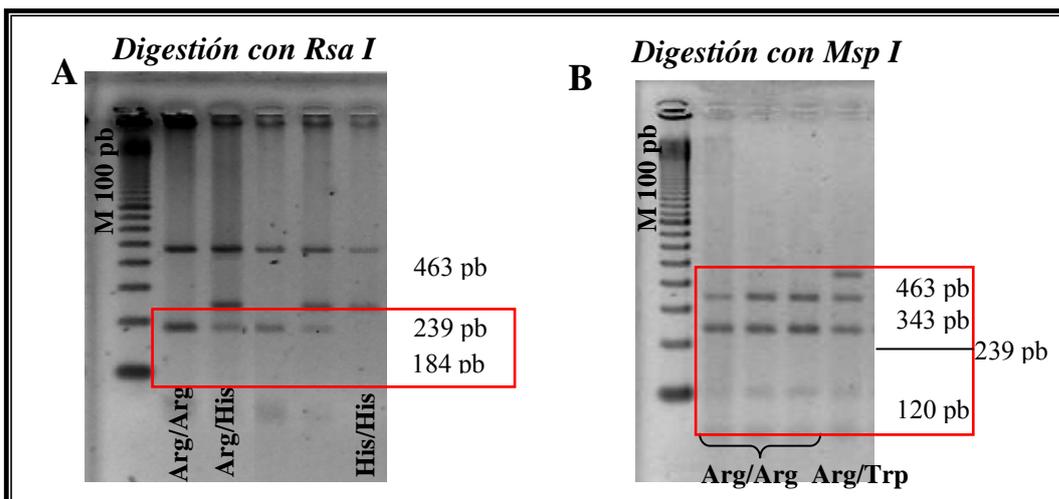


Figura 26: Genotipos del XRCC1. Fragmentos de restricción visualizados en gel de agarosa al 3,5%. **A:** digestión de *Arg280His* con *Rsa I* y **B:** digestión de *Arg194Trp* con *Msp I*. En recuadro se encierran bandas informativas.

El tamaño de las bandas se determina por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (Biotools, Madrid, España), y se analizan bajo luz UV con ayuda del programa Kodak 3.0 (Rochester, NY, USA) (Figura 26).

Se distinguieron: a) los homocigotos salvajes por la presencia de dos bandas consecuencia del corte, b) los heterocigotos por la presencia de 3 bandas, tanto la banda sin cortar como de las resultantes del corte) y c) los homocigotos para el cambio de base por la presencia una sola banda sin cortar. En todos los patrones se apreció, además, la banda del otro exón amplificado.

Genotipado por PCR a tiempo real

El genotipado del SNP *Arg399Gln* del gen *XRCC1* se realizó por medio de PCR a tiempo real. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando la mezcla comercial *LightCycler-DNA Fast Start master hybridization probes* (Roche Diagnostics GmbH, Germany).

La secuencia de los cebadores y sondas utilizados, así como las condiciones de reacción y el programa de amplificación se describen en la Figura 27 y las Tablas 3 y 4.

Tabla 3: Secuencia de cebadores y sondas.

Gen	SNP cambio	Cebadores y Sondas	producto PCR (pb)
<i>XRCC1</i>	<i>Arg399Gln</i> G → A Nt 28112	399F 5'-TGGGAGGCCGCATCGT-3'	139
		399R 5'-CCCTCCAGATTCCTGGCATT-3'	
		Aceptora 5'-GGCTGCCCTCCCGGAGGTAAG-FL -3'	
		Donadora 5'-LCR640-CCTCACACGCCAACCCCTGCTCCTT -PH3'	

Abreviaturas: FL=Fluoresceína, PH=grupo fosfato

Reactivos y concentraciones		
Cebadores	0,5 µM	(Roche Diagnostics GmbH, Germany)
Sondas	0,2 µM	(Roche Diagnostics GmbH, Germany)
MgCl₂	3 mM	(Roche Diagnostics GmbH, Germany)
Mezcla 10x	1 µL	(Roche Diagnostics GmbH, Germany)
DNA molde	1 µL (10ng)	
H₂O estéril	hasta V_f de 10 µL	

Figura 27: Componentes de PCR.

El programa de PCR (versión 3.5, Roche, Alemania), se introduce en el ordenador acoplado al LightCycler y consta de 4 fases: desnaturalización, amplificación, disociación y enfriamiento:

Tabla 4: Programa de PCR.

Programa Núm. ciclos	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	T transición (°C/s)	Detección fluorescencia
Desnaturalización 1	1	95	600	20	Ninguna
Amplificación 45	1 (desnat.)	95	10	20	Ninguna
	2 (hibrid.)	63	10	20	Única
	3 (ext.)	72	20	3	Ninguna
Curva de disociación 1	1	95	60	20	Ninguna
	2	40	60	20	Ninguna
	3	80	0	0,1	Continua
Enfriamiento 1	1	40	30	20	Ninguna

Como la sonda aceptora se diseñó con el fluorocromo LC Red 640, la fluorescencia se midió a 640 nm (canal F2) al final de cada fase de hibridación y continuamente durante la fase de disociación. Una vez lograda la amplificación en la PCR a tiempo real de un único pico, se comprobó la especificidad de este producto por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Con este procedimiento se optimizaron las condiciones de PCR a tiempo real y se definieron cuales son las T_m para cada alelo. Además, a varias muestras al azar se le corroboró el genotipo por secuenciación y estas muestras se incluyeron en las siguientes rondas como controles.

El genotipado se hizo por análisis de las curvas de disociación. La observación de un único pico a la temperatura de disociación esperada ($T_m \approx 69,8^\circ\text{C}$) indica homocigosis para el alelo salvaje; a su vez, distinguimos los homocigotos variantes por la presencia de un solo pico a una T_m más baja ($T_m \approx 63,7^\circ\text{C}$) y los heterocigotos por la observación de sendos picos (Figura 28).

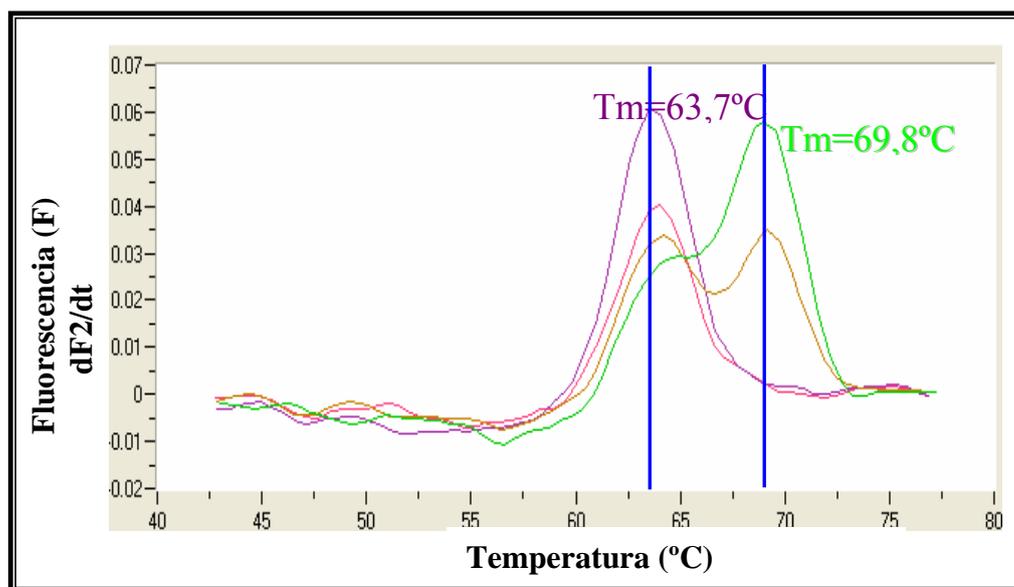


Figura 28: Genotipos de XRCC1 detectados en F2. Muestra homocigota sin cambio Arg/Arg ($T_m=69,8^\circ\text{C}$), muestra homocigota para el cambio Gln/Gln ($T_m=63,7^\circ\text{C}$) y muestra heterocigota Arg/Gln (ambos picos).

3.3.2.2 Análisis de los genotipos de XRCC2

Genotipado por PCR a tiempo real

El polimorfismo *Arg188His* (exón 3 G31479A, rs#3218536) del gen *XRCC2* se estudió mediante PCR Alelo-Específica en tiempo real con cebadores TrueSNP y detección por SYBR Green en LigthCycler. Se diseñaron tres cebadores: un reverso común y dos directos con un nucleótido modificado (LNA) en el extremo 3' (Prologo Sigma, USA) y que difieren únicamente en la base de ese extremo, uno específico para el alelo salvaje y el otro para la variante (Tabla 5).

Tabla 5: Secuencia de cebadores.

Gen	SNP Cambio	Cebadores	producto PCR (pb)
<i>XRCC2</i>	<i>Arg188His</i> G → A Nt 31479	Fw5' AGCTTGTAATGACTATC+G-3' Fm 5'AGAAGCTTGTAATGACTATC+A-3' R 5'CTGCTTTGAGAATCATCTTGTT-3'	211

Fw = cebador directo salvaje; *Fm* = cebador directo mutante

La reacción de PCR se hizo según se recomienda para el “kit” *LigthCycler FastStart DNA Master^{plus} SYBR Green* (Roche Molecular Biochemicals, Manheim,

Germany) (Figura 29). Los capilares se cargaron con 9 μL de la mezcla 5x + cebadores y 1,5 μL de DNA genómico (10 ng).

Reactivos y concentraciones		
Cebadores	0,25 μM	(Sigma Prologo, USA)
Mezcla 5x	2 μL	(Roche Diagnostics GmbH, Germany)
DNA	1 μL (10ng)	
H₂O estéril	hasta V_r de 10 μL	

Figura 29: Componentes de la PCR.

El programa de PCR se introduce al ordenador acoplado al LightCycler (Tabla 6). Por cada muestra se realizan dos reacciones, una para cada pareja de cebadores.

Tabla 6: Programa de PCR.

Programa Núm. ciclos	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	T transición (°C/s)	Detección fluorescencia
Desnaturalización 1	1	95	600	20	Ninguna
Amplificación 45	1(desnat.)	95	10	20	Ninguna
	2(hibrid.)	63	10	20	Ninguna
	3 (ext.)	72	15	20	Ninguna
		80	5	20	Única*
Curva de disociación 1	1	95	0	20	Ninguna
	2	65	15	20	Ninguna
	3	95	0	0,1	Continua
Enfriamiento 1	1	40	30	20	Ninguna

* Para excluir artefactos por dímeros de cebadores se adiciona una fase en cada ronda de amplificación a temperatura superior a la de disociación de los dímeros de cebadores y por debajo de la de disociación del producto de PCR específico ($\approx 84^\circ\text{C}$).

Consideramos optimizadas las condiciones de amplificación una vez que en la curva de disociación observamos un solo pico en la T_m esperada y hubimos comprobado por electroforesis, en gel de agarosa al 2%, la especificidad de la amplificación. El genotipo de algunas muestras escogidas al azar se comprobó por secuenciación. Una vez descartada la presencia de falsos positivos, y dadas por válidas las condiciones de amplificación, se procedió al genotipado de la población,

incluyéndose en cada ronda de PCR una muestra de genotipo conocido para que actuara como control de amplificación. Para cada muestra se analizaron las curvas de disociación de ambas reacciones. Se consideró homocigosis para uno u otro alelo si amplificaba sólo en una de la reacciones (único pico) o heterocigosis si lo hacía en ambas reacciones (pico en las reacciones de ambos alelos) (Figura 30).

También fue observada la curva de amplificación para corroborar el genotipo a partir del *crossing point* y el ΔCt (ver Figura 19 y 20 del apartado 1.3.3.3.1).

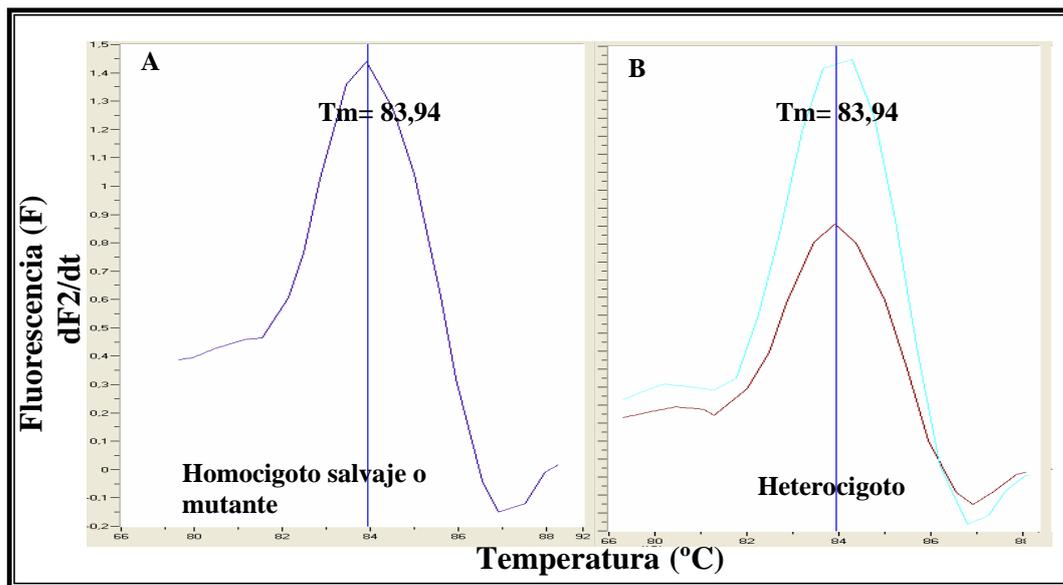


Figura 30: Genotipos del XRCC2: A Muestra homocigota Arg/Arg o His/His, amplificación en una sola reacción (pico $T_m \approx 83,4^\circ C$), **B** muestra heterocigota Arg/His, amplificación en ambas reacciones (dos picos con la misma T_m).

3.3.2.3 Análisis de los genotipos de XRCC3

Evaluamos los polimorfismos *IVS5-14* (A17893G, rs#1799796), y *Thr241Met* (exón 8 C18067T, rs#861539) de *XRCC3*.

Genotipado por PCR RFLP

Los polimorfismos se examinaron por medio de PCR dúplex con análisis de RFLP. La secuencia de los cebadores utilizados, los productos de amplificación, las enzimas y los fragmentos de restricción se presentan tabulados (Tabla 10). Las condiciones de reacción y el programa de PCR se describen en la Figura 31.

El producto de PCR se digirió por separado con las endonucleasas de restricción *Nla III* y *Pvu II* (New England Biolabs, Hitchin, United Kingdom) respectivamente.

Particularmente, para el SNP *Thr241Met*, se tomaron 8 µL del producto de PCR y se digirieron en un volumen total de 20 µL con 1 U de *Nla* III (en buffer 1x suplementado con 100 ng/µL de albúmina sérica), durante toda la noche a 37°C. Este fragmento contiene una diana interna para *Nla* III, que produce dos fragmentos (154 y 218 pb) que sirven como controles de digestión; la presencia del polimorfismo *Met* genera una diana adicional resultando en el patrón de bandas descrito en la Tabla 7.

Tabla 7: Secuencia de los cebadores, enzimas y fragmentos de restricción de los SNPs de *XRCC3*.

Gen	SNP Cambio	Cebadores	producto PCR (pb)	Enzima de restric.	Fragmentos (pb)
<i>XRCC3</i>	<i>IVS5-14</i> A → G Nt 17893	F 5'-TAGGAAGGTTTTCAGACGGTC-3' R 5'-CTTCCGCATCCTGGCTAA-3'	372	<i>PvuII</i>	AA = 283, 89 AG = 283, 89, 372 GG = 372
				<i>NlaIII</i>	CC = 154, 218 CT = 218, 154, 112,106 TT = 154, 112, 106
	<i>Thr241Met</i> C → T Nt 18067	PCR Anidada F 5'-TAGGAAGGTTTTCAGACGGTC-3' R 5'-GAGCTCAGGGGTGCAACC-3'	349	<i>PvuII</i>	AA = 260, 89 AG = 260, 89, 349 GG = 349
				<i>NlaIII</i>	CC = 154, 195 CT = 154, 106, 89, 195 TT = 154, 106, 89

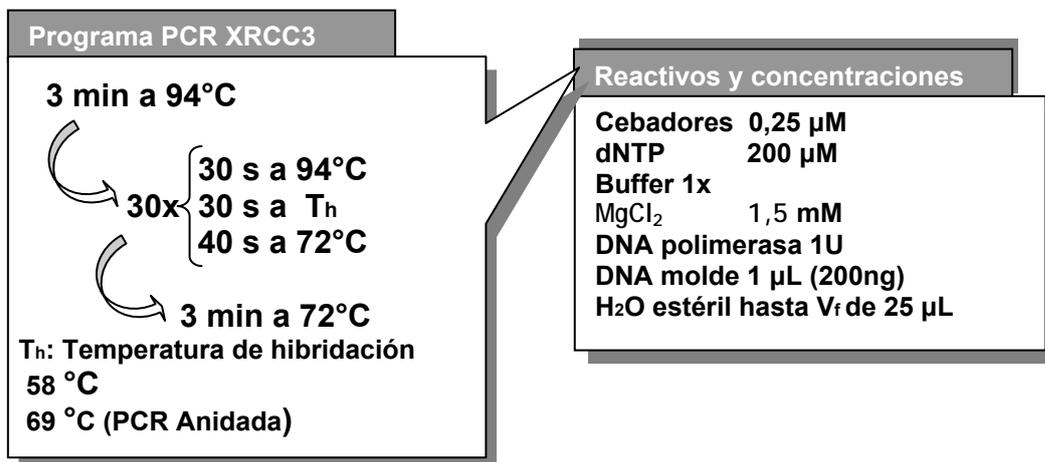


Figura 31: Programa y componentes de la PCR dúplex.

El producto de digestión (12 µL) en 3 µL de tampón de carga se cargó en gel de agarosa Metaphor al 3% (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA) y se sometió a electroforesis durante aproximadamente 2 horas a 120 voltios para poder

visualizar los fragmentos. Para teñir las bandas se usó una solución de bromuro de etidio durante 15-20 minutos. El tamaño de las bandas se determinó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb.

El polimorfismo *IVS5-14* se estudió por digestión de 10µL del producto de PCR con 2 U de *Pvu II* en un volumen total de reacción de 20µL a 37°C durante toda la noche. La diana de corte para la enzima está en el alelo salvaje, distinguiéndose del variante por la presencia de dos bandas. El producto digerido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. El patrón de fragmentos que identifica cada genotipo se analizó por medio de la tinción del gel con bromuro de etidio y posterior visualización bajo luz ultravioleta (Tabla 7 y Figura 32).

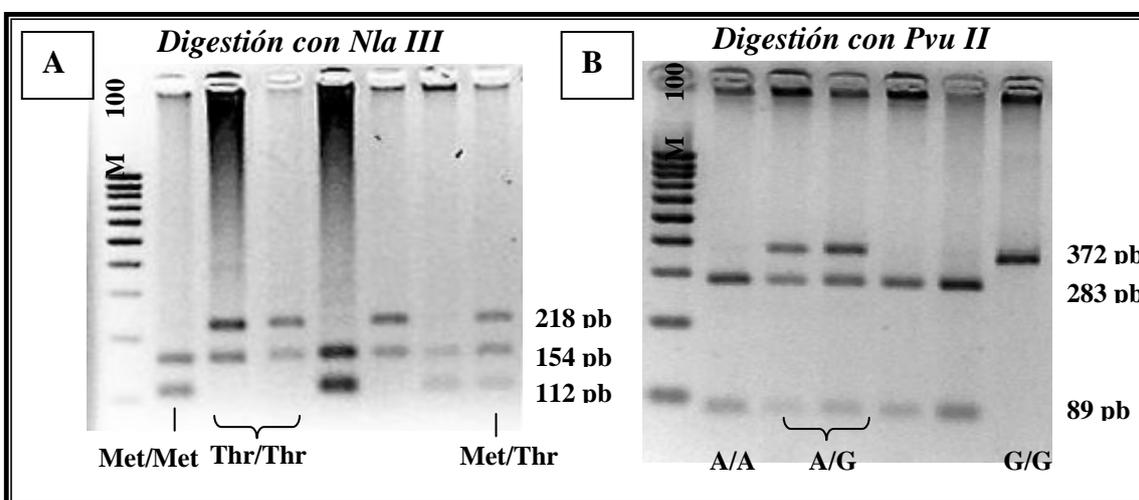


Figura 32: Genotipos del XRCC3. A: Fragmentos de la digestión de Thr241Met con NlaIII separados en agarosa Metaphor 3% y B: Fragmentos de la digestión de IVS5-14 con PvuII separados en agarosa al 2,5%.

Para aquellas muestras que no amplificaron en las condiciones previas, se realizó una PCR anidada usando el mismo cebador directo que el de la primera ronda de amplificación y como cebador reverso uno más interno (Tabla 7). En estas condiciones se obtiene un producto de 349 pb que, al ser digerido con las mismas enzimas, produce un patrón de bandas de RFLP característico de cada genotipo (Tabla 7).

3.3.2.4 Análisis de los genotipos de *OGG1*

Genotipado por PCR RFLP

Se evaluó por análisis de PCR-RFLP el SNP *Ser326Cis* (rs1052133) que implica cambio de C por G en el exón 7 de *OGG1*. El fragmento de 251 pb se amplificó en un volumen de reacción de 25 μ L y con las condiciones de PCR descritas en la Figura 33. Los cebadores usados para la amplificación abarcan el intrón 6 (el directo), y el exón 7 (el reverso) de la secuencia de DNA del gen *OGG1* (Genbank #HSA131341) (Tabla 8).

Tabla 8: Secuencia de los cebadores, enzima y fragmentos de restricción.

Gen	SNP	Cebadores	Producto PCR (pb)	Enzima restrict.	Fragmentos (pb)
<i>OGG1</i>	<i>Ser326Cis</i> C \rightarrow G Nt 1245	F 5' AGTGGATTCTCATTGCCTTCG-3' R 5' GGTGCTTGGGGAATTTCTTT-3'	251	<i>Ita I</i>	CC = 251 CG = 155, 96, 251 GG = 155, 96

Las secuencias de los cebadores se han obtenido de Kim et al. (2003)

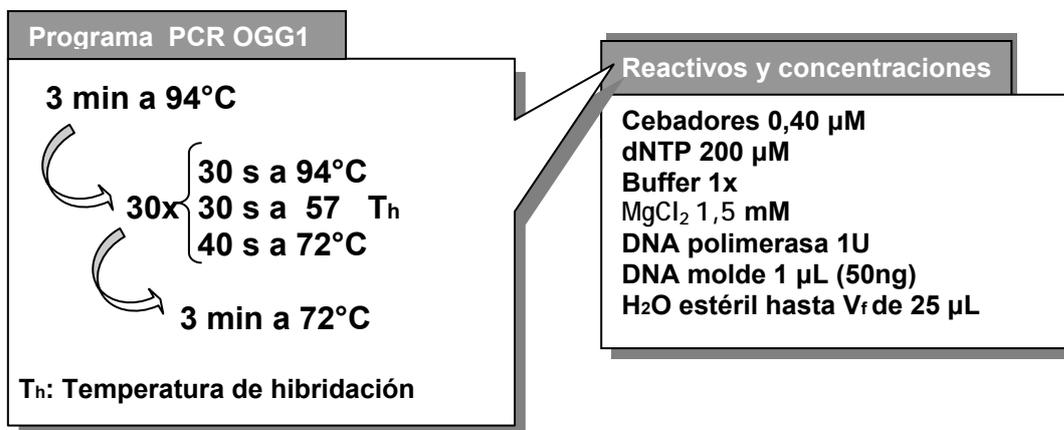


Figura 33: Programa y componentes de la PCR.

El producto de PCR (16 μ L) se digirió toda la noche a 37°C con 5 U de la enzima de restricción *Ita I* (New England Biolabs, Hertfordshire, UK) en un volumen de digestión de 70 μ L.

El patrón de RFLP se observó en gel de agarosa al 3%. El alelo variante *326Cis* tiene diana para la enzima y genera dos fragmentos, mientras que el alelo salvaje *326Ser* permanece sin digerir (Tabla 8, Figura 34).

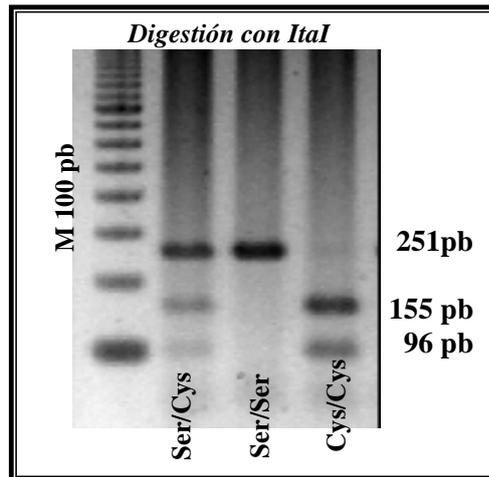


Figura 34: Genotipos del OGG1. Fragmentos de restricción de la digestión del SNP *Ser326Cis* visualizados en gel de agarosa al 3%.

3.3.2.5 Análisis de los genotipos de TG

Exploramos por medio de PCR 4 polimorfismos de *TG*: 2 en el exón 10, uno no conservativo *Ser734Ala* (rs180223) y el otro silencioso *Pro778Pro* (rs2069550), 1 en el exón 12 *Met1027Val* (rs853326) y 1 en el exón 33 *Arg1980Trp* (rs11535853), ambos no conservativos.

Genotipado por PCR RFLP

El mismo programa de PCR se utilizó para la amplificación de los fragmentos que abarcan todos los SNPs. Sin embargo, como el patrón de bandas que se obtiene de la digestión de este producto es complejo de separar y analizar, se optó por amplificar al unísono los amplicones que contengan los SNPs *Ser734Ala* y *Arg1980Trp*, y por separado uno que abarque el *Met1027Val* (Figura 35). El polimorfismo *Pro778Pro* del exón 10 se amplificó con una pareja de cebadores más internos que los usados para el otro SNP de este exón. La secuencia de los cebadores, los productos de amplificación, las enzimas de digestión y patrones de bandas se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Secuencia de cebadores, enzimas y fragmentos de restricción de SNPs de *TG*.

Gen	SNP Cambio	Cebadores	product PCR (pb)	Enzimas restriccion	Fragmentos (pb)
<i>TG</i>	<i>Ser734Ala</i> T → G Nt 2200	F 5'GGTTTTATCTTGGTCTTTCC-3' R 5'CAGCCTCATACAGACTTTGA-3'	376	<i>Blp I</i>	TT = 376 TG = 376, 281, 95 GG = 281, 95
	<i>Pro778Pro</i> T → C Nt 2334	F 5'CACCTGCTCATTGTTTCCTCCC -3' R 5'TCTTCACTAGCAGCTTGGCA -3'	264	<i>Dde I</i>	TT = 48, 14, 118, 36, 47 TC = 48, 14, 118, 154, 36, 47 CC = 48, 14, 154, 47
	<i>Met1027Val</i> A → G Nt 3082	F 5'ACAGAGCAGGTGGTCATATT-3' R 5'GTCCACAATCACTCTGATGC-3'	422	<i>BsaA I</i>	AA = 422 AG = 422, 296, 126 GG = 296, 126
	<i>Arg1980Trp</i> C → T Nt 5995	F 5'CACTCATGCATATTGACCAA-3' R 5'CTGAGGATTTGTAAAAGCAT-3'	324	<i>Hpy 99I</i>	CC = 148, 176 CT = 324, 148, 176 TT = 324

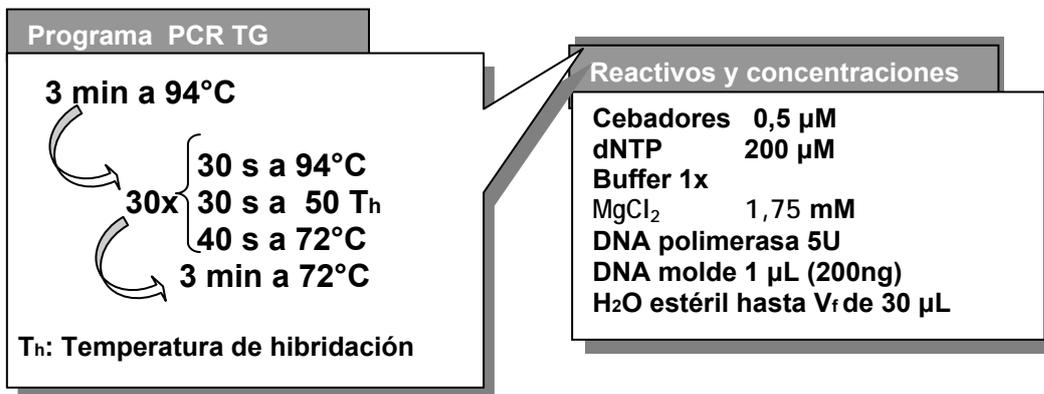


Figura 35: Programa y componentes de la PCR.

Para estudiar el SNP *Ser734Ala* y el *Arg1980Trp*, 10 μL el producto de la PCR dúplex se digirió con 1U de *Blp I* y con 1U de *Hpy 99I* (New England Biolabs, Hertfordshire, UK) en un volumen final de 30 μL. La digestión transcurrió a 37°C durante toda la noche. La enzima *Blp I* tiene una diana en el alelo variante *734Ala* del SNP *Ser734Ala*, y corta el amplificado en dos fragmentos, mientras que el alelo sin cambio *734Ser* no se digiere. Por el contrario, *Hpy 99I* tiene la diana en el alelo sin cambio *1980Arg* del SNP *Arg1980Trp*, cortándolo en dos fragmentos, y el que tiene el cambio *1980Trp* permanece sin digerir. Los heterocigotos de ambos polimorfismos presentan 3 bandas, con lo cual la digestión simultánea del producto de esta PCR dúplex puede generar hasta 9 patrones de banda distintos al hacer la electroforesis en el gel de agarosa Metaphor al 3,5% (Figura 36).

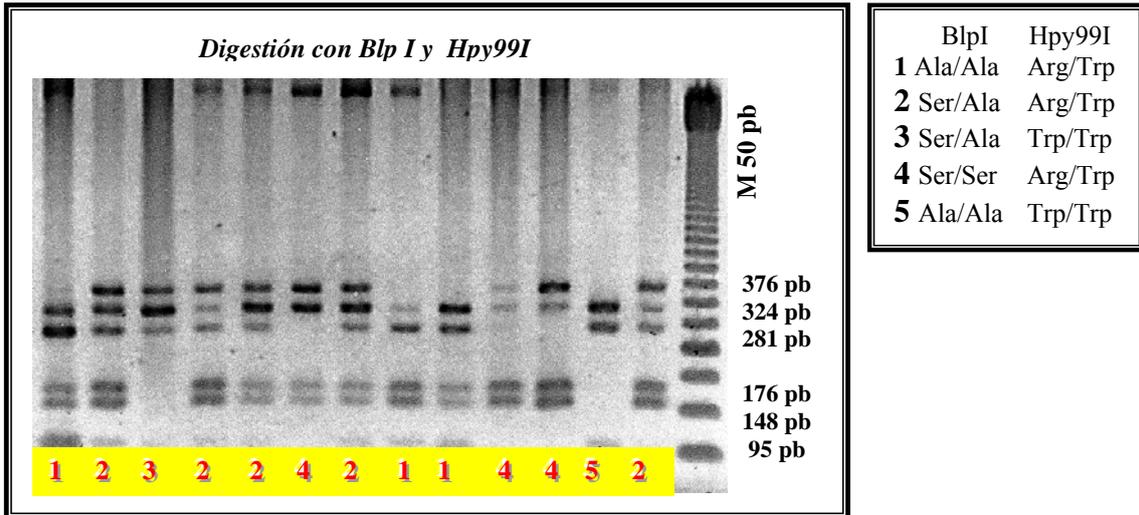


Figura 36: Genotipos del TG. Fragmentos de restricción de los SNP *Ser734Ala* y *Arg1980Trp* separados en gel de agarosa *Metaphor* al 3,5%.

El segundo polimorfismo del exón 10, *Pro778Pro*, se estudió por digestión de 10 μ L del producto de PCR con 2 U de la enzima *Dde I* a 37°C durante toda la noche. La enzima tiene 3 sitios de corte independientes del que se genera por el SNP por lo que el fragmento amplificado siempre se cortará y podremos utilizar estas bandas como control de digestión. Para el genotipado se analizan 2 bandas informativas de 154 y 118 pb (Tabla 12, Figura 37).

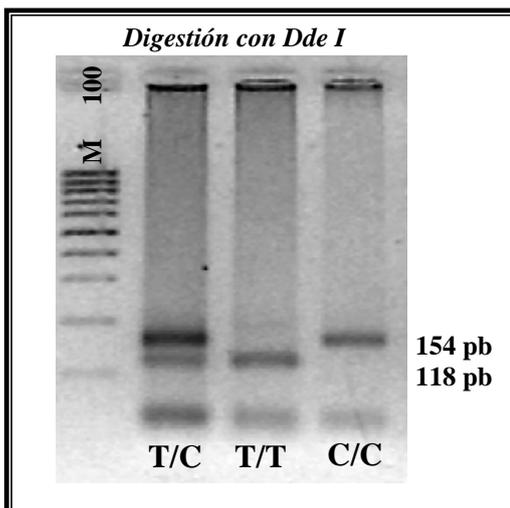


Figura 37: Genotipos del TG. Fragmentos de restricción del SNP *Pro778Pro* separados en gel de agarosa al 3%.

El SNP *Met1027Val* del exón 12 se analizó por digestión de 10 µL del producto de PCR con 1 U de enzima *BsaA I* en un volumen final de 20 µL a 37°C durante toda la noche. Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel al 3,5% de agarosa Metaphor. Las bandas se visualizaron bajo luz UV después de su tinción con bromuro de etidio. El tamaño de las bandas se determinó por comparación con un marcador de peso molecular de 50 pb (Figura 38).

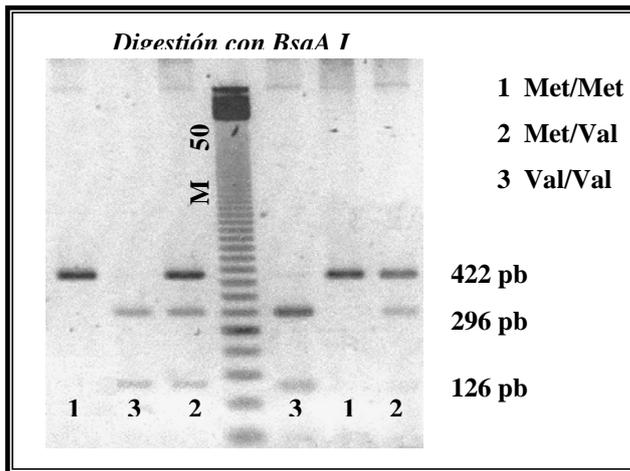


Figura 38: Genotipos del TG. Fragmentos de restricción del SNP *Met1027Val* visualizados en gel de agarosa Metaphor al 3,5 %.

3.3.2.6 Análisis de los genotipos de *TSHR*

Evaluamos 2 polimorfismos no conservativos localizados en la región codificante de *TSHR*: uno en su dominio extracelular *Pro52Thr* y otro en su cola intracelular *Asp727Glu* (rs1991517) (Chistiakov, 2003).

Genotipado por PCR RFLP

El polimorfismo *Pro52Thr* del primer exón de este gen se estudió por medio de PCR-RFLP. Como la secuencia que incluye al SNP no tiene diana de restricción, se cambiaron dos bases en el cebador reverso para crear una diana para la enzima *Tth111 I* (Kaczur *et al.*, 2000)

La secuencia de los cebadores utilizados, así como la longitud, en pares de bases, del producto de amplificación y digestión se presentan tabulados (Tabla 10). En la Figura 39 se resumen las características del programa de PCR y las condiciones de reacción.

Tabla 10: Secuencia de los cebadores, enzimas y fragmentos de restricción.

Gen	SNP cambio	Cebadores	Producto PCR (pb)	Enzima restric.	Fragmentos (pb)
TSHR	<i>Pro52Thr</i> C → A Nt 253	F 5' TCCCGTGGAAAATGAGGCC-3' R 5' GGTACTCACAGAGTCTGCG <u>AC</u> CTG-3'	189	<i>Tth1111</i>	CC = 189 CA = 167, 22, 189 AA = 167, 22

Las secuencias de los cebadores se han obtenido de Kaczur et al. (2000) Negrita: cambio de TA a GT

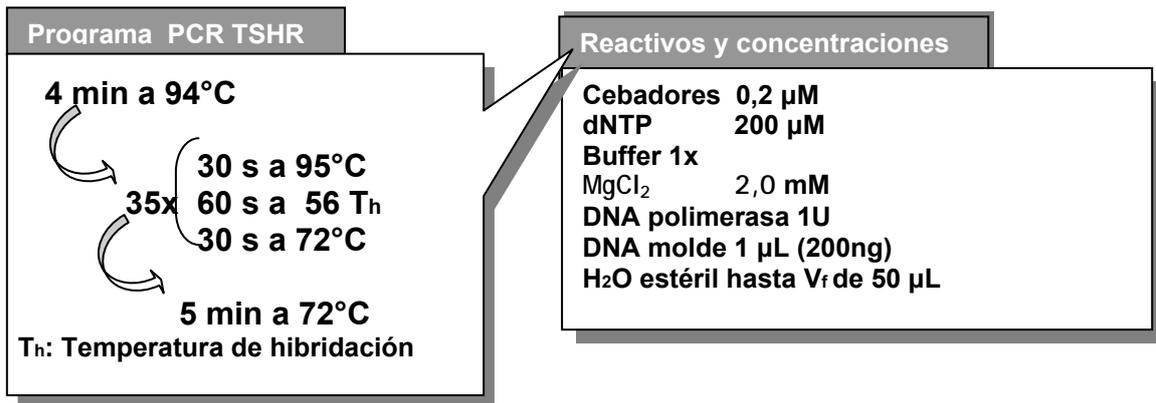


Figura 39: Programa y componentes de la PCR.

El producto de PCR (10 μL) se digirió durante 3 horas a 65°C con 10 U de la enzima *Tth1111* en buffer 1x y suplementado con 100 ng/μL de albúmina sérica. Los fragmentos se separaron en gel de agarosa Metaphor al 3%. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV.

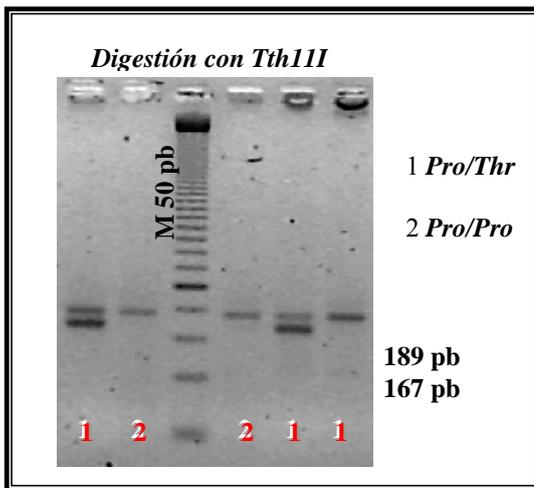


Figura 40: Genotipos de TSHR. Fragmentos de restricción del SNP *Pro52Thr* separados por electroforesis en gel de agarosa Metaphor al 3 %.

El alelo con el cambio es el que tiene la diana y por tanto se corta en dos fragmentos, el alelo salvaje se reconoce por una única banda y los heterocigotos presentan tres bandas (Tabla 10, Figura 40). Dada la baja frecuencia (aproximadamente 7%) del alelo *52Thr*, se incluyó como control de digestión el plásmido pBR322 (1000 µg/ml) (New England Biolabs, Hitchin, United Kingdom), cuyo DNA (4361 pb) contiene una diana *Tth111 I* (2217 pb). La digestión con dicha enzima provoca el cambio de conformación de circular a lineal y este cambio de conformación implica diferente movilidad electroforética (menor para la forma lineal), lo cual es visible en un gel de agarosa 0,8%.

Genotipado por PCR a tiempo real

El polimorfismo *Asp727Glu* se analizó por PCR alelo específica en tiempo real con cebadores TrueSNP y detección por SYBR Green en LigthCycler. Los cebadores fueron diseñados y adquiridos a la compañía Proligo, Francia (Tabla 11).

Para la reacción de PCR se utilizó el “kit” *LigthCycler FastStart DNA Master^{plus} SYBR Green* (Figura 41). Los capilares se cargaron con 9 µL de la mezcla 5x + cebadores y 1,5 µL de DNA genómico (10 ng). El programa de PCR se describe en la Tabla 12.

Tabla 11: Secuencia de los cebadores.

Gen	SNP Cambio	Cebadores	producto PCR (pb)
<i>TSHR</i>	<i>Asp727Glu</i> C → G Nt 2281	Fw 5'GGTTCAAAGGTTACCCACGAC-3' Fm 5'GGTTCAAAGGTTACCCACGAG-3' R 5'GTAGTGTTAACTTACAAAACCGTTTGC-3'	147

Reactivos y concentraciones	
Cebadores	0,25 µM
Mezcla 5x	2 µL
DNA	1 µL (10ng)
H ₂ O estéril	hasta V _f de 10 µL

Figura 41: Componentes de la PCR.

Tabla 12: Programa de PCR.

Programa Núm. ciclos	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	T transición (°C/s)	Detección fluorescencia
Desnaturalización 1	1	95	600	20	Ninguna
Amplificación 45	1(desnat.)	95	10	20	Ninguna
	2(hibrid.)	63	10	20	Ninguna
	3 (ext.)	72	10	20	Única
Curva de disociación 1	1	95	0	20	Ninguna
	2	65	15	20	Ninguna
	3	95	0	0,1	Continua
Enfriamiento 1	1	40	30	20	Ninguna

Para la optimización de las condiciones experimentales se procedió según el apartado 3.3.2.2. El análisis de curvas de disociación de las reacciones para cada alelo permitió el genotipado de cada muestra (Figura 42).

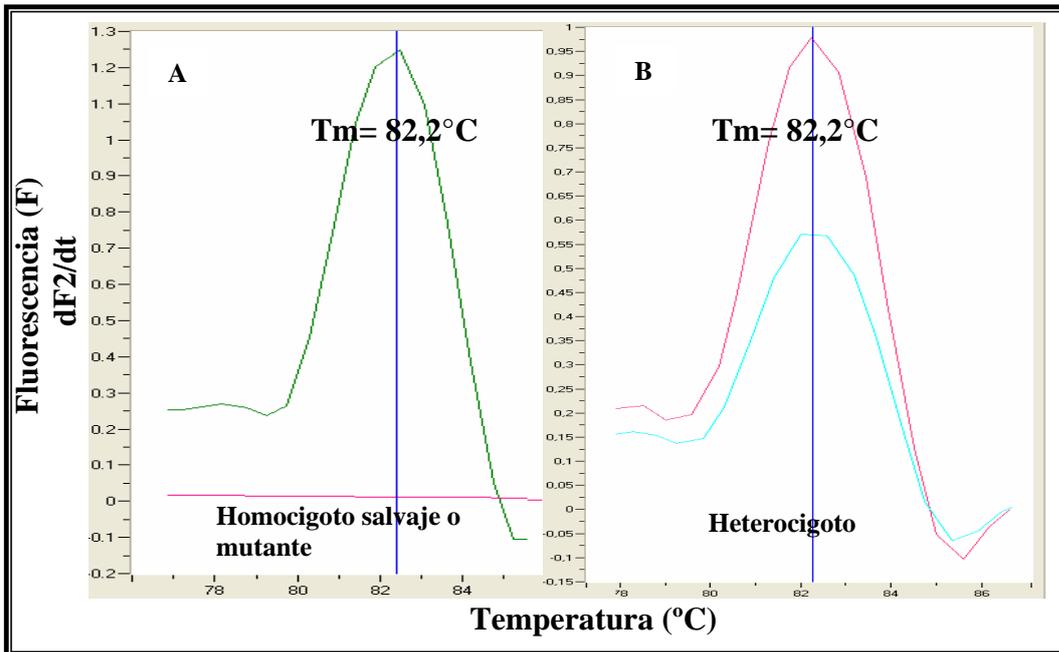


Figura 42: Genotipos de TSHR. Curvas de disociación correspondientes al genotipado del *Glu727Asp*. **A** Muestra homocigota *Glu/Glu* o *Asp/Asp*, amplificación en una sola reacción (pico $T_m \approx 82,2^\circ\text{C}$), **B** muestra heterocigota *Asp/Glu*, amplificación en ambas reacciones (dos picos con igual T_m).

Se consideró homocigoto salvaje o variante si se apreciaba un pico a una Tm aproximada de 82,2°C en una de las 2 reacciones (amplificación para un solo alelo) o heterocigoto si se detectaban sendos picos a igual Tm (amplificación de los 2 alelos).

3.3.2.7 Análisis de los genotipos de *PTPRJ*

Genotipado por PCR a tiempo real

El polimorfismo *Asp872Glu* del exón 13 de este gen no tiene dianas de restricción por lo que se estudió mediante PCR Alelo-Específica en tiempo real con cebadores TrueSNP y detección por SYBR Green en LigthCycler. Los tres cebadores fueron diseñados y suministrados por Proligo Sigma, Francia (Tabla 13).

Tabla 13: Secuencia de los cebadores.

Gen	SNP cambio	Cebadores	Producto PCR (pb)
<i>PTPRJ</i>	<i>Asp872Glu</i> C → G Nt 2965	Fw 5' AGATGTCCTGAAATACACGTATGA+C 3' Fm 5' AGATGTCCTGAAATACACGTATGA+G 3' R 5' GTGGGATAACAAAGAGCAAAAAGA 3'	307

Los capilares se cargaron con 9 µL de la mezcla 5x de *LigthCycler FastStart DNA Master^{plus} SYBR Green* + cebadores y 1,5 µL de DNA genómico (10 ng) (Figura 43). El programa de PCR que se siguió fue el descrito en la Tabla 14.

Reactivos y concentraciones		
Cebadores	0,25 µM	(Sigma Proligo, USA)
Mezcla 5x	2 µL	(Roche Diagnostics GmbH, Germany)
DNA	1 µL (10ng)	
H ₂ O estéril	hasta Vf de 10 µL	

Figura 43: Componentes de la PCR.

Tabla 14: Programa de PCR.

Programa Núm. ciclos	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	T transición (°C/s)	Detección fluorescencia
Desnaturalización 1	1	95	600	20	Ninguna
Amplificación 45	1(desnat.)	95	10	20	Ninguna
	2(hibrid.)	62	10	20	Ninguna
	3 (ext.)	72	10	20	Ninguna
		81	5	20	Única
Curva de disociación 1	1	95	0	20	Ninguna
	2	65	15	20	Ninguna
	3	95	0	0.1	Continua
Enfriamiento 1	1	40	30	20	Ninguna

* Para excluir artefactos por dímeros de cebadores se adiciona una fase en cada ronda de amplificación a temperatura $\approx 85^{\circ}\text{C}$.

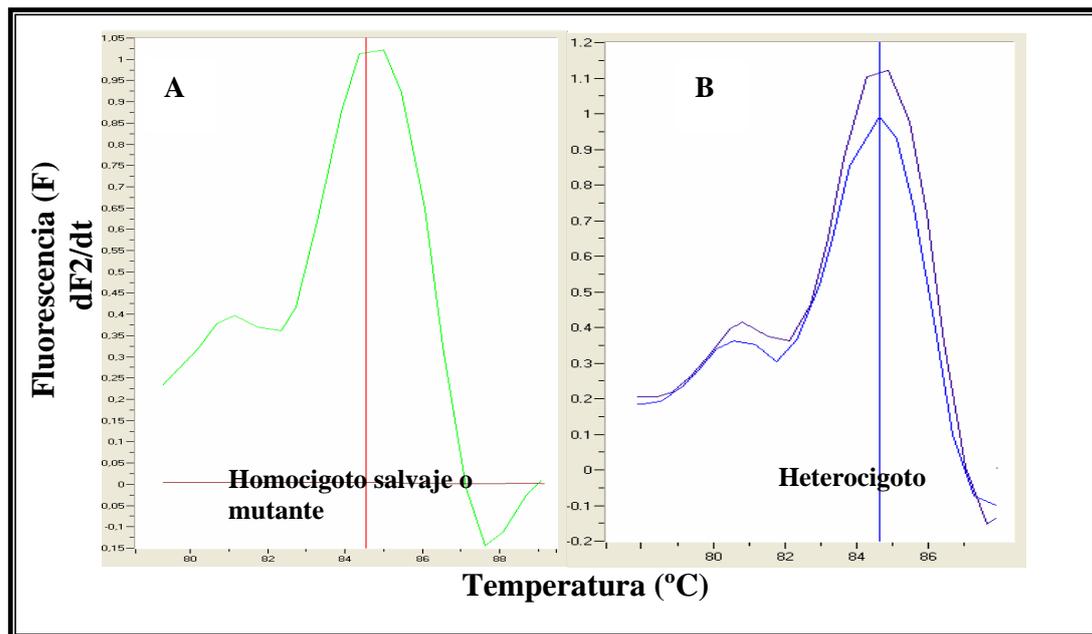


Figura 42: Genotipos de PTPRJ. Curvas de disociación correspondientes al genotipado de *Asp872Glu*. **A** Muestra homocigota *Glu/Glu* o *Asp/Asp*, amplificación en una sola reacción (pico $T_m \approx 84,5^{\circ}\text{C}$), **B** muestra heterocigota *Glu/Asp*, amplificación en ambas reacciones (dos picos con igual T_m).

Para la optimización de la PCR y la interpretación de las curvas se procedió según el apartado 3.3.2.2.

3.3.3 Secuenciación

Se secuenció el 10 % de las muestras genotipadas para cada polimorfismo. Las muestras fueron escogidas aleatoriamente. Los productos de PCR se purificaron usando el *kit* NucleoSpin® (Macherey-Nagel, Germany) y se enviaron al servicio de secuenciación de la UAB, o de MacroGen (MacroGen Inc, Korea).

Se comprobó que en todos los polimorfismos el error de genotipado no superaba el 1%, porcentaje que está dentro del margen de error descrito para las técnicas empleadas.

3.4. Análisis estadístico

Se realizó la estadística descriptiva (media + desviación típica y frecuencia) para las variables continuas y categóricas consideradas como factores potenciales de confusión en este estudio (edad, sexo, hábitos). Para las variables continuas cuya distribución no se ajustó a la normalidad (test de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov) se utilizaron pruebas no paramétricas (Mann-Whitney) y para aquellas variables continuas con distribución normal se utilizó el *t*-test. Para comparar las variables categóricas se utilizaron tablas de contingencia (test exacto de Fisher). La hipótesis de asociación de estos factores con la variable respuesta o dependiente se evaluó mediante el test de independencia de χ^2 . Los factores con una asociación significativa y un aumento del 20% en el coeficiente β se incluyeron en el modelo de regresión multinomial. Para cuantificar la magnitud de la asociación del polimorfismo con el riesgo de padecer cáncer de tiroides se calcularon, para cada genotipo con respecto al de referencia, las *odds ratio* (OR) crudas y ajustadas (con un intervalo de confianza del 95%). Este análisis se llevó cabo por regresión logística multinomial. Se tuvo en cuenta para el cálculo de las OR los modelos de herencia (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y aditivo). La selección del modelo de herencia más adecuado se hizo por comparación del ajuste del modelo codominante, que es el más general (2 parámetros), con los demás modelos (1 parámetro) por el test de la razón de verosimilitudes. Se escogió el modelo con menor valor del criterio de información de Akaike ($AIC = -2\log[L] + \#\text{parámetros}$), donde L es la verosimilitud del modelo. Este criterio pondera el ajuste del modelo ($-2\log L$) con la complejidad (número de parámetros). Se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas en ambas poblaciones. El equilibrio de Hardy Weinberg se calculó usando las frecuencias

genotípicas observadas y un test de χ^2 con un grado de libertad (programa SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/>)). Las frecuencias alélicas se compararon por análisis de χ^2 cuando la distribución de los alelos fue independiente en la población (equilibrio de Hardy-Weinberg en controles).

El posible sinergismo de alelos (interacción gen-gen) así, como el efecto modulador de los hábitos sobre el riesgo (interacción gen-ambiente) se analizaron por regresión logística (análisis caso-caso). Para este último análisis, las variables de exposición fueron evaluadas como variables dicotómicas.

Todos los análisis de los datos y los de regresión se ejecutaron con el paquete estadístico SPSS para Windows (versión 12; SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

La frecuencia de los haplotipos se estimó mediante el algoritmo esperanza-maximización. El desequilibrio de ligamiento se analizó por medio del estadístico D, que es la desviación entre la frecuencia haplotípica esperada (asumiendo no asociación) y la observada.

$$D = p_{12} - p_1 p_2$$

Siendo p_1 y p_2 las probabilidades de los dos alelos y p_{12} la probabilidad observada para la pareja.

Todos estos análisis se hicieron utilizando el programa HelixTree® (Golden Helix INC, USA, <http://www.goldenhelix.com>). El análisis de asociación de haplotipos con la susceptibilidad al cáncer tiroideo se realizó mediante regresión logística multinomial con ayuda del programa SNPStats. Para todas las pruebas estadísticas se escogió un nivel de confianza de un 95%.

Resultados



4. RESULTADOS

4.1 Descriptiva de la población

En la Tabla 15 se resumen las características demográficas de la población estudiada y los resultados de los potenciales factores de confusión (consumo de alcohol y de bebidas con cafeína y tabaquismo).

La población con cáncer de tiroides estudiada tiene una edad media de unos 44 años, y la control de unos 42 años, por lo que no difieren en este factor ($p=0,17$). Igual conclusión se obtuvo cuando la subdividimos (de acuerdo a los cuartiles) en cuatro grupos: menores de 34 años, edad comprendida entre 34 y 41 años, entre 41 y 51 y mayores de 51 años (Tabla 15).

Observamos que en ambas poblaciones más del 50% de los individuos tiene una edad superior a los 40 años. El porcentaje de individuos que supera esta edad en los pacientes con cáncer es ligeramente mayor que en la población control (56,2 vs. 51,7), aunque esta diferencia no es significativa. Por consiguiente, para los análisis de asociación con el riesgo la población se consideró como un único grupo en relación a la edad.

Cuando se comparan los grupos en relación al género, se observa que en el control las mujeres representan aproximadamente el 60 % de la muestra mientras que, en el grupo de pacientes más de un 70 % son mujeres. Esto corresponde a una relación 2,5:1, proporción que concuerda con lo descrito en la literatura sobre el predominio femenino de esta localización tumoral (Laxman y Crawford, 2002; Preston-Martín *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2005). La diferencia en la proporción de sexos entre pacientes y controles es altamente significativa, por lo que, decidimos incluir la variable género en el ajuste del modelo de regresión logística para los estudios de asociación del genotipo con el riesgo.

Para analizar el consumo de alcohol, la población se clasificó en bebedora y no bebedora. La distinción entre las categorías tuvo en cuenta que, en términos de riesgo, los bebedores se pueden subclasificar, a su vez, en: moderados, habituales, excesivos y alcohólicos. Los límites entre subclases, así como el nivel de riesgo son un tanto arbitrarios, puesto que las cantidades de alcohol consideradas como de riesgo son dinámicas y dependen del sexo y de las características individuales (etnia, peso, capacidad metabólica, estado de salud, etc). Las referencias al respecto no son

uniformes, pero la OMS considera que un bebedor de riesgo es un individuo cuyo consumo semanal de alcohol está por encima de 280 g en el varón y de 168 g en la mujer y recomienda no superar en hombres sanos los 30 g de alcohol puro al día y en mujeres sanas los 20 g http://www.elmedicointeractivo.com/formacion_acre2005/temas/tema21-22/ev6.htm.

Considerando lo anteriormente expuesto subclasificamos la población en cuatro grupos en función de los gramos de alcohol consumido a la semana: grupo 1 de no bebedores (0 g), grupo 2 (entre 1 y 60 g), grupo 3 (más de 60 y hasta 160 g) y grupo 4 (más de 160 g).

Los gramos de alcohol ingeridos se calcularon según la fórmula de equivalencia:

Gramos de alcohol = mL de bebida ingerida x grados x 0,8/100

Hay un predominio de bebedores en el grupo control para todas las categorías (2, 3 y 4). En los dos primeros grupos se acumula el mayor porcentaje de bebedores y se detectan diferencias significativas entre controles y pacientes de cáncer. El último grupo incluye sólo un 7% de la población y no se hallan diferencias entre controles y enfermos.

Por lo que respecta al hábito de fumar, en el grupo control la proporción de fumadores es algo mayor que en el grupo con cáncer (35,7 % frente a un 31,7 %), aunque en este último grupo los fumadores consumen una media de cigarrillos diarios algo más elevada, pero ninguna de estas diferencias son significativas.

El consumo de café y té también fue tenido en cuenta en vistas a que existen evidencias, en estudios funcionales, de que la cafeína inhibe la reparación del DNA (Berwick y Vineis, 2000), con lo cual podría potenciar el riesgo. Sin embargo, la relevancia de estas observaciones para el cáncer en humanos no está del todo esclarecida, existiendo estudios que encuentran asociaciones de riesgo entre consumo de bebidas con cafeína y cáncer, en uno y otro sentido (Mack *et al.*, 2002, 2003). En el caso particular del cáncer de tiroides, se ha hipotetizado que la cafeína incrementa el AMPc intracelular, lo cual tiene efectos inhibitorios sobre el crecimiento celular y tumoral en el tiroides. Los estudios epidemiológicos señalan indistintamente tanto la disminución del riesgo como la no asociación entre la susceptibilidad y el consumo de bebidas con cafeína (Mack *et al.*, 2003). En nuestros grupos el consumo de café y té es prácticamente el mismo.

El último factor incluido en nuestro análisis fueron los antecedentes familiares de cáncer. En el caso de la población con cáncer de tiroides, el porcentaje de familiares directos con cáncer es más elevado que en la población control. La diferencia es significativa ($p=0,019$), así que confirmamos que tener familiares directos con cáncer se puede considerar un factor de riesgo de padecer cáncer de tiroides. Varios autores aceptan que la historia familiar es el segundo riesgo más conocido para desarrollar esta enfermedad. Alrededor del 5% de los pacientes que desarrollan cáncer papilar y el 20-25% de los que desarrollan cáncer medular tienen un familiar que lo ha padecido (Patocs *et al.*, 2003; Robledo *et al.*, 2003).

La categorización de los casos según la variante histológica del carcinoma se realizó considerando 217 pacientes ya que, para 37 de ellos, no se pudo disponer de la clasificación del tumor en el historial clínico. La distribución fue la siguiente: 159 de tipo papilar (75%), 46 del folicular (22%), 4 (2%) de adenoma de Hurthle, 4 mucoepidermoide (2%) y 1 (0,5%) anaplásico (Figura 43). Hay que señalar que esta incidencia coincide con los valores publicados en estudios epidemiológicos recientes (Preston-Martin *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2005).

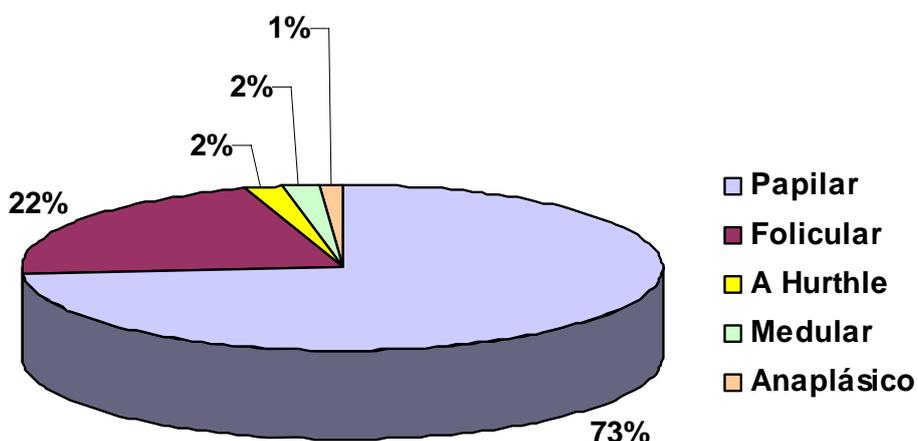


Figura 43: Distribución de cáncer de tiroides

Tabla 15: Descriptiva demográfica de la población en estudio

	Población control (n = 207)			Población cáncer tiroides (n = 251)			p
	n	%	media±E.T.	n	%	media±E.T.	
Edad (años)			41,60 ± 0,89			44,24 ± 0,90	0,17
Grupo 1 ≤ 34 años	54	26,1		54	21,5		0,25
Grupo 2 > 34 ≤ 41	45	21,7		55	21,9		0,96
Grupo 3 > 41 ≤ 51	62	30,0		76	30,3		0,93
Grupo 4 > 51	46	22,2		66	26,3		0,31
≥40	107	51,7		141	56,2		0,34
<40	100	48,3		110	43,8		
Género							<0,01
Mujeres	121	58,5		188	74,9		
Hombres	86	41,5		63	25,1		
Tabaquismo							0,25
No fumadores	100	48,3		142	56,6		
Fumadores	74	35,7		78	31,7		
(cigarrillos/día)			17,20 ± 9,81			18,80 ± 1,69	0,15
Alcohol (g/semana)							
0	91	44,0		164	66,7		
≥ 0 ≤ 60	50	24,2		37	15,0		<0,01
> 60 ≤ 160	50	24,2		30	12,2		<0,01
≥160	16	7,70		15	6,10		0,87
			91,70 ± 8,00			103,64 ± 12,6	0,03
Café (tazas/día)	162	78,3	2,40 ± 0,09	175	71,4	2,22 ± 0,09	0,1
Té (tazas/día)	22	10,6	1,41 ± 0,79	15	6,10	1,80 ± 0,29	0,09
Antecedentes familiares de cáncer	122	58,9		180	71,7		<0,01

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

4.2 Genotipos de genes del mecanismo BER

4.2.1 Polimorfismos de *XRCC1*

Polimorfismo *Arg399Gln*

En la Tabla 16 se presentan las frecuencias genotípicas y alélicas, así como los efectos de los genotipos de *Arg399Gln* sobre el riesgo de cáncer en las poblaciones en estudio. El genotipo *Arg/Arg* tiene una frecuencia en la población total de 0,44, el *Arg/Gln* de 0,43 y el *Gln/Gln* de 0,13, valores que concuerdan con los encontrados en anteriores estudios (Hu *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 2001; Duell *et al.*, 2002; Sanyal *et al.*, 2004). No hallamos diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas por el equilibrio de Hardy Weinberg, ni en controles ni en pacientes ($p = 0,36$ y $p=0,59$, respectivamente).

Tabla 16: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de *Arg399Gln* con cáncer de tiroides.

<i>XRCC1 Arg399Gln G28152A</i>						
	Pobl. Gral.		C		P	
	N.	Frec.	N.	Frec.	OR(95%IC)	p
Genotipos	458		207		251	
<i>Arg/Arg</i>	204	(0,44)	91	(0,44)	113	(0,45)
<i>Arg/Gln</i>	196	(0,43)	88	(0,43)	108	(0,43)
<i>Gln/Gln</i>	58	(0,13)	28	(0,13)	30	(0,12)
Modelo de herencia						
<i>Arg/Arg+Arg/Gln</i>			179	(0,87)	211	(0,88)
<i>Gln/Gln</i>			28	(0,13)	30	(0,12)
					0,87(0,50-1,51)	0,62
<i>Arg (G)</i>	604	(0,66)	270	(0,65)	334	(0,67)
<i>Gln (A)</i>	312	(0,34)	144	(0,35)	168	(0,33)
χ^2 p=0,67						
<i>H-W</i> χ^2		p=0,30		p=0,36		p=0,57

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, *H-W* χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

Las frecuencias alélicas tanto para controles (*Arg*=0,65 y *Gln*=0,35) como para los casos (*Arg*=0,67 y *Gln*=0,33) se encuentran en el rango descrito para la población caucásica (0,36 con IC 95% 0,33-0,39 para el alelo variante) (Lunn *et al.*, 1999; Abdel-Rahman *et al.*, 2000; Stern *et al.*, 2001; David-Beabes y London, 2001; Goode *et al.*,

Resultados

2002; Laffon *et al.*, 2004; Vodicka *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2005b). No detectamos diferencias entre las frecuencias alélicas ($p=0,67$).

Cuando en el modelo de regresión se incluyeron las variables edad, hábito de fumar, consumo de té y café los valores de OR no variaron significativamente de las OR crudas. El sexo y el consumo de alcohol, si tuvieron una asociación significativa en el modelo, con lo cual las ORs ajustaron para estos factores.

El modelo de herencia de mayor ajuste en el estudio de la asociación del polimorfismo *Arg399Gln* con el riesgo de desarrollar cáncer tiroideo fue el recesivo, por lo que, en la Tabla 16, se indican los valores de ORs para el modelo codominante y el recesivo.

Los valores de ORs de 0,86, con IC 95% (0,48-1,54) y de 0,87(0,50-1,51) hallados para individuos portadores del genotipo *399Gln* en relación con los que tienen el genotipo homocigoto *399Arg* y heterocigoto *Arg/Gln*, indican una ligera disminución del riesgo, pero las diferencias ($p=0,79$ y $p=0,62$) no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los dos casos.

Al subdividir la población con cáncer, según el carácter histopatológico del tumor, en medular y folicular (por ser los más frecuentes) y realizar el análisis de regresión logística, tampoco hallamos diferencias significativas en la distribución de los genotipos entre el grupo control y los grupos de pacientes; no obstante, el genotipo mutante parece incrementar con preferencia el desarrollo de la variante papilar (Tabla 17).

Tabla 17: Asociación de *Arg399Gln* con cáncer de tiroides estratificado por tipo de cáncer.

<i>XRCC1Arg399Gln</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular		
	C	P	OR(95%IC)	p	P	OR(95%IC)	p
	207	159			46		
<i>Arg/Arg</i>	91	65	Ref	1	21	Ref.	1
<i>Arg/Gln</i>	88	74	1,19(0,76-1,87)	0,44	20	1,01(0,54-2,17)	0,95
<i>Gln/Gln</i>	28	20	1,03(0,53-2,02)	0,88	5	0,75(0,29-2,60)	0,61
Modelo de herencia							
<i>Arg/Arg+Arg/Gln</i>	179	139	Ref		41		
<i>Gln/Gln</i>	28	20	1,38(0,78-2,41)	0,25	5	0,78(0,28-2,14)	0,62

C: controles, P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

En consideración de la prevalencia del sexo femenino en este tipo de localización tumoral, estratificamos la población por género para hacer el estudio de la asociación de los genotipos con el riesgo (Tabla 18).

Tabla 18: Estudio de asociación de *Arg399Gln* con cáncer de tiroides estratificado por género.

<i>XRCC1 Arg399Gln</i> G28152A								
	<i>Mujeres</i>		OR(95%IC)	p	<i>Hombres</i>		OR(95%IC)	p
	<i>C</i>	<i>P</i>			<i>C</i>	<i>P</i>		
Genotipos								
<i>Arg/Arg</i>	59	81	Ref.		32	29	Ref.	1
<i>Arg/Gln</i>	47	83	1,27(0,77-2,10)	0,33	41	24	0,64(0,31-1,31)	0,23
<i>Gln/Gln</i>	15	20	0,94(0,44-2,00)	0,87	13	9	0,76(0,28-2,05)	0,59

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$), C: controles, P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Al igual que en la población total, no apreciamos diferencias significativas en la distribución de los genotipos en ninguno de los dos sexos, aunque la sustitución se asoció a un modesto efecto protector. También analizamos la interacción sexo-genotipo de riesgo y detectamos que las mujeres con el alelo *Arg* tuvieron 1,81 (OR, 1,81(1,16-2,86), $p < 0,05$) veces más riesgo que los hombres con igual genotipo.

Polimorfismo *Arg280His*

La Tabla 19 muestra la distribución de los genotipos de *Arg280His* de *XRCC1* en la población general y subdividida en población con cáncer de tiroides y población control.

En la población total la frecuencia del genotipo *Arg/Arg* es de 0,84, la de *Arg/His* de 0,15 y 0,01 la que le corresponde a los homocigotos con la variante *His/His*. Estos valores concuerdan con los encontrados en anteriores estudios (Ratnasinghe *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 2001; Duell *et al.*, 2002; Goode *et al.*, 2002; Ladiges *et al.*, 2003; Misra *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2005b; Skjelbred *et al.*, 2006). No encontramos ningún individuo control con el genotipo homocigoto variante *His/His*. Las frecuencias genotípicas observadas en controles y pacientes fueron congruentes con las esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=1$ y $p=0,73$, respectivamente).

Tabla 19: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de *Arg280His* con cáncer de tiroides.

<i>XRCC1 Arg280His</i> G27466A								
	Pobl. Gral.		C		P		OR(95%IC)	p
	N.	Frec.	N.	Frec.	N.	Frec.		
Genotipo	455		207		248			
<i>Arg/Arg</i>	383	(0,84)	183	(0,88)	200	(0,80)	Ref.	1
<i>Arg/His</i>	69	(0,15)	24	(0,12)	45	(0,18)	1,50(0,87-2,60)	0,06
<i>His/His</i>	3	(0,01)	0	(0)	3	(0,01)	-	
Modelo de herencia								
<i>Aditivo</i>							Ref. 1,66(0,99-2,78)	0,05
<i>Arg (G)</i>	835	(0,92)	390	(0,94)	445	(0,90)		
<i>His (A)</i>	75	(0,08)	24	(0,06)	51	(0,10)	χ^2 P= 0,01	
<i>H-W χ^2</i>	p=1		p=1		p=0,73			

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles, P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: Número, H-W χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

La frecuencia del alelo *280His* en los controles fue de 0,06, valor que se encuentra en el rango descrito para el alelo variante en la población caucásica (0,05 con IC 95% 0,00-0,1) (Lunn *et al.*, 1999; David-Beabes y London, 2001; Stern *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2002; Ladiges *et al.*, 2003; Misra *et al.*, 2003). Los pacientes presentaron una frecuencia de 0,1 para este alelo, lo que hace que se detectaran diferencias entre las frecuencias alélicas para ambos grupos ($p= 0,01$) (Tabla 19).

El modelo de herencia que más se ajustó fue el aditivo por lo que presentamos los resultados de ORs para este modelo y el codominante. Encontramos que el genotipo heterocigoto *Arg/His* se asoció con un incremento de riesgo para el cáncer de tiroides (OR, 1,66; IC 0,99-2,78). Los únicos tres individuos portadores del genotipo variante homocigoto *His/His* en este estudio se encuentran en el grupo con cáncer. En los controles no encontramos este genotipo, por lo que la respectiva OR no pudo ser calculada.

Por el tamaño muestral de este estudio se pueden detectar OR de 2 a 4 para los portadores del alelo raro *His*, así que, si la verdadera OR es algo inferior, no sorprende que nuestros resultados sólo tengan significación estadística marginal (Hattersley y McCarthy, 2005)

Tabla 20: Asociación de *Arg280His* con cáncer de tiroides, estratificado por tipo de cáncer.

<i>XRCC1Arg280His</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular		
	C	P	OR(95%IC)	p	P	OR(95%IC)	p
	207	159			46		
<i>Arg/Arg</i>	183	125	Ref.	1	41	Ref.	1
<i>Arg/His</i>	24	31	1,76(0,97-3,19)	0,06	5	0,82(0,28-2,34)	0,71
<i>His/His</i>	0	3			0		
Modelo de herencia							
<i>Aditivo</i>			Ref. 1,86(1,04-3,35)	0,04		Ref. 0,95(0,35-2,55)	0,93

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Al analizar mediante regresión logística las variantes de cáncer más frecuentes, encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución de genotipos y una OR de 1,86 con IC de 1,04-3,35 en el caso de los pacientes con genotipo heterocigoto y cáncer papilar. El genotipo homocigoto mutante sólo se presentó en pacientes que desarrollaron cáncer papilar. No es de extrañar esta observación si consideramos el franco predominio que tiene esta variante histológica de carcinoma tiroideo (Blanco *et al.*, 2005). Con lo cual, podemos decir que los portadores del alelo con la sustitución son más susceptibles a padecer cáncer de tiroides papilar.

Tabla 21: Estudio de asociación de *Arg280His* con cáncer de tiroides, estratificado por género.

	<i>XRCC1 Arg280His</i> G27466A							
	<i>Mujeres</i>		OR(95%IC)	p	<i>Hombres</i>		OR(95%IC)	p
C	P	C			P			
Genotipos								
<i>Arg/Arg</i>	104	141	Ref.	79	55	Ref.		
<i>Arg/His</i>	17	37	1,57(0,83-2,97)	0,16	7	7	1,34(0,44-4,08)	0,60
<i>His/His</i>	0	3	--		0	0	--	

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Como se observa en la Tabla 21, ningún genotipo se asoció al riesgo ni en mujeres ni hombres. No obstante ser las ORs para el genotipo heterocigoto *Arg/His* muy similares en ambos sexos el valor de p fue inferior en mujeres; también es de significar

que los únicos tres individuos que presentaron el genotipo homocigoto variante *His/His* fueron mujeres. Las mujeres con el genotipo de riesgo tuvieron 2,04 veces más susceptibilidad al cáncer (2,04(0,60-6,66) que los hombres con igual genotipo, aunque la diferencia no fue significativa ($p=0,17$).

Polimorfismo *Arg194Trp*

La distribución de los genotipos y las frecuencias de SNP del codón 194, en la población total y separada en controles y casos, se resumen en la Tabla 22, donde apreciamos unas frecuencias del genotipo *Arg/Arg* de 0,92 y 0,96, y del genotipo *Arg/Trp* de 0,08 y 0,04, para controles y casos, respectivamente. Estas frecuencias se hallan dentro del intervalo referido en estudios para la población caucásica (Lunn *et al.*, 1999; Sturgis *et al.*, 1999; Abdel-Rahman y El-Zein, 2000; David-Beabes y London, 2001; Ratnasinghe *et al.*, Stern *et al.*, 2001; 2001; Goode *et al.*, 2002; Ladiges *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Laffon *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2005 a,b). Las frecuencias genotípicas están en equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los grupos.

Tabla 22: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de *Arg194Trp* con cáncer de tiroides.

<i>XRCC1 Arg194Trp C26304T</i>								
	Pobl. Gral		C		P		OR(95%IC)	p
	N.	Frec.	N.	Frec.	N.	Frec.		
Genotipos	455		207		248			
<i>Arg/Arg</i>	429	(0,94)	190	(0,92)	234	(0,96)	Ref.	1
<i>Arg/Trp</i>	26	(0,06)	17	(0,08)	9	(0,04)	0,44(0,19-1,02)	0,05
<i>Trp/Trp</i>	0	(0)	0	(0)	0	(0)	-	
<i>Arg (C)</i>	884	(0,97)	397	(0,96)	487	(0,98)		
<i>Trp (T)</i>	26	(0,03)	17	(0,04)	9	(0,02)	$\chi^2 p=$ 0,03	
<i>H-W χ^2</i>	p=1		p=1		p=1			

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: Número, *H-W χ^2* : equilibrio de Hardy-Weinberg.

El alelo variante *194Trp* presentó frecuencias de 0,04 para los controles y 0,02 para los pacientes, estando ambos valores incluidos dentro del rango descrito para individuos caucásicos (IC 95%, 0,04-0,08) (Butkiewicz *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2002;

Hung *et al.*, 2005a). Dichas frecuencias difieren significativamente ($p=0,03$). No encontramos individuos portadores del genotipo homocigoto variante *Trp/Trp* en ninguno de los grupos; sin embargo, la proporción de individuos homocigotos *Arg/Arg* es mayor en pacientes que en controles (96,3 vs 91,8 %) con OR de 2,3(0,98-5,37) y $p=0,05$, lo que sugiere un efecto protector para los genotipos con la sustitución.

Con las condiciones de este estudio, se pueden detectar OR de 2 a 4 para los portadores del alelo raro *Trp*, así que, si la verdadera OR es algo inferior, no sorprende que nuestros resultados sólo tengan significación estadística marginal (Hattersley y McCarthy, 2005). No pudimos tampoco distinguir cuando el fenotipo es dominante o recesivo, ya que nuestras estimaciones de OR para homocigocidad pierden precisión debido a la baja frecuencia de este alelo.

Tabla 23: Asociación de *Arg194Trp* con cáncer de tiroides, estratificado por tipo de cáncer.

<i>XRCC1 Arg194Trp</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular		
	C	P	OR(95%IC)	p	P	OR(95%IC)	p
	207	156			46		
<i>Arg/Arg</i>	190	149	Ref.	1	45	Ref.	1
<i>Arg/Trp</i>	17	7	0,59(0,25-1,41)	0,24	1	0,23(0,03-1,83)	0,17
<i>Trp/Trp</i>	0	0			0		

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

El análisis de regresión aplicado a la población con cáncer papilar y folicular indica que el genotipo homocigoto sin el cambio está más representado en los pacientes, independientemente del tipo de cáncer, pero las diferencias en la distribución de genotipos entre controles y pacientes afectados por una u otra variante no son significativas (Tabla 23).

La distribución de genotipos no varió entre pacientes y controles de uno u otro sexo; aunque, en las mujeres el genotipo *Arg/Trp* tiene una OR con valor de p más bajo que el de los hombres (0,09 vs 0,58). Asimismo, las mujeres con el genotipo de riesgo, con OR de 1,85(1,20-2,86), fueron significativamente más susceptibles a desarrollar el cáncer que los hombres portadores de este genotipo ($p<0,05$).

Tabla 24: Estudio de asociación de *Arg194Trp* con cáncer de tiroides estratificado por género.

<i>XRCC1 Arg194Trp</i>								
	<i>Mujeres</i>		OR(95%IC)	p	<i>Hombres</i>		OR(95%IC)	p
	<i>C</i>	<i>P</i>			<i>C</i>	<i>P</i>		
Genotipos								
<i>Arg/Arg</i>	110	175	Ref.		80	59	Ref.	
<i>Arg/Trp</i>	11	6	0,36(0,12-1,01)	0,09	6	3	0,67(0,16-2,81)	0,58
<i>Trp/Trp</i>	0	0	--		0	0	--	

C: controles. *P*: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

4.2.1.1 Análisis de haplotipos de *XRCC1*

El análisis de haplotipos que se muestra en la Tabla 25 revela que de las 8 combinaciones (2^n , $n=3$; n =número de polimorfismos) de alelos posibles sólo se observan 6. De hecho, 2 haplotipos acumulan una frecuencia del 87%. Los haplotipos raros se agrupan en una categoría y el punto de corte para definirlos depende del tamaño de la muestra. En nuestro caso, con 458 individuos, limitamos el análisis a los haplotipos con frecuencia superior al 1%. Considerando el haplotipo más frecuente (*399Arg-280Arg-194Arg*), como el de referencia, observamos que tanto el haplotipo 5 (*399Gln-280His-194Arg*) como el 3 (*399Arg-280His-194Arg*) estaban más representados en los pacientes que en los controles, con valores de ORs de 2,98 (0,97-9,17) y 1,75 (0,97-3,15), respectivamente, y diferencias cercanas a la significación ($p=0,06$). Sin embargo, si estos haplotipos se comparan con el haplotipo 6, que combina los alelos de menor riesgo de cada polimorfismo *399Gln-280Arg-194Trp*, se obtienen valores ORs de 10,5(1,49-73,67) y 6,0(1,10-32,75) con p asociadas de 0,02 y 0,04, respectivamente. Este haplotipo 6 respecto al más frecuente tuvo el menor valor de OR 0,28(0,05-1,41).

El haplotipo *399Arg-280Arg-194Trp* con una frecuencia aproximada del 2% también muestra una relación inversa, no significativa ($p=0,20$), con el riesgo de cáncer (OR 0,51 con IC 0,18-1,42;) y sólo difiere del haplotipo más frecuente por la presencia del alelo variante del codón 194.

Tabla 25: Frecuencias haplotípicas de *XRCC1* y asociación con el cáncer de tiroides.

<i>XRCC1</i>						
Haplo.	<i>Arg399Gln</i> G 28112A	<i>Arg280His</i> G27466A	<i>Arg194Trp</i> C26304T	Frec.	OR(95%IC)	p
1	Arg	Arg	Arg	0,57	Ref.	--
2	Gln	Arg	Arg	0,31	1,04(0,78-1,40)	0,76
3	Arg	His	Arg	0,07	1,75(0,97-3,15)	0,06
4	Arg	Arg	Trp	0,02	0,51(0,18-1,42)	0,20
5	Gln	His	Arg	0,01	2,98 (0,97-9,17)	0,06
6	Gln	Arg	Trp	0,01	0,28(0,05-1,41)	0,13

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

4.2.2 Polimorfismo de *OGG1*

En la Tabla 26 se resume la estadística descriptiva y el estudio de asociación para el SNP *Ser326Cys* de *OGG1*. La distribución de genotipos (*Ser/Ser*:*Ser/Cys*:*Cys/Cys*) en nuestra población control (0,62:0,32:0,05) no difirió de la encontrada en algunos estudios previos caso-control en poblaciones caucásicas (0,56:0,40:0,04) (Hardie *et al.*, 2000; Wikman *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 2003, 2004; Park *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2005 a,b). El genotipo *Ser/Ser* fue el más prevalente, a diferencia de lo que sucede con las poblaciones asiáticas, donde el genotipo más frecuente es *Cys/Cys* (Le Marchand *et al.*, 2002; Sunaga *et al.*, 2002; Takezaki *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Niwa *et al.*, 2005).

Las frecuencias genotípicas de este polimorfismo en la población control se ajustaron a las del equilibrio Hardy-Weinberg ($p=0,55$), no siendo así en la población general y en la de cáncer ($p=0,008$ y $p=0,001$). La frecuencia del alelo variante *326Cys* en los controles fue de 0,21, valor incluido en el rango citado para este alelo en poblaciones caucásicas (0,21-0,45) (Wikman *et al.*, 2000; Goode *et al.*, 2002; Le Marchand *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2003, 2004; Mateuca *et al.*, 2005), mientras que la frecuencia para los pacientes fue de 0,19. Entre las frecuencias alélicas de ambas poblaciones no se detectaron diferencias significativas ($p=0,34$).

Los genotipos de este polimorfismo no se asociaron al riesgo de padecer cáncer de tiroides, ni al analizar el modelo de herencia codominante ni en el sobredominante. El tipo de relación para este último modelo fue inverso y, con una OR de 0,87(0,47-1,09).

Resultados-

Tabla 26: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de *Ser326Cys* con cáncer de tiroides.

<i>OGG1 Ser326Cys C1245G</i>								
	Pobl. Gral.		C		P		OR(95%IC)	p
	N.	Frec.	N.	Frec.	N.	Frec.		
Genotipos	455		207		248			
<i>Ser/Ser</i>	300	(0,66)	129	(0,62)	171	(0,68)	Ref.	1
<i>Ser/Cys</i>	27	(0,28)	67	(0,32)	60	(0,25)	0,72(0,47-1,10)	0,11
<i>Cys/Cys</i>	28	(0,06)	11	(0,05)	17	(0,07)	1,05(0,46-2,36)	0,69
Modelo de herencia								
<i>Ser/Ser+ Cys/Cys</i>			140		188		Ref.	
<i>Ser/Cys</i>			67		60		0,87(0,47-1,09)	0,12
<i>Ser (C)</i>	727	(0,80)	325	(0,79)	402	(0,81)		
<i>Cys (G)</i>	183	(0,20)	89	(0,21)	94	(0,19)	χ^2 p=0,34	
H-W χ^2	p=0,008		p=0,55		p=0,001			

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: número, H-W χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

El análisis de regresión, estratificado por tipo de tumor, muestra que la distribución de genotipos se diferencia significativamente sólo en los heterocigotos del grupo con cáncer folicular (Tabla 27).

Tabla 27: Asociación de *Ser326Cys* con cáncer de tiroides, estratificado por tipo de cáncer.

<i>OGG1 Ser326Cys</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular		
	C	P	OR(95%IC)	p	P	OR(95%IC)	p
	207	156			46		
<i>Ser/Ser</i>	129	102	Ref.	1	36	Ref.	1
<i>Ser/Cys</i>	67	42	0,82(0,51-1,31)	0,11	8	0,43(0,18-1,0)	0,05
<i>Cys/Cys</i>	11	12	1,39(0,58-3,32)	0,69	2	0,66(0,13-3,27)	0,61

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Cuando la población se estratificó en cuanto al género (Tabla 28), no se detectaron diferencias en la distribución de genotipos entre hombres y mujeres. Ningún genotipo, ni en uno ni otro sexo, se asoció significativamente con el riesgo. Ser mujer portadora del genotipo *Ser/Cys* mostró una OR de 1,28 (0,61-2,70) con una $p=0,93$, lo que significa que no hay una susceptibilidad significativa de un sexo respecto a otro.

Tabla 28: Estudio de asociación de *Ser326Cys* con cáncer de tiroides, estratificado por género.

<i>OGG1 Ser326Cys</i>								
Genotipos	Mujeres		OR(95%CI)	p	Hombres		OR(95%CI)	p
	C	P			C	P		
<i>Ser/Ser</i>	78	127	Ref.		51	39	Ref.	
<i>Ser/Cys</i>	38	40	0,62(0,36-1,06)	0,08	29	20	0,89(0,44-1,82)	0,76
<i>Cys/Cys</i>	5	14	1,41(0,48-4,13)	0,52	6	3	0,58(0,13-2,52)	0,47

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

4.3 Genotipos de genes de reparación por recombinación homóloga

4.3.1 Polimorfismo de *XRCC2*

La estadística descriptiva, así como los resultados del equilibrio de H-W y del estudio de asociación de *Arg188His*, se indican en la Tabla 29.

La distribución de genotipos en controles y casos están en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,48$ y $0,09$). Las frecuencias genotípicas concuerdan con los encontrados en otras evaluaciones de la asociación de este polimorfismo con el cáncer (Kuschel *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004 a,b,c; Hankinson *et al.*, 2004; Tranah *et al.*, 2004).

Asimismo, las frecuencias alélicas para el alelo variante *188His* en ambos grupos se incluyen en el rango establecido para poblaciones caucásicas (0,8-0,16) (Kuschel *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004 a,b, y c; Tranah *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006) y no difieren entre sí ($p=0,33$). Apreciamos un incremento del riesgo, con significación estadística, para los homocigotos sin el cambio *Arg/Arg*, tanto en el modelo de herencia codominante (OR 8,74(1,02-74,83)) como recesiva, (8,81 (1,03-75,23)), con p asociadas de 0,05 y 0,02, respectivamente. Esta asociación no es detectable cuando se analiza la población con cáncer en sus variantes papilar y folicular (Tabla 30).

Resultados-

Tabla 29: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de *Arg188His* con cáncer de tiroides.

<i>XRCC2 Arg188His</i> G31479A								
	Pobl. Gral.		C		P		OR(95%IC)	p
	N.	Frec.	N.	Frec.	N.	Frec.		
Genotipo	455		207		248			
<i>Arg/Arg</i>	362	(0,80)	163	(0,79)	199	(0,80)	Ref.	
<i>Arg/His</i>	86	(0,19)	38	(0,18)	48	(0,19)	1,04(0,64-1,70)	0,87
<i>His/His</i>	7	(0,02)	6	(0,03)	1	(0,00)	0,11(0,01-0,98)	0,05
Modelo de herencia								
<i>Arg/Arg+Arg/His</i>			201	(0,97)	247	(0,99)	Ref.	
<i>His/His</i>			6	(0,03)	1	(0,01)	0,11 (0,01-0,97)	0,02
<i>Arg (G)</i>	810	(0,89)	364	(0,88)	446	(0,90)		
<i>His (A)</i>	100	(0,11)	50	(0,12)	50	(0,10)	χ^2 p= 0,33	
<i>H-W χ^2</i>	p=0,47		p=0,48		p=0,09			

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: número, H-W χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 30: Asociación de *Arg188His* con cáncer de tiroides estratificado, por tipo de cáncer.

<i>XRCC2 Arg188His</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular		
	C	P	OR(95%IC)	p	P	OR(95%IC)	p
	207	157			45		
<i>Arg/Arg</i>	163	128	Ref.	1	36	Ref.	1
<i>Arg/His</i>	38	28	0,98(0,56-1,70)	0,95	9	1,09(0,47-2,49)	0,84
<i>His/His</i>	6	1	0,17(0,02-1,53)	0,12	0		

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

El análisis estratificado por género puso de relieve que ningún genotipo se asoció al riesgo con significación estadística, ni en hombres ni mujeres; sin embargo, las mujeres portadores del alelo de riesgo *Arg* en una o dos copias tuvieron significativamente más riesgo que los hombres, con un valor de OR de 1,81(1,19-2,77), y $p < 0,05$ (Tabla 31).

Tabla 31: Estudio de asociación de *Arg188His* con cáncer de tiroides, estratificado por género.

<i>XRCC2 Arg188His</i>								
	<i>Mujeres</i>		OR(95%IC)	p	<i>Hombres</i>		OR(95%IC)	p
	<i>C</i>	<i>P</i>			<i>C</i>	<i>P</i>		
Genotipos								
<i>Arg/Arg</i>	98	147	Ref.		65	49	Ref.	
<i>Arg/His</i>	19	34	1,13(0,60-2,11)	0,70	19	12	0,86(0,38-1,95)	0,73
<i>His/His</i>	4	1	0,14(0,01-1,24)	0,09	2	0	--	

C: controles, P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

4.3.2 Polimorfismos de *XRCC3*

Polimorfismo *Thr241Met*

En la Tabla 32 se presentan las frecuencias alélicas, genotípicas y los análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg y de asociación para el polimorfismo *Thr241Met* de *XRCC3*.

La distribución de los genotipos en los controles es muy similar a la observada en estudios de asociación de este polimorfismo en poblaciones caucásicas (David Beabes *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004 a,b,c; Sanyal *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2004; Tranah *et al.*, 2004; Skjelbred *et al.*, 2006). En ambos grupos la distribución de los genotipos concordó con lo esperado según el equilibrio H-W, observándose valores de p de 0,75 y 0,89 para controles y casos, respectivamente.

Los controles tuvieron una frecuencia para el alelo variante *241Met* de 0,32, y los casos de 0,38; entre las mismas no hubo diferencias estadísticas ($p=0,07$). Tanto sus frecuencias alélicas, como la del genotipo homocigoto variante (0,11) coinciden con los valores publicados para otros controles caucásicos (0,38 y 0,14, respectivamente (David-Beabes *et al.*, 2001; Matullo *et al.*, 2001 a,b; 2005 Duan *et al.*, 2002; Stern *et al.*, 2002; Misra *et al.*, 2003; Bertram *et al.*, 2004). Aunque hubo un modesto incremento de la OR para los genotipos heterocigotos *Thr/Met* (1,32(0,88-1,98)) y homocigotos *Met/Met* (1,55(0,84-2,87)), ninguna de las asociaciones alcanzó significación estadística.

Tabla 32: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de *Thr241Met* con cáncer de tiroides.

<i>XRCC3 Thr241Met C18067T</i>								
	Pobl. Gral.		C		P		OR(95%IC)	p
	N.	Frec.	N.	Frec.	N.	Frec.		
Genotipo	455		207		248			
<i>Thr/Thr</i>	190	(0,42)	96	(0,46)	94	(0,38)	Ref.	
<i>Thr/Met</i>	207	(0,45)	88	(0,43)	119	(0,48)	1,32(0,88-1,98)	0,25
<i>Met/Met</i>	58	(0,13)	23	(0,11)	35	(0,14)	1,55(0,84-2,87)	0,19
Modelo de herencia								
<i>Aditivo</i>							1,27(0,95-1,68)	0,10
<i>Thr (C)</i>	587	(0,65)	280	(0,68)	307	(0,62)		
<i>Met (T)</i>	323	(0,35)	134	(0,32)	189	(0,38)	χ^2 P= 0,07	
<i>H-W χ^2</i>	p=0,92		p=0,75		p=0,89			

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: número, H-W χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

El tipo papilar es la variante de cáncer diferenciado que se desarrolló con más frecuencia en portadores del genotipo variante, pero el carácter de esta incidencia no alcanzó significación estadística (Tabla 33).

Tabla 33: Asociación de *Thr241Met* con cáncer de tiroides estratificado, por tipo de cáncer.

<i>XRCC3 Thr241Met</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular			
	C	P	OR(95%IC)	p	P	OR(95%IC)	p	
	207	156			45			
<i>Thr/Thr</i>	96	60	Ref	1	17	Ref.	1	
<i>Thr/Met</i>	88	73	1,29(0,82-3,10)	0,95	25	1,47(0,73-2,94)	0,28	
<i>Met/Met</i>	23	23	1,54(0,78-3,00)	0,12	4	0,88(0,26-2,94)	0,83	

C: controles, P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Finalmente, tampoco se detectaron diferencias en la distribución de los genotipos en ninguno de los sexos, aunque el genotipo con el alelo variante se presentó con más frecuencia en los pacientes de ambos sexos (Tabla 34).

Tabla 34: Estudio de asociación de *Thr241Met* con cáncer de tiroides, estratificado por género.

<i>XRCC3 Thr241Met</i>								
	<i>Mujeres</i>		OR(95%IC)	p	<i>Hombres</i>		OR(95%IC)	p
	C	P			C	P		
Genotipos								
<i>Thr/Thr</i>	52	67	Ref.		44	24	Ref.	
<i>Thr/Met</i>	56	86	1,15(0,69-1,90)	0,58	32	31	1,72(0,85-3,49)	0,13
<i>Met/Met</i>	13	28	1,61(0,75-3,45)	0,22	10	7	1,33(0,44-3,98)	0,60

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles, P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Asimismo, detectamos que las mujeres con el genotipo variante muestran 2,38 (OR, 2,38(0,73-7,69), veces más riesgo que los hombres, pero sin que esta diferencia alcance significación estadística ($p=0,27$)

Polimorfismo *IVS5-14*

En la Tabla 35 se presentan las frecuencias genotípicas y alélicas para el SNP *IVS5-14* de *XRCC3* en las poblaciones en estudio. Los genotipos se distribuyen en la población total de la siguiente manera: 0,56 (A/A), 0,38 (A/G) y 0,06 (G/G), y estas frecuencias están en concordancia con lo obtenido en estudios previos (Kuschel *et al.*, 2002; Tranah *et al.*, 2004; Auranen *et al.*, 2005; De Ruyc *et al.*, 2005). Las frecuencias genotípicas en la población total y control son coherentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,71$ y $p=0,22$, respectivamente); sin embargo, en los pacientes se apreció una representación del genotipo variante por debajo de lo esperado según el equilibrio H-W, lo que contribuye a que se detecten valores de $p=0,05$.

La frecuencia del alelo mutante es 0,27 y 0,23 para controles y pacientes, respectivamente; el valor del grupo control concuerda con los citados para la población caucásica ($\sim 0,30$) (Kuschel *et al.*, 2002; Tranah *et al.*, 2004; Auranen *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). No detectamos diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de ambos grupos ($p=0,27$).

Resultados-

Tabla 35: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de *IVS5-14* con cáncer de tiroides.

	<i>XRCC3 IVS5-14</i> A17893G							
	Pobl. Gral.		C		P		OR(95%IC)	p
	N.	Frec.	N.	Frec.	N.	Frec.		
Genotipo	455		207		248			
<i>AA</i>	255	(0,56)	115	(0,55)	140	(0,56)	Ref.	
<i>AG</i>	174	(0,38)	74	(0,36)	100	(0,40)	1,20(0,80-1,79)	0,34
<i>GG</i>	26	(0,06)	18	(0,09)	8	(0,03)	0,46(0,19-1,13)	0,08
Modelo de herencia								
<i>A/A-A/G</i>			189	(0,91)	240	(0,96)	Ref.	
<i>G/G</i>			18	(0,09)	8	(0,03)	0,42(0,18-0,95)	0,05
<i>A</i>	684	(0,75)	304	(0,73)	380	(0,62)		
<i>G (variante)</i>	226	(0,25)	110	(0,27)	116	(0,23)	χ^2 p= 0,27	
<i>H-W χ^2</i>	p=0,71		p=0,22		p=0,05			

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: número, H-W χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

El valor de OR 0,42(0,18-0,95) en el modelo recesivo sugiere un efecto protector de genotipo variante. Este efecto es significativo para los pacientes con tumor papilar (OR 0,33(0,10-1,04)), pero no en los del tipo folicular (Tabla 36).

Tabla 36: Asociación de *IVS5-14* con cáncer de tiroides, estratificado por tipo de cáncer.

<i>XRCC3 IVS5-14</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular			
	C	P	OR(95%IC)	p	P	OR(95%IC)	p	
	207	156			46			
<i>AA</i>	115	83	Ref	1	25	Ref.	1	
<i>AG</i>	74	69	1,39(0,89-2,16)	0,14	19	1,27(0,64-2,53)	0,48	
<i>GG</i>	18	4	0,33(0,10-1,04)	0,05	2	0,53(0,11-2,55)	0,43	

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Al estratificar la población por género no detectamos genotipos con diferencias estadísticas entre pacientes y controles en ninguno de los sexos; aunque, al igual que en el estudio global, el genotipo homocigoto con el cambio *GG* fue menos frecuente en los pacientes. Observamos que ser portador del genotipo *AA* y ser mujer incrementó el riesgo 1,75 veces (OR, 1,75(1,15-2,70), esta interacción fue significativa ($p < 0,05$) (Tabla 37).

Tabla 37: Estudio de asociación de *IVS5-14* con cáncer de tiroides, estratificado por género.

<i>IVS5-14</i>								
	<i>Mujeres</i>		OR(95%IC)	p	<i>Hombres</i>		OR(95%IC)	p
	C	P			C	P		
Genotipos								
AA	73	106	Ref.		49	31	Ref.	
AG	39	69	1,29(0,78-2,14)	0,31	35	29	1,12(0,56-2,20)	0,75
GG	9	6	0,51(0,17-1,54)	0,24	9	2	0,33(0,06-1,69)	0,19

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

4.3.2.1 Análisis de haplotipos de *XRCC3*

En la Tabla 38 se señalan los 4 haplotipos posibles para los polimorfismos de *XRCC3*. Dos haplotipos acumulan una frecuencia del 76%. Si tomamos el haplotipo 1 como referencia, por su mayor frecuencia, observamos que el haplotipo 3 (GC) se asoció con una reducción no significativa del riesgo para el cáncer de tiroides (OR=0,81, 95% IC 0,57–1,16). Este haplotipo contiene el alelo G de *IVS5*, que en el análisis de genotipos, ya ha sido asociado con una reducción del riesgo.

Tabla 38: Frecuencias haplotípicas de *XRCC3* y asociación con el cáncer de tiroides.

<i>XRCC3</i>					
Haplo.	<i>IVS5-14</i> A17893G	<i>Thr241Met</i> C18067T	Frec.	OR(95%IC)	p
1	A	C	0,44	Ref.	
2	A	T	0,32	1,19(0,87-1,62)	0,26
3	G	C	0,24	0,81(0,57-1,16)	0,26
4	G	T	0,05	1,38(0,72-2,66)	0,32

OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Los haplotipos AT y el GT se presentan con más frecuencia en los pacientes que en los controles, con valores de ORs de 1,19(0,87-1,62) y 1,38(0,72-2,66), pero sin que la diferencia alcance significación estadística. Sin embargo, cuando comparamos el haplotipo AT, que incluye los alelos de riesgo de ambos polimorfismos con la combinación GC que constituye el haplotipo de menor riesgo, encontramos incrementos en el valor de OR (3,79(1,35-10,67) que alcanzan valores de significación (p=0,01).

El análisis de ligamiento demostró que *IVS5* y *Thr241Met* están en desequilibrio de ligamiento ($D'=0,92$).

4.4 Genotipos de genes relacionados con la síntesis hormonal del tiroides

4.4.1 Polimorfismos de *TG*

Polimorfismo *Ser734Ala*

En la Tabla 39 se presenta la estadística descriptiva y los resultados del estudio de asociación correspondiente al polimorfismo *Ser734Ala* de *TG*. El genotipo *Ala/Ala* tiene una frecuencia en la población total de 0,20, el *Ser/Ala* de 0,49 y el *Ser/Ser* de 0,31. En el grupo control la distribución es 0,16, 0,49, y 0,35 para estos tres genotipos, lo que concuerda con lo encontrado en otros estudios con poblaciones caucásicas (Ban *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004; Tomer y Greenberg, 2004a,b; HapMap-CEU). No hallamos diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,88$ y $p=0,79$), ni en controles ni en pacientes.

Tabla 39: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de *Ser734Ala* con cáncer de tiroides.

	<i>TG Ser734Ala</i> T2200G						OR(95%IC)	p
	Pobl. Gral.		C		P			
	N.	Frec.	N.	Frec.	N.	Frec.		
Genotipo	442		203		239			
<i>Ser/Ser</i>	136	(0,31)	72	(0,35)	64	(0,27)	Ref.	
<i>Ser/Ala</i>	216	(0,49)	99	(0,49)	117	(0,49)	1,35(0,86-2,10)	
<i>Ala/Ala</i>	90	(0,20)	32	(0,16)	58	(0,24)	2,34(1,32-4,13)	
Modelo de herencia								
<i>Aditivo</i>							1,51(1,14-1,99)	
<i>Ser</i>	488	(0,55)	243	(0,60)	245	(0,51)		
<i>Ala</i>	396	(0,45)	163	(0,40)	233	(0,49)	χ^2 p= 0,01	
<i>H-W</i> χ^2	p=0,85		p=0,88		p=0,79			

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: número, *H-W* χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

La frecuencias alélicas en los controles (*Ala*=0,40 y *Ser*=0,60) están dentro del rango descrito para la población caucásica europea (*Ala* 0,40-0,54) (Hishinuma *et al.*,

1999; Ban *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004; HapMap-CEU). La frecuencia del alelo variante en los pacientes fue mayor (0,49) que en los controles, lo que hace que se detecten diferencias entre las frecuencias alélicas de ambos grupos ($p=0,01$).

La distribución de los genotipos entre pacientes y controles se diferencia significativamente ($p=0,01$) y, tanto en el modelo codominante como en el aditivo, los mayores valores de ORs se detectaron para el genotipo homocigoto con el cambio *Ala/Ala*. Este efecto fue independiente del carácter histológico del carcinoma, ya que este genotipo incrementó la susceptibilidad tanto en la variante folicular con OR de 3,56 (1,35-9,39) y $p=0,01$, como en la papilar con OR de 2,14(1,14-4,03); y $p=0,02$) (Tabla 40).

Tabla 40: Asociación de *Ser734Ala* con cáncer de tiroides, estratificado por tipo de cáncer.

<i>TG Ser734Ala</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular		
	C	P	OR(95%IC)	p	P	OR(95%IC)	p
	203	156			46		
<i>Ser/Ser</i>	72	41	Ref	1	25	Ref.	1
<i>Ser/Ala</i>	99	72	1,29(0,78-2,13)	0,31	19	1,93(0,83-4,51)	0,13
<i>Ala/Ala</i>	32	36	2,14(1,14-4,03)	0,02	2	3,56(1,35-9,39)	0,01

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Al igual que en el estudio global, la distribución de genotipos en ambos sexos revela que la sustitución incrementa los valores de ORs. Pero sólo las mujeres exhiben un incremento con significación estadística, OR de 2,65(1,15-6,09) y p asociada de 0,02.

Tabla 41: Estudio, estratificado por género, de la asociación de *Ser734Ala* con cáncer de tiroides.

Genotipos	<i>Ser734Ala</i>							
	<i>Mujeres</i>		OR(95%IC)	p	<i>Hombres</i>		OR(95%IC)	p
	C	P			C	P		
<i>Ser/Ser</i>	43	46	Ref.		29	17	Ref.	
<i>Ser/Ala</i>	56	89	1,41(0,69-2,90)	0,34	43	24	1,37(0,64-2,94)	0,41
<i>Ala/Ala</i>	18	41	2,65(1,15-6,09)	0,02	14	17	2,18(0,49-3,21)	0,62

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

La interacción del genotipo de riesgo y el sexo tuvo significación estadística con valor p inferior a 0,05, y de OR de 2,06 (1,23-3,45), indicador de que las mujeres con este genotipo están más representadas que los hombres entre los pacientes (Tabla 41).

Polimorfismo Pro778Pro

En la Tabla 42 se muestra la estadística descriptiva y los resultados del equilibrio Hardy-Weinberg y del estudio de asociación del polimorfismo Pro778Pro de TG.

La distribución de genotipos en controles y casos está en equilibrio de Hardy-Weinberg (p=0,12 y 0,69, respectivamente). Las frecuencias genotípicas de la población total coinciden con los encontrados en evaluaciones de este polimorfismo (Ban *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004).

Tabla 42: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de Pro778Pro con cáncer de tiroides.

	TG Pro778Pro T2334C						OR(95%IC)	p
	Pobl. N.	Gral. Frec.	C N.	C Frec.	P No	P Frec.		
Genotipo	437		205		232			
<i>TT</i>	116	(0,27)	64	(0,31)	52	(0,22)	Ref.	
<i>CT</i>	235	(0,54)	111	(0,54)	120	(0,52)	1,46(0,90-2,28)	0,17
<i>CC</i>	86	(0,20)	30	(0,15)	60	(0,26)	2,76(1,74-5,89)	<0,01
Modelo de herencia								
<i>Aditivo</i>							1,64(1,23-2,20)	<0,01
<i>T</i>	463	(0,53)	239	(0,58)	224	(0,48)		
<i>C</i>	411	(0,47)	171	(0,42)	240	(0,52)	χ^2 p< 0,01	
H-W χ^2	p=0,21		p=0,12		p=0,69			

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas (p≤ 0,05), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: número, H-W χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

La frecuencia del alelo variante C es de 0,42 en el grupo control y se corresponde con la referida para poblaciones caucásicas (0,45) (Hishinuma *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2004; Tomer y Greenberg, 2004 a,b; HapMap-CEU), y es significativamente diferente (p<0,01) de la observada en los pacientes (C=0,52). Apreciamos un incremento del riesgo para los homocigotos con el cambio C/C (OR 2,76 1,23-2,20), tanto en el modelo de herencia codominante como aditivo,

OR=1,64(1,23-2,20). Este efecto es detectable cuando se analiza la población con cáncer en sus variantes papilar y folicular, pero se alcanza mayor significación para la primera de las variantes con valores de $p < 0,01$ y OR= 3,10(1,59-6,02) (Tabla 43).

Tabla 43: Asociación de *Pro778Pro* con cáncer de tiroides, estratificado por tipo de cáncer.

<i>TG Pro778Pro</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular		
	C	P	OR(95%CI)	p	P	OR(95%CI)	p
	203	144			42		
<i>TT</i>	64	29	Ref.	1	9	Ref.	1
<i>CT</i>	111	75	1,59(0,93-2,74)	0,08	20	1,43(0,61-3,36)	0,42
<i>CC</i>	30	40	3,10(1,59-6,02)	<0,01	13	3,17(1,20-8,36)	0,02

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Tabla 44: Estudio, estratificado por género, de la asociación de *Pro778Pro* con cáncer de tiroides.

	<i>Pro778Pro</i>							
	<i>Mujeres</i>		OR(95%IC)	p	<i>Hombres</i>		OR(95%IC)	p
	C	P			C	P		
Genotipos								
<i>TT</i>	41	36	Ref.	23	14	Ref.		
<i>CT</i>	60	93	1,82(1,04-2,80)	0,05	51	24	0,83(0,69-3,44)	0,28
<i>CC</i>	20	43	2,65(1,31-5,31)	0,04	10	17	2,88(0,38-3,18)	0,05

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

En la Tabla 44, se presentan los resultados del análisis estratificado por géneros. Se observa que la distribución de genotipos varió más entre pacientes y controles de ambos sexos. El alelo variante C en homo y en heterocigosis rindió valores de ORs de 1,82(1,04-2,80) y 2,65(1,31-5,31) para uno y otro genotipo en mujeres, con diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Los hombres sólo tuvieron incremento de riesgo asociado al genotipo homocigoto variante 2,88(0,38-3,18), $p=0,05$. La interacción del genotipo con el sexo resultó en una OR de 2,40 (1,29-3,56) con p menor de 0,05, lo que permite interpretar que las mujeres con genotipo C/C tienen más riesgo que los hombres con igual genotipo.

Polimorfismo *Met1027Val*

En la Tabla 45 se resume la distribución de los genotipos correspondientes al SNP del codón 1027 de *TG*. En la población general y control ésta se ajusta a lo publicado en la literatura para poblaciones caucásicas (Ban *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004); sin embargo, en los controles la frecuencia del genotipo homocigoto con el cambio es ligeramente inferior a la descrita por Collins y colaboradores para poblaciones inglesas (0,18 vs. 0,22) (Collins *et al.*, 2004). Las frecuencias genotípicas están en equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los grupos.

Tabla 45: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de *Met1027Val* con cáncer de tiroides.

	<i>TG Met1027Val A3082G</i>						OR(95%IC)	p
	Pobl. Gral.		C		P			
	N.	Frec.	N.	Frec.	N.	Frec.		
Genotipo	447		204		243			
<i>Met/Met</i>	131	(0,29)	69	(0,34)	62	(0,26)	Ref.	
<i>Met/Val</i>	223	(0,50)	99	(0,48)	124	(0,51)	1,51(0,96-2,37)	0,07
<i>Val/Val</i>	93	(0,21)	36	(0,18)	57	(0,23)	1,98(1,13-3,48)	0,01
Modelo de herencia								
<i>Aditivo</i>							1,42(1,07-1,87)	0,01
<i>Met</i>	485	(0,54)	237	(0,58)	248	(0,51)		
<i>Val</i> (variante)	409	(0,46)	171	(0,42)	238	(0,49)	χ^2 p= 0,03	
<i>H-W</i> χ^2	p=1		p=1		p=0,8			

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: número, H-W χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para el alelo variante *Val* la frecuencia es de 0,42 en los controles y de 0,49 en los pacientes, valores que concuerdan con los publicados para los europeos, aunque son más bajos que la frecuencia de los caucásicos que residen en Estados Unidos (Hishinuma *et al.*, 1999; Ban *et al.*, 2003; Tomer y Greenberg, 2004 a,b). Hay que tener en cuenta que las frecuencias de los polimorfismos pueden variar no solo entre etnias, sino también entre regiones geográficas (Hishinuma *et al.*, 1999; Marth *et al.*, 2004; HapMap-CEU). Las frecuencias alélicas entre pacientes y controles se diferencian con significación estadística ($p=0,03$). La proporción de individuos homocigotos con el cambio *Val/Val* es mayor en pacientes que en controles (0,23 vs. 0,18) con una OR de

1,98(1,13-3,48) y $p=0,01$, lo que sugiere un incremento del riesgo para el genotipo con el alelo variante.

El análisis de regresión logística aplicado a la población con cáncer papilar y folicular indica que, aunque el genotipo homocigoto con el cambio se mantiene más representado en individuos aquejados de ambos tipos de cáncer, la susceptibilidad sólo es significativa para el cáncer papilar con $OR=1,86(0,99-3,47)$ y p asociada de 0,05 (Tabla 46).

Tabla 46: Asociación de *Met1027Val* con cáncer de tiroides, estratificado por tipo de cáncer.

<i>TG Met1027Val</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular		
	C	P	OR(95%IC)	p	P	OR(95%IC)	p
	203	152			45		
<i>Met/Met</i>	69	39	Ref.	1	10	Ref.	1
<i>Met/Val</i>	99	77	1,47(0,89-2,43)	0,14	24	1,87(0,83-4,21)	0,13
<i>Val/Val</i>	36	36	1,86(0,99-3,47)	0,05	11	2,27(0,87-5,94)	0,10

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Los resultados del análisis de regresión, estratificado por sexos, para este polimorfismo se resumen en la Tabla 47. La distribución de genotipos varió entre pacientes y controles de ambos sexos, pero sólo en las mujeres los genotipos heterocigoto y homocigoto tuvieron ORs de 1,83(1,07-3,15) y 2,43(1,05-5,58) con incrementos significativos de riesgo ($p=0,05$ y 0,04, respectivamente). Se observó que ser del sexo femenino y portar el genotipo *Val/Val* incrementa significativamente el riesgo 2,07 veces ($OR=2,07(1,25-3,40)$) en relación a los hombres con igual genotipo.

Tabla 47: Estudio, estratificado por género, de la asociación de *Met1027Val* con cáncer de tiroides.

Genotipos	<i>Met1027Val</i>							
	Mujeres		OR(95%IC)	p	Hombres		OR(95%IC)	p
	C	P			C	P		
<i>Met/Met</i>	45	44	Ref.		24	16	Ref.	
<i>Met/Val</i>	53	93	1,83(1,07-3,15)	0,05	46	29	0,99(0,60-2,83)	0,49
<i>Val/Val</i>	21	40	2,43(1,05-5,58)	0,04	15	16	1,83(0,69-4,81)	0,22

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Polimorfismo *Arg1980Trp*

Los resultados tabulados del último polimorfismo estudiado del gen *TG* (*Arg1980Trp*) revelan que las frecuencias de los genotipos homocigotos normal, heterocigoto y variante (0,27:0,55:0,19) se ajustan a lo publicado para los caucásicos (0,29:0,47:0,22) (Ban *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004; Tomer y Greenberg, 2004a,b) y es muy diferente a las frecuencias encontradas en los asiáticos (0,05:0,35:0,61) (Ban *et al.*, 2004). Sin embargo, en los controles (0,36:0,46:0,18) la frecuencia de homocigotos sin cambio es mayor a costa de una menor proporción de heterocigotos. En este polimorfismo, las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg en la población control (p=0,56), pero no es así en la población total, ni en los pacientes (0,18:0,62:0,19) como consecuencia de que, en estos últimos, se observa mayor número de heterocigotos que lo esperado (p<0,01).

La frecuencia alélica de 0,46 para el alelo variante *Trp* en la población total es similar a las obtenidas en otros estudios epidemiológicos (Ban *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004; HapMap-CEU); sin embargo, esta frecuencia fue ligeramente más baja en los controles (0,41) lo cual era de suponer por el comentado descenso en el número de heterocigotos. Por el contrario, esta frecuencia fue más alta en los pacientes lo que hace que existan diferencias significativas (p<0,01) entre los grupos.

Tabla 48: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de *Arg1980Trp* con cáncer de tiroides.

	<i>TG Arg1980Trp</i>						OR(95%IC)	p
	Pobl. Gral.		C		P			
	N.	Frec.	N.	Frec.	N.	Frec.		
Genotipo	442		204		238			
<i>Arg/Arg</i>	118	(0,27)	74	(0,36)	44	(0,18)	Ref.	
<i>Arg/Trp</i>	242	(0,55)	94	(0,46)	148	(0,62)	2,44 (1,53-3,88)	<0,01
<i>Trp/Trp</i>	82	(0,19)	36	(0,18)	46	(0,19)	2,10 (1,16-3,80)	0,01
Modelo de herencia								
<i>Arg/Arg</i>			74	(36,3)	44	(8,90)	Ref.	
<i>Arg/Trp+ Trp/Trp</i>			130	(63,7)	189	(81,1)	2,35 (1,50-3,66)	<0,01
<i>Arg</i>	478	(0,54)	242	(0,59)	236	(0,50)		
<i>Trp (Variante)</i>	406	(0,46)	166	(0,41)	240	(0,50)	χ^2 p< 0,01	
<i>H-W</i> χ^2		p<0,01		p=0,56		p<0,01		

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas (p≤ 0,05), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: número, *H-W* χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

En la distribución de los genotipos también apreciamos diferencias de carácter significativo. Los genotipos con el cambio, ya sea en heterocigosis o en homocigosis, estuvo significativamente más representado en los pacientes con cáncer de tiroides con OR de 2,44 (1,53-3,88) y 2,10 (1,16-3,80). El modelo de herencia que se ajustó mejor fue el dominante con OR de 2,35 (1,50-3,66) y valores de p altamente significativos.

Según se aprecia en la Tabla 49, el cambio de base incrementó la susceptibilidad a desarrollar cualquiera de los dos tipos de cáncer diferenciados; pero, en el caso del cáncer folicular, el efecto sólo se detectó en los homocigotos mutantes. Sin embargo, el riesgo para el cáncer papilar fue significativo en cualquiera de los genotipos que al menos tuvieran un alelo con el cambio.

Tabla 49: Asociación de *Arg1980Trp* con cáncer de tiroides, estratificado por tipo de cáncer.

<i>TG Arg1980Trp</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular		
	C	P	OR(95%IC)	p	P	OR(95%IC)	p
	203	148			44		
<i>Arg/Arg</i>	74	28	Ref	1	11	Ref.	1
<i>Arg/Trp</i>	94	95	2,57(1,52-4,36)	<0,01	21	1,34(0,59-3,02)	0,47
<i>Trp/Trp</i>	36	25	2,20(1,10-4,39)	0,02	12	2,35(0,92-6,00)	0,05

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Tabla 50: Estudio estratificado por género, de la asociación de *Arg1980Trp* con cáncer de tiroides.

Genotipos	<i>Arg1980Trp</i>							
	<i>Mujeres</i>		OR(95%IC)	p	<i>Hombres</i>		OR(95%IC)	p
	C	P			C	P		
<i>Arg/Arg</i>	42	31	Ref.		32	13	Ref.	
<i>Arg/Trp</i>	55	113	2,67(1,51-4,74)	<0,01	39	32	1,99(0,89-4,44)	0,09
<i>Trp/Trp</i>	21	32	2,10(1,01-4,36)	0,04	15	12	2,05(0,75-5,60)	0,15

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

El estudio estratificado por género muestra que la distribución de genotipos varió entre controles y pacientes en ambos sexos. Sólo en las mujeres, los valores de OR de 2,67(1,51-4,74) y 2,10(1,01-4,36), en heterocigotos y homocigotos con el cambio, se

asociaron a p significativas (<0,01 y de 0,04, respectivamente). La asociación del sexo con el riesgo fue significativa; así, una OR de 2,00(1,21-3,32) y p inferior a 0,05 explica el predominio de mujeres con el genotipo de riesgo entre los pacientes (Tabla 50).

4.4.1.1 Análisis de haplotipos de TG

En la Tabla 51 se muestra que de las 16 combinaciones (2^n , n=4; n=número de polimorfismos) de alelos posibles sólo se observan 11. Los cuatro primeros haplotipos acumulan una frecuencia del 86%. Los haplotipos raros (con frecuencia inferior al 1%.) se agruparon en una categoría. Al comparar respecto al haplotipo 1, que es el más frecuente, observamos que existen diferencias con significación estadística para los haplotipos 2, 3, 4 y 9. Dichas combinaciones están más representadas en los pacientes que en los controles. El haplotipo 4 con valor de OR de 3,03 (1,82-5,02) es el que tiene la p asociada de menor valor (0,0001), y es el que incluye los 4 alelos variantes.

Tabla 51: Frecuencias haplotípicas de TG y asociación con el cáncer de tiroides.

TG							
Hapl.	Ser734Ala (T/G)	Pro778Pro (T/C)	Met1027Val (A/G)	Arg1980Trp (C/T)	Frec.	OR(95%IC)	p
1	T	T	A	C	0,24	Ref.	--
2	T	T	A	T	0,23	2,10(1,21-3,63)	0,008
3	G	C	G	C	0,22	2,27(1,31-3,96)	0,004
4	G	C	G	T	0,17	3,03(1,82-5,02)	0,000
5	T	C	A	C	0,03	2,29(0,83-6,27)	0,11
6	T	C	G	C	0,02	0,82(0,27-2,54)	0,74
7	T	T	G	T	0,02	2,15(0,98-4,732)	0,09
8	G	T	A	T	0,02	1,89(0,86-4,128)	0,12
9	T	C	A	T	0,01	8,38(1,28-54,6)	0,03
10	G	T	G	T	0,01	5,99(0,58-61,7)	0,13
11	G	C	A	C	0,01	2,20(0,50-8,30)	0,25
raros					0,02	2,44(0,61-9,69)	0,21

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

El haplotipo 3 con una OR=2,27(1,31-3,96) y un valor de p de 0,004 se diferencia significativamente del de referencia por presentar los alelos variantes de los SNPs de los exones 10 y 12. Le sigue en valor de OR y significación el haplotipo 2 (2,10(1,21-3,63); p=0,008), el cual sólo varía respecto al 1 por la presencia del alelo

variante del exón 33. Por último, el haplotipo 9, que también está más representado en los pacientes con significación estadística, se distingue por presentar tanto el alelo variante de *Arg1980Trp* del exón 33, como el del *Pro778Pro* del exón 10. Los alelos mutados de los otros polimorfismos cuando se combinaron con el del exón 33 también incrementaron las ORs (haplotipos 7 y 8).

El análisis de ligamiento dió por resultado que los dos polimorfismos del exón 10 están en desequilibrio con un valor de $D' = 0,82$ y que estos a su vez están ligados con el SNP del exón 12. Así, *Pro778Pro* lo está con un valor de $D' = 0,81$ y *Ser734Ala* con una $D' = 0,86$.

4.4.2. Polimorfismos de *TSHR*

Polimorfismo *Pro52Thr*

En la Tabla 52 se presentan las frecuencias genotípicas y alélicas para el SNP *Pro52Thr* de *TSHR* en las poblaciones estudiadas. Los genotipos se distribuyen en la población total de la siguiente manera: 0,92 (*Pro/Pro*), 0,06 (*Pro/Thr*) y 0,02 (*Thr/Thr*), y estos valores están en concordancia con lo observado en otros estudios (Kaczur *et al.*, 2000; Chou *et al.*, 2002; Peeters *et al.*, 2003; Matakidou *et al.*, 2004). Sin embargo, detectamos menos heterocigotos que los encontrados por Chistiakov *et al.* en la población moscovita (Chistiakov *et al.*, 2000). En los controles, las frecuencias genotípicas se ajustaron a lo esperado en el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,26$), no siendo así en la población total y en la población con cáncer, donde se observan valores de p inferiores a 0,01, en ambos casos. Este desequilibrio en los pacientes se debió a una representación superior a lo esperado del genotipo con el alelo variante.

La frecuencia del alelo mutante *Thr* es de 0,04 y 0,05 para controles y pacientes, respectivamente, y estos valores coinciden con los hallados en otros estudios sobre este SNP (Simanainen, *et al.*, 1999; Kaczur *et al.*, 2000; Chou *et al.*, 2002; Peeters *et al.*, 2003; Matakidou *et al.*, 2004), sin que se detecten diferencias significativas entre las frecuencias alélicas ($p = 0,34$).

Se aprecian incrementos en el valor de las ORs para el genotipo homocigoto para el cambio, tanto en el modelo codominante 4,10(0,48-34,59) como en el recesivo 4,14(0,49-35,10), pero sin alcanzar significación estadística. Igual efecto sin significación se observó para los individuos con cáncer papilar; en cambio, no se

Resultados

detectó ningún individuo con este genotipo en los aquejados de cáncer folicular (Tabla 53).

Tabla 52: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de *Pro52Thr* con cáncer de tiroides.

	<i>TSHR Pro52Thr</i> C253A						OR(95%IC)	p
	Pobl. Gral.		C		P			
	N.	Frec.	N.	Frec.	N.	Frec.		
Genotipo	442		204		238			
<i>Pro/Pro</i>	408	(0,92)	189	(0,93)	219	(0,92)	Ref.	
<i>Pro/Thr</i>	27	(0,06)	14	(0,07)	13	(0,05)	0,81(0,36-1,82)	0,61
<i>Thr/Thr</i>	7	(0,02)	1	(0,00)	6	(0,03)	4,10(0,48-34,59)	0,20
Modelo de herencia								
<i>Pro/Pro</i> + <i>Pro/Thr</i>			203	(0,99)	232	(0,96)	Ref.	
<i>Thr/Thr</i>			1	(0,00)	6	(0,03)	4,14(0,49-35,10)	0,13
<i>Pro</i>	843	(0,95)	392	(0,96)	451	(0,95)		
<i>Thr (Variante)</i>	44	(0,05)	16	(0,04)	25	(0,05)	χ^2 p= 0,34	
<i>H-W</i> χ^2	p<0,01		p=0,26		p<0,01			

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: número, *H-W* χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 53: Estudio de la asociación de *Pro52Thr* con cáncer de tiroides, estratificado por tipo de cáncer.

<i>TSHR Pro52Thr</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular			
	C	P	OR(95%IC)	p	P	OR(95%IC)	p	
	204	149			43			
<i>Pro/Pro</i>	189	139	Ref.	1	38	Ref.	1	
<i>Pro/Thr</i>	14	7	0,68(0,26-1,77)	0,44	5	1,31(0,48-3,61)	0,60	
<i>Thr/Thr</i>	1	3	3,45(0,34-34,79)	0,29	0	--	--	

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

En el estudio estratificado por sexos no se calcular la OR, para el genotipo homocigoto para el cambio, por no disponer de ningún paciente hombre, ni ninguna mujer control, con este genotipo. Así, todas las mujeres portadoras del genotipo *Thr/Thr* pertenecen al grupo con cáncer. A su vez, no apreciamos diferencias en los valores de OR en el genotipo heterocigoto en ninguno de los sexos (Tabla 54).

Tabla 54: Estudio, estratificado por género, de la asociación de *Pro52Thr* con cáncer de tiroides.

	<i>Pro52Thr</i>							
	<i>Mujeres</i>		OR(95%IC)	p	<i>Hombres</i>		OR(95%IC)	p
	C	P			C	P		
Genotipos								
<i>Pro/Pro</i>	109	158	Ref.		80	56	Ref.	
<i>Pro/Thr</i>	9	10	0,75(0,14-3,82)	0,73	5	3	0,86(0,19-3,78)	0,85
<i>Thr/Thr</i>	0	6	--	--	1	0	--	

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Polimorfismo *Asp727Glu*

Los resultados de frecuencias alélicas, genotipos y estudio de asociación se presentan para el polimorfismo *Asp727Glu* en la Tabla 55. Apreciamos distribuciones genotípicas muy similares a las descritas para poblaciones europeas (Chistiakov *et al.*, 2002; Matakidou *et al.*, 2004; HapMapCEU ss2903573), y concordantes con lo esperado en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 55: Estadística descriptiva y asociación de riesgo de *Asp727Glu* con cáncer de tiroides.

	<i>Asp727Glu</i> C2281G						OR(95%IC)	p
	Pobl. N.	Gral Frec.	C N.	Frec.	P N.	Frec.		
Genotipo	447		204		238			
<i>Asp/Asp</i>	385	(0,86)	171	(0,84)	214	(0,88)	Ref.	
<i>Asp/Glu</i>	57	(0,13)	30	(0,15)	27	(0,11)	0,76(0,41-1,35)	0,25
<i>Glu/Glu</i>	5	(0,01)	2	(0,01)	3	(0,01)	1,42(0,22-8,88)	0,72
Modelo de herencia								
<i>sobredominante</i>			173	(0,85)	217	(0,89)	Ref.	
			30	(0,15)	27	(0,11)	0,76(0,43-1,35)	0,34
<i>Asp</i>	827	(0,93)	372	(0,92)	455	(0,93)	χ^2 p= 0,36	
<i>Glu (variante)</i>	67	(0,07)	34	(0,08)	33	(0,07)		
<i>H-W χ^2</i>	p=0,09		p=0,63		p=0,08			

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: número, H-W χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

La frecuencia del alelo variante *Glu* fue de 0,08 y 0,07 en controles y pacientes, respectivamente, y se aviene a lo encontrado para caucásicos (Chistiakov *et al.*, 2002; Peeters *et al.*, 2003, Matakidou *et al.*, 2004, HapMap CEU ss2903573). Las frecuencias

Resultados-

alélicas no se diferenciaron significativamente, entre pacientes y controles ($p=0,36$). No hallamos diferencias en la distribución de genotipos entre los controles y los pacientes con cáncer, ni en el modelo codominante ni en el sobredominante. Esta falta de significación estadística se observa, incluso, entre los controles y los pacientes portadores de una u otra variante (papilar y folicular) de cáncer no medular diferenciado (Tabla 56).

Tabla 56: Estudio de la asociación de *Asp727Glu* con cáncer de tiroides estratificado por tipo de cáncer.

<i>TSHR Asp727Glu</i>	Cáncer Papilar			Cáncer Folicular		
	C	P	OR(95%IC)	P	OR(95%IC)	p
	203	149		43		
<i>Asp/Asp</i>	171	131	Ref.	1	39	Ref.
<i>Asp/Glu</i>	30	20	0,84(0,45-1,56)	0,58	3	0,40(0,11-1,41)
<i>Glu/Glu</i>	2	2	1,41(0,19-10,53)	0,74	1	1,60(0,12-20,73)

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Finalmente, en el estudio estratificado por género no apreciamos diferencias en la distribución de genotipos entre controles y pacientes en uno y otro sexo. Aunque se detectó que ser mujer portadora del genotipo *Glu/Glu* tiene 1,44 más riesgo que para los hombres con este genotipo ($OR=1,44(0,53-5,00)$). La interacción entre sexo y riesgo no es significativa ($p=0,77$).

Tabla 57: Estudio, estratificado por género, de la asociación de *Asp727Glu* con cáncer de tiroides.

	<i>Asp727Glu</i>							
	<i>Mujeres</i>		OR(95%IC)	p	<i>Hombres</i>		OR(95%IC)	p
C	P	C			P			
Genotipos								
<i>Asp/Asp</i>	99	155	Ref.	72	54	Ref.		
<i>Asp/Glu</i>	18	22	0,83(0,42-1,65)	12	5	0,59(0,19-1,80)	0,36	
<i>Glu/Glu</i>	1	2	1,10(0,09-12,33)	1	1	1,61(0,09-27,12)	0,74	

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

4.4.2.1 Análisis de haplotipos de *TSHR*

Al hacer el análisis de los haplotipos, sólo detectamos 3 de los 4 posibles, abarcando el primero de ellos el 88% de los casos, según se aprecia en la Tabla 58.

Tabla 58: Frecuencias haplotípicas de *TSHR* y asociación con el cáncer de tiroides.

<i>TSHR</i>					
Hap.	<i>Pro52Thr</i> (C/A)	<i>Asp727Glu</i> (C/G)	Frec.	OR(95%IC)	p
1	C	C	0,88	1,00	---
2	C	G	0,07	0,86(0,52 -1,43)	0,56
3	A	C	0,04	1,19(0,65 -2,17)	0,58
raros			0,00	1,29(1,26 -1,31)	<0,01

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Los haplotipos 2 y 3 presentan valores de ORs de 0,86(0,52 -1,43) y de 1,19(0,65 -2,17), que no se diferencian significativamente ($p=0,56$ y 0,58) respecto al haplotipo de referencia. La asociación inversa del segundo haplotipo y la positiva del tercero es coherente con lo observado en el estudio de asociación de los genotipos individuales, donde el genotipo variante *Glu/Glu* tuvo valores de OR por debajo de la unidad y el genotipo variante *Thr/Thr* mayores que la unidad. No detectamos el haplotipo que contiene los dos alelos variantes. Ambos polimorfismos no están ligados puesto que el análisis de ligamiento detectó una D' con valor de 0,28.

De manera global, los resultados obtenidos con el gen *TSHR* indican que los polimorfismos estudiados no están implicados en la carcinogénesis del tiroides.

4.5 Genotipos de genes relacionados con el ciclo celular

4.5.1. Polimorfismo de *PTPRJ*

En la Tabla 59 se resumen las frecuencias genotípicas, alélicas y los resultados del análisis de asociación, y del equilibrio de Hardy-Weinberg, para el polimorfismo *Asp872Glu* del gen *PTPRJ*.

La distribución de genotipos 0,27 (*Asp/Asp*), 0,57 (*Asp/Glu*) y 0,15 (*Glu/Glu*), observada en la población total está en concordancia con lo obtenido en otros estudios con poblaciones caucásicas europeas 0,21 (*Asp/Asp*), 0,66 (*Asp/Glu*) y 0,13 (*Glu/Glu*),

Resultados-

(AFD_EUR_PANEL ss24698066). Sin embargo, la población general no está en equilibrio de Hardy-Weiberg ($p=8 \times 10^{-4}$) como consecuencia de que el genotipo variante en los pacientes tiene un valor por debajo de lo esperado según el equilibrio. La frecuencia del alelo variante *Glu* fue de 0,45 y 0,43 para controles y pacientes y se corresponde con la citada para europeos (~0,45) (Iuliano *et al.*, 2004), aunque está por encima de la referida para poblaciones británicas (0,28) (Lesueur *et al.*, 2005). No se han encontrado diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de controles y de pacientes ($p=0,49$).

Tabla 59: Estadística descriptiva y estudio de asociación de *PTPRJ* con el cáncer de tiroides.

	<i>PTPRJ Asp872Glu C2965G</i>						OR(95%IC)	p
	Pobl. Gral. N.	Frec.	C N.	Frec.	P N.	Frec.		
Genotipo	447		204		238			
<i>Asp/Asp</i>	124	(0,27)	56	(0,27)	68	(0,28)	Ref.	
<i>Asp/Glu</i>	258	(0,57)	114	(0,55)	144	(0,59)	1,03 (0,66-1,60)	0,25
<i>Glu/Glu</i>	69	(0,15)	36	(0,17)	33	(0,13)	0,72 (0,39-1,33)	0,72
Modelo de herencia								
<i>Asp/Asp+ Asp/Glu</i>			170	(0,83)	207	(0,86)	Ref.	
<i>Glu/Glu</i>			36	(0,18)	33	(0,14)	0,71 (0,42-1,20)	0,20
<i>Asp</i>	506	(0,56)	226	(0,55)	280	(0,57)		
<i>Glu (variante)</i>	396	(0,44)	186	(0,45)	210	(0,43)	χ^2 p= 0,49	
<i>H-W χ^2</i>		$p=8 \times 10^{-4}$		$p=0,12$		$p=0,002$		

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza, N: número, H-W χ^2 : equilibrio de Hardy-Weinberg.

El genotipo homocigoto *Asp/Asp* fue más frecuente en pacientes que en controles. La disminución del valor de OR, 0,72 (0,39-1,33) y 0,71 (0,42-1,20) asociado al cambio de *Asp* por *Glu* no alcanzó significación estadística, ni en el modelo codominante ni el recesivo, con valores de 0,72 y 0,20, respectivamente.

El genotipo homocigoto variante estuvo menos representado en los pacientes afectados tanto por cáncer papilar (OR, 0,64(0,31-1,30) como folicular (OR, 0,57(0,20-1,63); de hecho, la presencia de un único alelo *Glu* disminuyó el riesgo para cualquiera de estos carcinomas, aunque estos efectos no alcanzaron significación estadística (Tabla 60).

Tabla 60: Estudio de la asociación de *Asp872Glu* con cáncer de tiroides, estratificado por tipo de cáncer.

<i>PTPRj Asp872Glu</i>	Cáncer Papilar				Cáncer Folicular			
	C	P	OR(95%IC)	p	P	OR(95%IC)	p	
	203	153			46			
<i>Asp/Asp</i>	56	43	Ref.	1	16	Ref.	1	
<i>Asp/Glu</i>	114	91	0,90(0,54-1,47)	0,68	24	0,62(0,30-1,30)	0,21	
<i>Glu/Glu</i>	36	19	0,64(0,31-1,30)	0,22	6	0,57(0,20-1,63)	0,29	

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Tabla 61: Estudio, estratificado por género, de la asociación de *Asp872Glu* con cáncer de tiroides.

	<i>Asp872Glu</i>							
	Mujeres		OR(95%IC)	p	Hombres		OR(95%IC)	p
C	P	C			P			
Genotipos								
<i>Asp/Asp</i>	29	50	Ref.		27	16	Ref.	
<i>Asp/Glu</i>	66	107	1,0(0,57-1,75)	0,99	34	48	1,12(0,52-2,43)	0,76
<i>Glu/Glu</i>	26	23	0,52(0,24-1,07)	0,05	10	10	1,62(0,55-4,77)	0,38

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

En la Tabla 61 se aprecia que la sustitución por el alelo *Glu* tiene un efecto protector significativo en las mujeres, con OR 0,52(0,24-1,07), mientras que en los hombres no se observó el efecto protector de la sustitución con un valor de OR (1,62(0,55-4,77), $p=0,38$). El análisis de la interacción genotipo sexo muestra que las mujeres portadoras de genotipos con el alelo de riesgo *Asp* en homo o heterocigosis tienen 2,08 veces más riesgo que los hombres con similar condición genotípica, OR=2,08(1,31-3,33), y esta diferencia alcanzó significación estadística ($p < 0,05$).

4.6 Interacciones entre polimorfismos de distintos genes

Si interesante es conocer cómo los polimorfismos por sí solos afectan a la susceptibilidad al cáncer, no lo es menos estudiar el efecto de la combinación de polimorfismos de varios genes sobre el riesgo. Por ello, a sabiendas de que contar con 458 individuos pudiese limitar el poder estadístico del análisis, nos pareció interesante

evaluar la interacción entre polimorfismos de los genes de reparación estudiados: *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3* y *OGG1* entre sí, así como de estos con genes de metabolización de fase II: Glutación S transferasa (*GST*) y N acetil transferasa (*NAT-2*).

4.6.1 Interacción entre genes de reparación

Nuestros primeros análisis de interacción se realizaron entre genes que codifican para enzimas copartícipes en la misma vía reparadora. Así, evaluamos las interacciones de los genotipos de riesgo de *XRCC1* y de *OGG1* como miembros del mecanismo de reparación de roturas de simple cadena.

En la Tabla 62 se aprecia que la combinación *399Arg/326Cys* incrementó el valor de OR, 1,88(0,42-8,40) respecto a los de los polimorfismos por separado (1,12 y 1,17, respectivamente) pero sin ser significativa la asociación con el riesgo (p=0,40). La combinación *280His/326Cys* mostró una relación inversa, OR de 0,81(0,15-4,25) con el riesgo, sin significación estadística (p=0,81) Por el contrario, la combinación *194Arg/326Cys* incrementó la OR, 2,60(0,77-8,76), con un valor de p de 0,07.

Tabla 62: Interacción entre polimorfismos de *OGG1* y *XRCC1*.

<i>OGG1 Ser326Cys</i>	<i>XRCC1</i>	C	P	OR(95%IC)	p
	<i>Arg399Gln</i>				
<i>Ser/Ser</i>	<i>Gln/Gln</i>	18	22	Ref.	
<i>Cys/Cys</i>	<i>Arg/Arg</i>	3	8	1,88(0,42-8,40)	0,40
	<i>Arg280His</i>				
<i>Ser/Ser</i>	<i>Arg/Arg</i>	119	137	Ref.	
<i>Cys/Cys</i>	<i>Arg/His</i>	3	3	0,81(0,15-4,25)	0,81
	<i>Arg194Trp</i>				
<i>Ser/Ser</i>	<i>Arg/Trp</i>	14	11	Ref.	
<i>Cys/Cys</i>	<i>Arg/Arg</i>	7	16	2,60(0,77-8,76)	0,07

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

En la Tabla 63 se muestran los resultados de la interacción entre genes de reparación del mecanismo BER y del de RH. Aunque, algunas combinaciones no pudieron ser evaluadas por no contar con suficientes individuos, apreciamos que la combinación del genotipo *280His/His* de *XRCC1* y *A/AIVS5-14* de *XRCC3* se presentó con más frecuencia entre los pacientes, con valor de OR=3,46 (1,17-0,18) y p=0,02; igualmente, la combinación que implica el genotipo *194Arg/Trp* y *241Met/Met* de *XRCC3* con OR=5,69 (1,39-3,27), se asoció con el riesgo, con valor de p de 0,02.

Tabla 63: Interacción de polimorfismos de *XRCC1* con los de *XRCC2* y *XRCC3*.

<i>XRCC2</i>	<i>XRCC1</i>	C	P	OR(95%IC)	p
<i>Arg188His</i>	<i>Arg399Gln</i>				
<i>His/His</i>	<i>Gln/Gln</i>	2	0	Ref.	
<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>	71	85	--	
	<i>Arg280His</i>				
<i>His/His</i>	<i>Arg/Arg</i>	5	1	Ref.	
<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/His</i>	18	32	1,31(0,20-8,61)	0,77
	<i>Arg194Trp</i>				
<i>His/His</i>	<i>Arg/Trp</i>	2	0	Ref.	
<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>	151	190	--	
<i>XRCC3</i>	<i>XRCC1</i>				
<i>Thr241Met</i>	<i>Arg399Gln</i>				
<i>Thr/Thr</i>	<i>Gln/Gln</i>	10	15	Ref.	
<i>Met/Met</i>	<i>Arg/Arg</i>	9	15	1,06(0,32-3,45)	0,93
	<i>Arg280His</i>				
<i>Thr/Thr</i>	<i>Arg/Arg</i>	88	76	Ref.	
<i>Met/Met</i>	<i>Arg/His</i>	6	7	1,09(0,34-3,48)	0,88
	<i>Arg194Trp</i>				
<i>Thr/Thr</i>	<i>Arg/Trp</i>	11	3	Ref.	
<i>Met/Met</i>	<i>Arg/Arg</i>	22	34	5,69(1,39-3,27)	0,02
<i>IVS5-14</i>	<i>XRCC1</i>				
	<i>Arg399Gln</i>				
<i>G/G</i>	<i>Gln/Gln</i>	1	1	Ref.	
<i>A/A</i>	<i>Arg/Arg</i>	53	67	0,97(0,05-7,05)	0,98
	<i>Arg280His</i>				
<i>G/G</i>	<i>Arg/Arg</i>	18	7	Ref.	
<i>A/A</i>	<i>Arg/His</i>	17	32	3,46(1,17-0,18)	0,02
	<i>Arg194Trp</i>				
<i>G/G</i>	<i>Arg/Trp</i>	3	0	Ref.	
<i>A/A</i>	<i>Arg/Arg</i>	104	133	--	

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Finalmente evaluamos las interacciones de los polimorfismos de los genes del mecanismo de reparación RH y de estos con el de *OGGI*. No fue posible calcular las ORs para las interacciones de los polimorfismos de *XRCC3* y *XRCC2* por no disponer de pacientes con el genotipo doble variante para *Arg188His* y *Thr241Met*. Asimismo, debido a la baja frecuencia del alelo variante en ambos polimorfismos, no se detectaron portadores con el genotipo homocigoto variante de *Arg188His* y *IVS5-14*, ni en controles ni en pacientes.

Tabla 64: Interacción entre polimorfismos de *XRCC2* y *XRCC3* y de estos con *OGGI*.

<i>XRCC2</i>	<i>XRCC3</i>	C	P	OR(95%IC)	p
<i>Arg188His</i>	<i>Thr241Met</i>				
<i>His/His</i>	<i>Thr/Thr</i>	5	0	Ref.	
<i>Arg/Arg</i>	<i>Met/Met</i>	14	27	--	
	<i>IVS5-14</i>				
<i>His/His</i>	<i>G/G</i>	0	0	Ref.	
<i>Arg/Arg</i>	<i>A/A</i>	88	110	--	
<i>OGGI</i>	<i>XRCC3</i>				
<i>Ser326Cys</i>	<i>Thr241Met</i>				
<i>Ser/Ser</i>	<i>Thr/Thr</i>	59	61	Ref.	
<i>Cys/Cys</i>	<i>Met/Met</i>	2	1	0,51(0,04-6,03)	0,59
	<i>IVS5-14</i>				
<i>Ser/Ser</i>	<i>G/G</i>	14	7	Ref.	
<i>Cys/Cys</i>	<i>A/A</i>	8	11	1,99(0,53-7,46)	0,31
	<i>XRCC2</i>				
<i>Ser/Ser</i>	<i>His/His</i>	4	1	Ref.	
<i>Cys/Cys</i>	<i>Arg/Arg</i>	8	13	5,86(0,53-4,19)	0,15

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Las interacciones de *OGGI* con los polimorfismos de *XRCC2* y *XRCC3* no incrementaron las ORs y, si bien se obtuvo un valor superior en el caso de la combinación *188Arg/326Cys* (OR, 5,86(0,53-4,19), la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa (Tabla 64).

4.6.2 Interacciones entres genes de reparación y genes de metabolismo

Las interacciones de los polimorfismos de los genes de reparación y de los genes *GSTs* se evaluaron a partir de nuestros resultados del genotipado de *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3* y *OGGI* y, de los resultados del genotipado de las *GSTs* hechos previamente a una muestra importante de nuestra población por Hernández y colaboradores (Hernández *et al.*, 2003). Algunas de las asociaciones se muestran en la Tabla 65.

Los valores de ORs para las combinaciones de polimorfismos *GST* con los polimorfismos del codón 399 y 194 de *XRCC1* tuvieron sentido inverso y no significativo. En el resto de las combinaciones se apreciaron incrementos no significativos de ORs aunque, para las combinaciones *GSTM1nulo/Arg280His* y *GSTM1nulo/IVS5-14*, los incrementos se asociaron a valores de p cercanos a la significación estadística (0,06 y 0,07).

Tabla 65: Interacción entre polimorfismos de genes de reparación y polimorfismos de GSTs.

GST	Genes de reparación	C	P	OR(95%IC)	p
<i>GSTM1</i> nulo	<i>XRCC1 Arg399Gln</i>	37	34	0,75(0,19-2,93)	0,69
<i>GSTT1</i> nulo	<i>Arg/Arg</i>	52	57	0,76(0,24-2,42)	0,65
<i>T1:M1</i> nulos		58	63	0,29(0,05-1,57)	0,15
<i>GSTP1</i> val/val		0	37	--	
<i>GSTM1</i> nulo	<i>XRCC1 Arg280His</i>	11	21	2,37(1,05_5,24)	0,06
<i>GSTT1</i> nulo	<i>Arg/His</i>	4	6	1,62(0,45-9,93)	0,46
<i>T1:M1</i> nulos		2	5	2,62(0,5-13,79)	0,25
<i>GSTP1</i> val/val		1	4	3,65(0,39-33,4)	0,25
<i>GSTM1</i> nulo	<i>XRCC1 Arg194Trp</i>	54	65	0,95(0,53-1,73)	0,88
<i>GSTT1</i> nulo	<i>Arg/Arg</i>	27	35	0,72(0,22-2,39)	0,59
<i>T1:M1</i> nulos		15	21	0,97(0,27-3,18)	0,91
<i>GSTP1</i> val/val		15	16	0,17(0,01-1,65)	0,13
<i>GSTM1</i> nulo	<i>XRCC2</i>	0	0		--
<i>GSTT1</i> nulo	<i>Arg/Arg</i>	21	28	4,22(0,35-50,2)	0,25
<i>T1:M1</i> nulos		11	16	5,19(0,46-59,0)	0,18
<i>GSTP1</i> val/val		16	17	4,07(0,36-45,1)	0,25
<i>GSTM1</i> nulo	<i>XRCC3 Thr241Met</i>	9	10	1,33(0,48-3,70)	0,58
<i>GSTT1</i> nulo	<i>Met/Met</i>	4	9	2,20(0,64-7,60)	0,20
<i>T1:M1</i> nulos		2	4	2,43(0,37-12,11)	0,39
<i>GSTP1</i> val/val		3	1	0,39(0,04-3,92)	0,42
<i>GSTM1</i> nulo	<i>IVS5-14</i>	43	50	7,0(0,82-59,69)	0,07
<i>GSTT1</i> nulo	<i>A/A</i>	16	22	2,75(0,78-9,6)	0,11
<i>T1:M1</i> nulos		9	12	2,93(0,75-11,4)	0,12
<i>GSTP1</i> val/val		9	10	3,66(0,59-22,7)	0,16
<i>GSTM1</i> nulo	<i>OGG1 Ser326Cys</i>	7	8	1,14(0,39-3,36)	0,80
<i>GSTT1</i> nulo	<i>Cys/Cys</i>	1	2	1,76(0,16-19,7)	0,65
<i>T1:M1</i> nulos		1	2	1,76(0,15-19,8)	0,64
<i>GSTP1</i> val/val		2	5	--	

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Para el análisis de las interacciones de los genes de reparación con los polimorfismos de *NAT2* utilizamos los resultados del genotipado de *NAT2**5, *NAT2**6 y *NAT2**7 de 173 individuos de nuestra población hechos por Hernández y colaboradores (comunicación personal).

Los resultados de las combinaciones se presentan en la Tabla 66. La interacción del genotipo de riesgo de *NAT2**5 con todas las enzimas de reparación incrementó los valores de ORs (en las combinaciones donde pudo ser calculada); pero sólo alcanzó significación estadística en las combinaciones con los polimorfismos del codón 399 y

Resultados-

280 de *XRCCI*, OR=10,1 (1,11-90,78) y OR=3,1(0,92-10,349, respectivamente, con valores de p asociados de 0,04 y 0,06.

Tabla 66: Interacción entre polimorfismos de genes de reparación y de las *NAT2*.

<i>NAT2</i>	Genes de reparación	C	P	OR(95%IC)	p
<i>NAT2</i> *5+/-	<i>XRCCI Arg399Gln</i>	15	18	10,1(1,11-90,78)	0,04
<i>NAT2</i> *6 -/-	<i>Arg/Arg</i>	7	7	1,57(0,39-6,27)	0,52
<i>NAT2</i> *6+/- -/-		29	29	1,70(0,60-4,76)	0,31
<i>NAT2</i> *7 -/-		1	0	--	--
<i>NAT2</i> *7+/- -/-		4	1	0,43(0,04-4,35)	0,47
<i>NAT2</i> *5+/-	<i>XRCCI Arg280His</i>	5	10	3,10(0,92-10,34)	0,06
<i>NAT2</i> *6 -/-	<i>Arg/His</i>	1	5	5,32(0,58-48,18)	0,14
<i>NAT2</i> *6+/- -/-		4	15	4,31(1,33-13,97)	0,01
<i>NAT2</i> *7 -/-		1	0	--	--
<i>NAT2</i> *7+/- -/-		2	0	--	--
<i>NAT2</i> *5+/-	<i>XRCCI Arg194Trp</i>	1	1	1,26(0,07-22,02)	0,87
<i>NAT2</i> *6 -/-	<i>Arg/Arg</i>	14	19	2,49(0,52-11,81)	0,20
<i>NAT2</i> *6+/- -/-		57	65	2,62(0,64-10,68)	0,18
<i>NAT2</i> *7 -/-		1	0	--	--
<i>NAT2</i> *7+/- -/-		5	10	2,56(0,56-11,55)	0,22
<i>NAT2</i> *5+/-	<i>XRCC2</i>	29	41	--	--
<i>NAT2</i> *6 -/-	<i>Arg/Arg</i>	13	17	--	--
<i>NAT2</i> *6+/- -/-		49	60	--	--
<i>NAT2</i> *7 -/-		1	0	--	--
<i>NAT2</i> *7+/- -/-		3	10	6,37(0,52-76,87)	0,15
<i>NAT2</i> *5+/-	<i>XRCC3 Thr241Met</i>	4	7	3,14(0,71-13,849)	0,13
<i>NAT2</i> *6 -/-	<i>Met/Met</i>	1	1	1,27(0,07-21,27)	0,87
<i>NAT2</i> *6+/- -/-		7	12	2,20(0,75-6,45)	0,15
<i>NAT2</i> *7 -/-		0	0	--	--
<i>NAT2</i> *7+/- -/-		0	2	--	--
<i>NAT2</i> *5+/-	<i>IVS5-14</i>	20	32	--	--
<i>NAT2</i> *6 -/-	<i>A/A</i>	7	13	12,2(1,25-119,9)	0,03
<i>NAT2</i> *6+/- -/-		35	43	8,53(1,01-71,98)	0,05
<i>NAT2</i> *7 -/-		0	0	--	--
<i>NAT2</i> *7+/- -/-		0	0	--	--
<i>NAT2</i> *5+/-	<i>OGGI Ser326Cys</i>	2	5	2,19(0,36-13,2)	0,40
<i>NAT2</i> *6 -/-	<i>Cys/Cys</i>	1	2	1,91(0,16-22,75)	0,60
<i>NAT2</i> *6+/- -/-		5	8	1,61(0,47-5,44)	0,44
<i>NAT2</i> *7 -/-		0	0	--	--
<i>NAT2</i> *7+/- -/-		0	3	--	--

Se señalan en negrita los valores que se corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Al estudiar el efecto sobre el riesgo de la interacción de los genotipos de genes de reparación con el fenotipo acetilador lento (asociación de distintos genotipos de *NAT2*) observamos que la que implica el polimorfismo del codón 280 de *XRCCI* rindió un valor de OR de 2,50(0,94-6,627) con una $p=0,06$ y que el polimorfismo *IVS5-14* de *XRCC3* con el fenotipo lento también incrementó la OR, 4,49(0,50-39,95), pero no significativamente ($p=0,17$).

Las combinaciones que aumentaron la ORs significativamente fueron la de *NAT2*6* con el SNP del codón 280 de *XRCCI* (ORs 4,31(1,33-13,97) y la de *NAT2*6* con *IVS5-14* de *XRCC3* (12,2(1,25-119,9) con p asociadas de 0,01 y 0,03, respectivamente.

Otras interacciones entre genes que pudiésemos haber estudiado son las que implican a los genes relacionados con la fisiología y secreción hormonal del tiroides; sin embargo, no fue posible estudiar la interacción de los polimorfismos de *TSHR* con los del gen *TG* por no disponer de suficientes individuos, en ninguno de los casos hallamos dobles mutantes en los controles.

4.7 Interacción del genotipo con la edad

Los resultados de la asociación entre el genotipo y edad se presentan en la Tabla 67. En función de los datos epidemiológicos de esta localización tumoral y de las características de nuestra población, el estudio de asociación se hizo considerando el corte de edad a los 40 años.

Apreciamos un modesto predominio de los genotipos de riesgo de *Arg399Glu*, *IVS5-14*, *Ser734Ala*, *Met1027Val*, *Arg1980Trp*, *Asp872Glu* en individuos menores de 40 años que desarrollaron el cáncer; por el contrario, los genotipos de riesgo de *Ser326Cys*, *Thr241Met*, *Pro52Thr*, *Asp727Glu* fueron ligeramente más frecuentes en pacientes mayores de 40 años. Los genotipos de los polimorfismos *Arg280His*, *Arg194Trp* *Pro778Pro* estuvieron igualmente distribuidos en ambos grupos de edad de aparición del tumor (OR~1). Para el polimorfismo *Arg188His* de *XRCC2* no pudimos hacer el cálculo de OR por no contar con pacientes con el genotipo *His/His*. En ningún caso se alcanzaron valores significativos. El valor de p más cercano a la significación ($p=0,09$) correspondió al SNP del exón 33 de *TG* (*Arg1980Trp*).

Se hicieron además los análisis con 4 grupos de edad obtenidos, de acuerdo a los cuartiles, sin que se apreciaran diferencias significativas para ninguno de ellos. Sin embargo, se observó una tendencia a que los genotipos de riesgo se acumularan en el segundo y tercer grupo, que incluye los individuos con edades de 35 a 41 y de 42 a 51 años, respectivamente (anexo 3).

Tabla 67: Asociación de genotipos con la edad de aparición del tumor.

Genotipo de riesgo	Edad		OR(95%IC)	p
	≤40 %	>40 %		
<i>Arg/Arg399</i>	47	43	0,78(0,35-1,75)	0,55
<i>Arg/His280</i>	14	16	1,03(0,55-2,01)	0,90
<i>Arg/Arg194</i>	94	94	0,98(0,26-3,76)	0,99
<i>Cys/Cys326</i>	6	7	1,17(0,43-3,22)	0,76
<i>Arg/Arg188</i>	81	79	--	--
<i>Met/Met241</i>	11	15	1,32(0,60-2,90)	0,49
<i>A/A-IVS5</i>	59	53	0,85(0,19-3,69)	0,82
<i>Ala/Ala 734</i>	34	28	0,68(0,33-1,39)	0,29
<i>CCPro</i>	30	24	0,99(0,47-2,08)	0,98
<i>Val/Val1027</i>	30	29	0,65(0,32-1,34)	0,24
<i>Trp/Trp 1980</i>	22	15	0,48(0,21-1,11)	0,09
<i>Thr/Thr52</i>	1	4	1,71(0,30-9,54)	0,54
<i>Glu/Glu727</i>	1	2	1,75(0,15-19,60)	0,65
<i>Asp/Asp872</i>	30	26	0,89(0,41-1,92)	0,77

C: controles. P: pacientes, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

4.8 Interacción del genotipo con factores ambientales

Los resultados de las interacciones entre genes y factores ambientales, en particular, gen-consumo alcohol y gen-hábito de fumar, se presentan en las Tablas 68-73.

En el caso del polimorfismo *Arg399Gln*, apreciamos que los portadores del genotipo de riesgo *Arg/Arg* que beben tuvieron significativamente menos riesgo de desarrollar el cáncer que los que no bebían OR=0,41(0,21-0,78), y $p<0,05$; por el contrario, los fumadores con este genotipo no se diferenciaron en cuanto a susceptibilidad al cáncer de los no fumadores, OR=1,40(0,70-2,50), ($p>0,05$). Para el polimorfismo *Arg280His*, se observa que hubo menos bebedores con el genotipo de riesgo *Arg/His* OR=0,40(0,11-1,40) entre los pacientes; sin embargo, el riesgo es prácticamente igual para los fumadores y no fumadores portadores del genotipo OR=1,07(0,55-2,08). En definitiva, ninguna de las interacciones del polimorfismo con los hábitos fueron significativas ($p>0,05$). Los bebedores con el genotipo *Arg/Arg* del codón 194 tuvieron 0,48 veces menor frecuencia entre los individuos con cáncer con valor significativo ($p<0,05$). El hábito de fumar no moduló significativamente el riesgo asociado a este genotipo OR=0,79(0,20-3,04) y $p>0,05$.

Tabla 68: Interacciones de *XRCCI* con diversos hábitos de consumo. Análisis estratificado por hábitos.

Genotipos de riesgo	Bebedores OR(95%IC)	No bebedores OR(95%IC)
<i>Arg/Arg399</i>	0,72(0,23-2,23)	1,34(0,66-2,73)
<i>Arg/His280</i>	1,29(0,40-4,16)	1,58(0,84-2,96)
<i>Arg/Arg194</i>	0,83(0,21-3,28)	3,79(1,28-11,10)
	Fumadores OR(95%IC)	No fumadores OR(95%IC)
<i>Arg/Arg399</i>	0,97(0,38-2,43)	1,20(0,54-2,66)
<i>Arg/His280</i>	1,73(0,73-4,06)	1,47(0,72-2,99)
<i>Arg/Arg194</i>	1,53(0,40-5,81)	2,89(0,94-9,15)

Se señalan en negrita las OR, IC con diferencias estadísticamente significativas entre controles y pacientes ($p\leq 0,05$).

Al estratificar la población por hábitos, se observa que ningún genotipo se asocia al riesgo entre los bebedores; sin embargo, entre los no bebedores el genotipo de riesgo de *Arg194Trp*, tuvo incrementos en el valor de OR con significación estadística, OR 3,79(1,28-11,1); $p=0,02$. En términos generales, los mayores valores de ORs se observan en individuos portadores del genotipo de riesgo que no consumen alcohol. En

la población fumadora no se aprecian valores de ORs que denoten diferencias significativas entre controles y pacientes. En la población no fumadora no se detectan diferencias en el riesgo para los SNPs del codón 280 y 399 de *XRCC1*. Únicamente el genotipo de riesgo de *Arg194Trp*, alcanzó un valor de OR de 2,89(0,94-9,15) con significación estadística ($p=0,04$)

El análisis de la interacción del polimorfismo *Ser326Cys* de *OGGI* con los hábitos de ingerir alcohol y de fumar mostró que no había ningún individuo bebedor con genotipo *Cys/Cys* entre los pacientes con cáncer, con lo cual no fue posible calcular la respectiva OR; por otro lado, los individuos fumadores portadores de este genotipo tuvieron menos riesgo que los no fumadores, $OR=0,61(0,20-1,83)$, pero sin significación estadística ($p>0,05$). El estudio de las poblaciones por separado mostró valores mayores de OR entre los individuos no fumadores 1,46(0,52-4,08) en relación a los fumadores 0,91(0,24-3,43), pero sin que las diferencias alcanzaran la significación estadística (Tabla 69).

Tabla 69: Interacción de *OGGI* y diversos hábitos de consumo. Análisis estratificado por hábitos.

Genotipo de riesgo	Bebedores OR(95%IC)	No bebedores OR(95%IC)
<i>Cys/Cys</i>		1,23(0,51-2,93)
	Fumadores OR(95%IC)	No fumadores OR(95%IC)
<i>Cys/Cys</i>	0,91(0,24-3,43)	1,46(0,52-4,08)

OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza

La interacción del genotipo de riesgo de *XRCC2* con el hábito de consumir alcohol resultó en una OR de 0,45 (0,28-0,73) y valor de p menor de 0,05, lo que indica que los individuos con este genotipo que consumen alcohol tuvieron menos riesgo que los no bebedores con igual genotipo. La interacción con el hábito de fumar de este genotipo de *XRCC2* no fue significativa aunque se apreció un valor menor de OR en los portadores del genotipo que fumaban (OR, 0,91(0,58-1,43)). Ningún individuo bebedor portaba el genotipo *His/His* por lo cual no se pudo calcular la OR de este genotipo en la población bebedora. Por el contrario, ningún individuo no fumador portaba este genotipo, no pudiendo tampoco ser calculada la OR para los no fumadores (Tabla 70).

En la Tabla 70 se aprecia que en los pacientes hubo mas bebedores con el genotipo de riesgo *Met/Met* del codón 241 de *XRCC3* (OR 1,63 IC 0,68-3,88), pero sin significación estadística, ($p>0,05$); al subdividir la población según este hábito, apreciamos que el incremento del riesgo es significativo sólo en la población bebedora (OR, 3,73(1,20-11,6); $p=0,02$). Se obtuvo una OR de 1,22(0,40-3,70) con $p>0,05$, en el análisis caso-caso para la interacción del genotipo con el tabaco, lo que indica que el tabaco no moduló significativamente el riesgo. Las ORs del genotipo homocigoto variante fueron similar para los fumadores, OR, 1,61(0,63-4,12), y los no fumadores OR, 1,57(0,70-3,51).

Tabla 70: Interacciones de *XRCC2* y *XRCC3* con diversos hábitos de consumo. Análisis estratificado por hábitos.

Genotipos de riesgo	Bebedores OR(95%IC)	No bebedores OR(95%IC)
<i>Arg/Arg188</i>	--	8,64(0,98-75,8)
<i>Met/Met241</i>	3,73(1,20-11,6)	1,03(0,50-2,12)
<i>A/A-IVS5</i>	9,80(1,20-79,7)	1,02(0,31-3,37)
	Fumadores OR(95%IC)	No fumadores OR(95%IC)
<i>Arg/Arg188</i>	5,38(0,56-50,8)	--
<i>Met/Met241</i>	1,61(0,63-4,12)	1,57(0,70-3,51)
<i>A/A-IVS5</i>	2,27(0,56-9,09)	2,13(0,64-7,39)

Se señalan en negrita las OR, IC con diferencias estadísticamente significativas entre controles y pacientes ($p\leq 0,05$).

Ser portador del genotipo homocigoto *AA* del polimorfismo *IVS5* y, además, ser bebedor se asocia con un incremento significativo del riesgo, OR de 14,23 (1,36-149,15) y $p<0,05$. Sin embargo, el valor de $OR=1,20(0,21-6,96)$ con $p>0,05$, obtenido al estudiar la interacción de este genotipo con el hábito de fumar revela que no hay diferencias en el riesgo entre fumadores y no fumadores. Al analizar los resultados estratificados se aprecia que, efectivamente, el genotipo *AA* en los bebedores tiene un valor de OR 9,80(1,20-79,7) que significa un incremento significativo del riesgo, mientras que los no bebedores tienen un valor de OR de 1,02(0,31-3,37), sin que la diferencia entre pacientes y controles sea de significación.

Resultados

En relación, al estudio estratificado según el hábito de fumar, se aprecia que el genotipo no se asoció a riesgo ni en los fumadores ni en los individuos sin el hábito (OR; 2,27(0,56-9,09) y 2,13(0,64-7,39), respectivamente.

En la Tabla 71 se presentan los resultados del análisis de los efectos moduladores del hábito de ingerir alcohol y de fumar sobre el riesgo de determinados genotipos del *TG* para desarrollar cáncer de tiroides.

Tabla 71: Interacciones de polimorfismos *TG* con diversos hábitos. Análisis estratificado por hábitos.

Genotipos de riesgo	Bebedores OR(95%IC)	No bebedores OR(95%IC)
<i>Ala/Ala 734</i>	3,08(1,09-8,66)	2,02(1,02-4,01)
<i>CCPro</i>	4,59(1,44-14,5)	2,71(1,33-5,52)
<i>Val/Val1027</i>	4,25(1,41-12,7)	1,88(0,95-3,73)
<i>Trp/Trp1980</i>	1,06(0,37-3,04)	2,94(1,40-6,19)
	Fumadores OR(95%IC)	No fumadores OR(95%IC)
<i>Ala/Ala 734</i>	1,21(0,50-2,92)	3,11(1,49-6,47)
<i>CCPro</i>	3,41(1,27-9,12)	2,83(1,32-6,06)
<i>Val/Val1027</i>	1,74(0,71-4,27)	2,66(1,26-5,63)
<i>Trp/Trp 1980</i>	2,28(0,96-5,38)	1,73(0,77-3,90)

Se señalan en negrita las OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza con diferencias estadísticamente significativas entre controles y pacientes ($p \leq 0,05$).

Se observa que los genotipos de riesgo de los polimorfismos *Ala/Ala 734*, *CCPro* y *Val/Val1027* de *TG* no tuvieron interacción significativa con el hábito de consumir alcohol aunque, en todos los casos, se obtuvieron valores de OR por debajo de la unidad [OR, 0,72(0,9-1,81), 0,49(0,29-0,80) y 0,53(0,32-0,88), respectivamente], que indican el menor riesgo que se asocia a los individuos bebedores portadores del genotipo. En cambio, esta asociación sí que alcanzó significación estadística para los individuos bebedores con el genotipo *Trp/Trp1980*; donde el riesgo para estos individuos fue 0,27

veces menor que para los no bebedores del mismo genotipo (OR 0,27(0,10-0,73) y $p < 0,05$).

La interacción entre el genotipo y el hábito de fumar no tuvo un efecto significativo sobre el riesgo en ninguno de los SNPs de *TG*. Las OR fueron superiores a 1 para *CC778*, *Val/Val1027*, *Trp/Trp1980* (1,36(0,50-3,71), 1,04(0,38-1,66), 1,57(0,68-3,66)). Los fumadores con el genotipo *Ala/Ala734* del exón 10 tuvieron menor valor de OR de 0,67(0,32-1,38), pero sin riesgo significación estadística.

Tabla 72: Interacciones de polimorfismos de *TSHR* con diversos hábitos. Análisis estratificado por hábitos.

Genotipos de riesgo	Bebedores OR(95%IC)	No bebedores OR(95%IC)
<i>Thr/Thr52</i>	--	4,33(0,51-36,4)
<i>Glu/Glu727</i>	1,21(0,07-20,0)	1,41(0,12-15,7)
	Fumadores OR(95%IC)	No fumadores OR(95%IC)
<i>Thr/Thr52</i>	1,97(0,17-22,2)	--
<i>Glu/Glu727</i>	--	1,26(0,15-10,07)

OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza

El efecto de la interacción del polimorfismo *Pro52Thr* de *TSHR* con el hábito de consumir alcohol y tabaco no pudo ser evaluado por no contar con individuos bebedores o controles fumadores con el genotipo *Thr/Thr*. El efecto del tabaco tampoco se determinó por no contar con ningún no fumador con este genotipo en los controles. El segundo polimorfismo sí que pudo ser estudiado y reveló que los bebedores con el genotipo variante del codón 727 de *TSHR* se asociaron a valores de OR de 1,77(0,15-19,9) $p=0,64$), sin significación estadística. En relación a la modulación por el efecto de fumar apreciamos que los fumadores con el genotipo de riesgo de *Asp727Glu* fueron menos frecuentes en los pacientes con valores de OR de 0,75(0,06-8,50), pero sin que la asociación fuese significativa ($p=0,82$).

Resultados

Tabla 73: Interacciones de polimorfismos *PTPRJ* con diversos hábitos. Análisis estratificado por hábitos.

Genotipos de riesgo	<i>Bebedores</i> OR(95%IC)	<i>No bebedores</i> OR(95%IC)
<i>Asp/Asp872</i>	1,54(0,44-5,36)	1,33(0,65-2,71)
	<i>Fumadores</i> OR(95%IC)	<i>No fumadores</i> OR(95%IC)
<i>Asp/Asp872</i>	0,95(0,37-2,40)	1,74(0,78-3,87)

OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza

Finalmente, el polimorfismo de *Asp872Glu* de *PTPRJ* no mostró asociaciones significativas ni con el hábito de ingerir alcohol ni con el de fumar, sus respectivas OR fueron 1,37(0,44-4,24) y 0,72(0,33-1,54) con valores de p mayores de 0,05 (Tabla 73).

Discusión



5. DISCUSIÓN

La carcinogénesis es un proceso multigénico, multifásico y multicausal, con un importante componente ambiental, que implica genes de alta y baja penetrancia (Suh y Vijg, 2005). Sin embargo, la baja frecuencia de mutaciones en genes de elevada penetrancia en la población ha propiciado un mayor interés por la identificación de variantes en genes más frecuentes de baja penetrancia. Estas variantes, de forma individual o en combinación, pueden alterar la susceptibilidad a diversas patologías, incluida el cáncer (Imyanitov *et al.*, 2004; Iniesta *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que los SNPs representan aproximadamente el 80% de las variantes de secuencia en humanos y, que pueden afectar genes que participan en el control del ciclo celular, el metabolismo y la reparación del DNA, entre otras funciones (Hemminki y Shields, 2002), es obvia la importancia de evaluarlos como marcadores de susceptibilidad (Vodicka *et al.*, 2004; MacAuley y Ladiges, 2005).

Son varios los estudios que han investigado la asociación de los polimorfismos con el riesgo de padecer cáncer (Sanyal *et al.*, 2004), siendo los más exhaustivos los que analizan los carcinomas de mayor incidencia como son el de pulmón, mama, colorrectal y de vejiga (Duell *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2005b).

El cáncer de tiroides, sin embargo, permanece prácticamente inexplorado en cuanto a la posible influencia de los polimorfismos sobre su susceptibilidad. En realidad, todavía no está totalmente esclarecido el mecanismo molecular que subyace en su carcinogénesis, ni se cuenta con un criterio uniforme y consistente en cuanto a la naturaleza de los factores de riesgo, por ello la realización de este trabajo cobra particular importancia.

El proceso mediante el cual una célula normal se maligniza implica la adquisición secuencial de mutaciones en el DNA, ya sean inducidas de forma endógena o por exposición a xenobióticos. En respuesta a la diversidad de lesiones que se generan se estructuran diversos mecanismos para su reparación (Hoeijmakers, 2001a,b). En ciertos casos sus actuaciones se solapan, en otros gozan de cierta exclusividad; no obstante, el denominador común es que pueden conducir a inestabilidad genómica y carcinogénesis. Estos mecanismos involucran más de 130 genes, muchos de ellos con polimorfismos que producen sutiles alteraciones en las enzimas de reparación y, con ello, en la susceptibilidad al desarrollo tumoral (Hu *et al.*, 2002; Ladiges *et al.*, 2004; Norppa, 2004; Relton *et al.*, 2004; Sanyal *et al.*, 2004).

Es un hecho demostrado la correlación que existe entre la exposición a la radiación ionizante y el aumento de riesgo a desarrollar cáncer, como lo es también que la radiación es el único factor de riesgo reconocido en la carcinogénesis de la glándula tiroidea. Esta exposición produce lesiones oxidativas en el DNA a través de ataques electrofílicos por parte de las ROS generadas. La capacidad del organismo para reparar los daños producidos por las ROS depende, en gran medida, de la fidelidad de sus mecanismos de reparación BER y RH.

Genes de reparación del mecanismo BER

Hoy en día es indiscutible el papel de los SNPs en genes que codifican para el mecanismo BER sobre la susceptibilidad a la carcinogénesis. La ausencia o disminución de la función enzimática de la maquinaria reparativa BER, ha sido correlacionada con un elevado riesgo de padecer diversos cánceres, como los son el de pulmón, vejiga, próstata, riñón, mama, laringe, estómago, colon y piel, entre otros (Goode *et al.*, 2002, Hung *et al.*, 2005b).

XRCC1 y *OGG1* son los genes de este mecanismo que más han sido examinados en estudios epidemiológicos.

La proteína XRCC1, sin actividad enzimática conocida, se plantea que actúa como un pivote o chaperona, favoreciendo las interacciones con otras enzimas que participan en la reparación de roturas de simple cadena. Los polimorfismos de este gen con resultados epidemiológicos más congruentes son *Arg194Trp* (rs1799782), *Arg280His* (rs25489) y *Arg399Gln* (rs25487) (Goode *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2005b). Todos ellos se encuentran en regiones codificantes (exón 6, 9 y 10, respectivamente) y representan cambios no conservativos.

El polimorfismo *Arg399Glu* se ha asociado con varios tipos de cáncer, con resultados de diversa índole, ya sea incrementando o reduciendo la susceptibilidad. Las diferencias en sus efectos pueden ser consecuencia de las variaciones en la expresión de XRCC1 en los diferentes tejidos, de efectos específicos de exposición de los alelos, o de la competencia o solapamiento con otras rutas bioquímicas. Incluso, para un mismo tipo de cáncer, no siempre las conclusiones han sido coincidentes, lo que puede ser debido a la heterogeneidad de la exposición, a las diferencias étnicas de las poblaciones estudiadas, o a problemas de diseño de los experimentos. Así, por ejemplo, el tamaño de

las poblaciones en estudio o los factores potenciales de confusión (edad, sexo, hábitos de consumo) pueden contribuir a las divergencias encontradas entre estudios (Goode *et al.*, 2002; Ladiges *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2005b; Skjelbred *et al.*, 2006).

Haciendo un breve repaso de los estudios de asociación de *Arg399Glu* con el riesgo de cáncer hallamos que, para el carcinoma de mama, algunos autores encuentran una asociación positiva para el alelo variante (Duell *et al.*, 2001, Ladiges *et al.*, 2003); sin embargo, otros no lo asocian al riesgo (Shu *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Figueiredo *et al.*, 2004). Otros autores señalan que es la combinación con el alelo variante del SNP del codón 280 la causa del incremento en el riesgo (Moullan *et al.*, 2003).

Para el cáncer de pulmón, la asociación del genotipo variante con el riesgo es positiva en algunos estudios (Divine *et al.*, 2001; Hoeijmakers, 2001b; Park *et al.*, 2002), pero en otros no se asocia el riesgo a ninguno de los genotipos (Butkiewicz *et al.*, 2001; David-Beabes y London, 2001; Ratnasinghe *et al.*, 2001; Misra *et al.*, 2003). El alelo variante *399Gln* no se ha considerado relevante para el riesgo de cáncer de vejiga sino que más bien se le ha atribuido un efecto protector para este tumor (Matullo *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 2001 a,b; 2002; Shen *et al.*, 2003; Sanyal *et al.*, 2004), al igual que sucede con el cáncer de próstata (Tuimala *et al.*, 2002; van Gils *et al.*, 2002; Rybicki *et al.*, 2004). En relación a la linfomagénesis parece que este polimorfismo juega un papel limitado, ya que ningún genotipo se ha relacionado con un aumento del riesgo a desarrollar linfomas o leucemias (Seedhouse *et al.*, 2002; Matsuo *et al.*, 2004).

Se ha sugerido que el alelo *399Gln* incrementa la susceptibilidad al cáncer de páncreas inducido por tabaco (Duell *et al.*, 2002), e igualmente se le relaciona con el carcinoma hepatocelular de un modo dependiente de la dosis alélica (Yu *et al.*, 2003). Con frecuencia, la sustitución de arginina por glutamina se correlaciona con una disminución del riesgo de adenomas y carcinomas colorectales (Duarte *et al.*, 2005a; Hong *et al.*, 2005; Skjelbred *et al.*, 2006) aunque, a veces, el cambio ha sido capaz de incrementar la susceptibilidad al tumor, sobre todo si está asociado con el genotipo variante del codón 194 (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). El alelo *399Gln* se ha asociado indistintamente a carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello y carcinomas de células basales, ya sea como factor de riesgo (Sturgis *et al.*, 1999; Olshan *et al.*, 2002; Tuimala *et al.*, 2002), o de protección (Ladiges *et al.*, 2003). A este genotipo, además, se le ha otorgado una relación inversa con el riesgo de cáncer de piel (Goode *et al.*,

2002; Nelson *et al.*, 2002) y de esófago, sobre todo en los consumidores de alcohol (Lee *et al.*, 2001).

En el caso particular del cáncer de tiroides los estudios son escasos y, hasta donde conocemos, una publicación señala que el genotipo *Gln/Gln* actúa como un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer papilar (Zhu *et al.*, 2004), mientras que en otra lo asocian con una reducción no significativa del riesgo (Mertens *et al.*, 2004).

Las asociaciones derivadas de estos estudios apoyan el postulado de que cada genotipo de *Arg399Gln* se relaciona con una actividad enzimática determinada (Wang *et al.*, 2003). Conociendo que la delección completa de *XRCC1* es letal, únicamente los polimorfismos pueden producir cambios sutiles en la actividad de la enzima (Ladiges *et al.*, 2003), siendo más notable la influencia si el cambio de aminoácidos se produce en un sitio conservado (Sturgis *et al.*, 1999; Thacker y Zdzienicka, 2003). Sin embargo, una de las características más intrigantes que tiene *XRCC1* es la ausencia de actividad enzimática intrínseca, con lo cual quedaría reducida su función a actuar como proteína chaperona; no obstante, se ha observado que en la orquestación del mecanismo reparativo *XRCC1* no se limita tan sólo a propiciar la asociación de proteínas para actuar sobre el sitio ábasico, sino que también regula la función de estas proteínas en el mecanismo BER. Baste citar el ejemplo de interacción con la polimerasa β ; esta proteína interactúa por su región amino o carboxiterminal, con los residuos de aminoácidos en la región N terminal de *XRCC1* para formar un complejo ternario con el DNA. Específicamente, *XRCC1* se enlaza con el lado cóncavo de la curva del DNA mellado, mientras que la polimerasa β lo hace por el convexo, lo que implica que el DNA dañado quede estrechamente rodeado por las proteínas reparadoras, garantizándose la precisión y efectividad en el reconocimiento y reparación, al no dejar espacio a la actuación de otras enzimas. Por consiguiente, es lógico que las distorsiones en este dominio de interacción de *XRCC1*, como consecuencia de SNPs, pueden afectar la fidelidad de la polimerasa β y del mecanismo BER (Lunn *et al.*, 1999; Bhattacharyya y Banerjee, 2001; Lee *et al.*, 2001). De hecho, es reconocido que el mecanismo BER se hace errático en tejidos con altos niveles de daño, posiblemente por fallos en la lectura y pobre discriminación de los nucleótidos a introducir, por parte de la polimerasa β .

Otros dominios de *XRCC1* también pueden verse afectados por variaciones en la secuencia del DNA; así, por ejemplo, las mutaciones dentro del dominio BCRTII (de interacción con la DNA ligasa III) impiden la reparación de simple cadena en la fase G1 del ciclo celular (Lee *et al.*, 2001, Ladiges *et al.*, 2003). En conclusión, los

polimorfismos de *XRCCI* pueden jugar un papel importante en la carcinogénesis asociada a toxinas ambientales, aunque aún se requiere un conocimiento más profundo sobre sus mecanismos de acción (Lunn *et al.*, 1999; Bhattacharyya y Banerjee, 2001; Lee *et al.*, 2001).

La localización de *Arg399Gln* en el dominio carboxiterminal de BRCT I (Duell *et al.*, 2000; 2002; Lee *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003) pudiera explicar la reducción en la capacidad reparadora que se ha asociado con este SNP (Abdel-Rahman y El-Zein, 2000). Este dominio de enlace con PARP parece ser importante en la detección del daño en el DNA, así como en el enlace al extremo de éste, en la multimerización y en la estabilidad genética. Su participación es importante en la reparación de roturas de simple cadena tanto en G0, como en S/G1. De modo, que este polimorfismo de *XRCCI* pudiera influir en la función de PARP, lo que se traduciría en una reducción de la fidelidad de la vía de reparación y en un elevado número de roturas de simple cadena (Shen *et al.*, 2000; Divine *et al.*, 2001).

En concordancia con esta hipótesis, varios estudios sobre funcionalidad indican que hay asociación del alelo variante *399Gln* con una mayor frecuencia de mutación en el gen de la glicoforina, con altos niveles de aductos, con mayor tasa de intercambio entre cromátidas hermanas (SCE), con incrementos en la sensibilidad a la radiación ionizante (como medida de un retraso prolongado del ciclo celular), y un mayor número de roturas en el DNA. Todo esto sugiere una menor eficacia de la reparación (Lunn *et al.*, 1999; Abdel-Rahman y El-Zein *et al.*, 2000; Duell *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2001; Lei *et al.*, 2002; Laffon *et al.*, 2004; Norppa *et al.*, 2004; Vodicka *et al.*, 2004).

Los estudios en humanos, que relacionan la presencia de polimorfismos en genes de reparación con la velocidad de reparación, han revelado que los homocigotos *Arg/Arg* del polimorfismo del codón 399 de *XRCCI* tienen una *velocidad* de reparación del daño (inducido por irradiación) dos veces mayor que los homocigotos para el cambio. Las *velocidades* de reparación más bajas se traducen en altos niveles de roturas de simple cadena y de aberraciones cromosómicas (Vodicka *et al.*, 2004). Este hallazgo sustentaría el por qué varios estudios epidemiológicos de asociación con el cáncer citan al genotipo *399Gln* como el de riesgo.

Sin embargo, hay que señalar que otros estudios de correlación del genotipo con biomarcadores de daño al DNA en tejidos y en células humanas, apuntan que el genotipo mutante no tiene influencia en la incidencia de SCE y de AC (Sturgis *et al.*,

1999; Shen *et al.*, 2000; Matullo *et al.*, 2001b; Norppa 2004; Sanyal *et al.*, 2004), y no se detectan diferencias en la capacidad de reparar roturas de simple cadena entre este alelo y el salvaje. Así, hay bastantes estudios de asociación que llegan a la conclusión de que el genotipo salvaje *Arg/Arg* es el que se asocia al riesgo (Seedhouse *et al.*, 2002; Andreassen *et al.*, 2003; Ladiges *et al.*, 2003; Shu *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Figueiredo *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2005b; Hong *et al.*, 2005; Skjelbred *et al.*, 2006).

Nuestros resultados, sin llegar a ser significativos, son más concordantes con este último hallazgo. Taylor y colaboradores señalan que los resultados epidemiológicos son controvertidos en relación a cual de los alelos es el detrimental porque, si bien el dominio BRCT I es importante para la eficiente reparación de roturas de simple cadena, los polimorfismos en este dominio no afectan particularmente su funcionalidad (Taylor *et al.*, 2002). Por otra parte, estos análisis presentan la dificultad adicional de la colocación en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13.2-13.3) de otros genes de reparación, tales como *ERCC1*, *ERCC2* y DNA ligasa I. En tal sentido los SNPs en estos genes pueden contribuir al efecto del polimorfismo de *XRCC1*. Esta interpretación podría tornarse más compleja cuando las interacciones implican a otros polimorfismos en un contexto genómico más amplio (Relton *et al.*, 2002).

De ser cierta nuestra observación de que el alelo variante disminuye el riesgo, podríamos sugerir tres hipótesis para interpretar el hallazgo. En primer lugar, que el cambio confiera una ventaja en la función reparadora de *XRCC1*. Sin embargo, lo más esperado es que el alelo asociado a la mayor eficacia sea el más frecuente, conjeturando entonces que esta menor frecuencia en relación a la del alelo “menos protector”, es la consecuencia de una reciente adquisición o que no representa una ventaja selectiva para la capacidad reproductiva. La segunda hipótesis consideraría que el cambio si afecta a la eficiencia pero todavía propicia una reducción del riesgo. En esta situación, las células con altos niveles de daño y menor capacidad de reparación permitirían los procesos apoptóticos y con ello la ventaja de que no haya expansión clonal de mutaciones derivadas de errores en la reparación. Otra hipótesis es que otro gen polimórfico y funcional pudiera estar en desequilibrio de ligamiento con *XRCC1* (Stern *et al.*, 2001).

Nuestros resultados no concuerdan con el único referente que encontramos para el carcinoma diferenciado de tiroides, en que el genotipo mutante *Glu/Glu*, en poblaciones chinas, produjo 4,65-veces más riesgo de desarrollar cáncer que el genotipo *Arg/Arg* (OR=4,65, IC 95%: 1,24–17,45) (Zhu *et al.*, 2004). Las discordancias pueden derivarse de las propias relacionadas con la etnia, o del entorno ambiental. Ya hemos

comentado como en diversos escenarios de daño en el DNA, el efecto de los alelos puede variar. Así, en situaciones de mucho daño, el mecanismo BER se puede saturar y las diferencias entre el alelo funcional y el menos funcional se reducen, con lo cual el alelo *Arg* se torna funcionalmente deletéreo (Andreassen *et al.*, 2003).

Si bien el polimorfismo del codón 399 de *XRCCI* ha sido bastante estudiado, no son tan numerosos los estudios que han evaluado el papel del polimorfismo *Arg280His* de *XRCCI*. En uno de los estudios de asociación con el cáncer de pulmón, se halló que el alelo mutado *His* tiene relevancia, tanto en heterocigosis como en homocigosis, sobre el riesgo. Los individuos con la variante alélica tuvieron un 80% más de riesgo que los homocigotos para el genotipo salvaje. Los valores de ORs se incrementaron tanto en el análisis de genotipos como en el de haplotipos en casi tres veces para el alelo *His* (Ratnasinghe *et al.*, 2001). Sin embargo, en otro estudio para este tipo de cáncer, los incrementos de ORs no alcanzaron significación estadística (Misra *et al.*, 2003).

Los estudios de asociación con el cáncer de vejiga y de esófago, han sugerido que el alelo variante incrementa el riesgo, a pesar de que el reducido tamaño de la población limitó el poder de análisis (Butkiewicz *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2002). En el cáncer de próstata el alelo variante se asoció con un ligero incremento en el riesgo (van Glis *et al.*, 2002). En relación al carcinoma de mama los resultados son discordantes, algunos no asocian el cambio con el riesgo (Chacko *et al.*, 2005), pero otros autores observan que el genotipo variante incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama, tanto en pacientes sensibles como no a la radiación ionizante (Moullan *et al.*, 2003). El meta-análisis de los estudios de asociación entre genes de reparación BER y riesgo de cáncer ha evidenciado la falta de asociación entre el alelo *His* y el cáncer de pulmón, los carcinomas de vías aéreas y digestivas altas y los cánceres relacionados con el tabaco (Hung *et al.*, 2005a). Contrariamente, este alelo se ha considerado factor de riesgo para leucoplaquias, cáncer en fumadores (Majumder *et al.*, 2005), y adenomas (Skjelbred *et al.*, 2006). Además, se ha encontrado que los portadores del genotipo *Arg/His+His/His* tienen un mayor riesgo de envenenamiento crónico por benceno que los individuos con genotipo *Arg/Arg* (Zhang *et al.*, 2005).

El significado funcional de *Arg280His* no está del todo dilucidado, aunque se conoce que el codón 280 se localiza en un sitio de enlace al antígeno nuclear de proliferación celular, en la región bisagra, entre el dominio de interacción con la Pol β y con PARP (Hung *et al.*, 2005a). En estudios funcionales se ha demostrado que este

polimorfismo influye en el nivel de daño inducido por bleomicina, y que los portadores de la variante alélica en homo- o heterocigosis presentan una frecuencia de aberraciones cromosómicas, especialmente roturas cromosómicas, mayor que los homocigotos salvajes (Tuimala *et al.*, 2002; 2004). Asimismo, Mateuca y colaboradores describen que los portadores del alelo *280His* tiene mayor daño genético, después de la exposición al cobalto y al polvo de metales pesados, y señalan se debe a que la proteína variante tiene una capacidad reducida para localizar el daño, y menor eficiencia en la reparación (Mateuca *et al.*, 2005; Skjelbred *et al.*, 2006).

El incremento en la susceptibilidad al cáncer de tiroides detectada en los heterocigotos, en nuestro estudio, apoya los argumentos y resultados precedentes en relación a la repercusión que el alelo *His* tiene sobre la función reparadora de XRCC1 y, en última instancia, en la carcinogénesis.

El codón 194, al igual que el 280, está localizado en una región hidrofóbica de la bisagra entre el dominio de interacción con la pol β y con PARP, particularmente próximo al dominio N terminal de XRCC1 (Marintchev *et al.*, 1999a,b; Lee *et al.*, 2001; Laffon *et al.*, 2004). Algunos autores plantean que un cambio aminoacídico en esta región probablemente no causa variaciones en la función de reparación (Lunn *et al.*, 1999; Abdel-Rahman y El-Zein, 2000; Shen *et al.*, 2000; van Gils *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Laffon *et al.*, 2004); sin embargo, al polimorfismo *Arg194Trp* del exón 6 de *XRCC1* se le ha correlacionado con diversos tipos de cáncer. En la mayoría de las publicaciones se indica que el alelo *Trp* reduce el riesgo (Sturgis *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2000; Winsey *et al.*, 2000; David-Beabes y London, 2001; David-Beabes *et al.*, 2001; Duell *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Ratnasinghe *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 2001, 2002; Goode *et al.*, 2002; Ohlsan *et al.*, 2002). El estudio más exhaustivo de asociación alélica con el riesgo de cáncer de mama reveló una relación inversa y significativa para el alelo mutante de *Arg194Trp* (Patel *et al.*, 2005). Efectos protectores similares se han descrito para carcinomas gástricos, de pulmón, vejiga, esófago y piel (Goode *et al.*, 2002).

Estudios funcionales sobre la capacidad reparadora no han relacionado este polimorfismo con variaciones en los niveles de aductos, ni en la frecuencia de mutaciones en el gen de la glicoforina A (Tuimala *et al.*, 2002; Norppa 2004). En relación a la sensibilidad a la radiación ionizante y a los compuestos radiomiméticos, los resultados son variables ya que mientras unos no encuentran relación (Tuimala *et*

al., 2002), otros describen que el alelo variante del codón 194 de *XRCCI* muestra un efecto protector significativo frente a la radiación ionizante (De Ruyc *et al.*, 2005). Aunque este polimorfismo tampoco ha mostrado influencia sobre la frecuencia de SCE (Duell *et al.*, 2000; Tuimala *et al.*, 2004); el genotipo heterocigoto exhibió una menor frecuencia de aberraciones cromosómicas (Tuimala *et al.*, 2002, 2004; Wang *et al.*, 2003).

Nuestros resultados coinciden con publicaciones precedentes de que, en poblaciones caucásicas, el genotipo variante *Arg194Trp* tiene efecto protector sobre los procesos oncogénicos en varios órganos. Por el contrario, Zhu y colaboradores no han encontrado asociación entre este alelo y el riesgo a desarrollar carcinoma papilar tiroideo en poblaciones chinas (Zhu *et al.*, 2004). Esta disparidad puede ser consecuencia de las diferencias étnicas, o del carácter y los niveles de exposición.

Contando con el genotipado de más de un polimorfismo del gen *XRCCI*, decidimos estimar las frecuencias haplotípicas y analizar la asociación de los haplotipos de *XRCCI* con el riesgo de cáncer de tiroides. El análisis combinado de genotipos y haplotipos suele ser más informativo que cualquiera de los dos por separado, aunque hay cierta discusión sobre cual análisis es preferible en cada situación (Clayton *et al.*, 2004, Iniesta *et al.*, 2005). El estudio de los haplotipos aumenta el poder de detección de la asociación con la enfermedad, en la medida que es mayor la heterocigosidad y es más estrecho el desequilibrio de las mutaciones que causan la enfermedad (Goode *et al.*, 2002). Además, estos estudios de múltiples *loci* ofrecen la ventaja de no tener que asumir que los polimorfismos genotipados son funcionales, sino que, aumentan las posibilidades de que una variante funcional no genotipada pueda estar en desequilibrio de ligamiento con los polimorfismos genotipados (Goode *et al.*, 2002).

El valor más bajo de OR se observó en el haplotipo *399Gln-280Arg-194Trp*, que combina los alelos de menor riesgo de cada genotipo. El hecho de que el haplotipo *399Arg-280Arg-194Trp*, que sólo difiere del más frecuente por el alelo variante *194Trp*, también tenga relación inversa con el riesgo de cáncer, corrobora que la sustitución en el codón 194 de *XRCCI* es concordante con una reducción de la susceptibilidad. Por el contrario, tanto el haplotipo *399Gln-280His-194Arg* como el *399Arg-280His-194Arg* están más representados en los pacientes, aunque en una asociación con significación marginal, cuando se compara con el haplotipo más frecuente. Sin embargo, si estos haplotipos se comparan con el haplotipo que combina los alelos de menor riesgo de cada polimorfismo *399Gln-280Arg-194Trp*, el riesgo asociado a ellos se incrementa

significativamente en 10,5 y 6,0 veces, respectivamente. Ambos haplotipos reflejan los resultados observados en los análisis de genotipos del codón 280 y 194 por separado. La observación de que, en cualquiera de los haplotipos donde están los alelos *280His* y *194Arg*, la relación con el riesgo es positiva confirma la interpretación del efecto que tienen los polimorfismos *Arg194Trp* y *Arg280His* sobre la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Para asegurar que los incrementos de riesgo asociados a uno u otro genotipo no son espúreos, es decir reflejo del desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo ciertamente funcional, hicimos un análisis de genotipo para cada uno de los polimorfismos ajustado para el otro. El polimorfismo *Arg194Trp* mantuvo los estimadores (OR= 2,26; IC= 0,98-5,20) y la significación estadística $p=0,05$ (*Arg/Arg* vs *Arg/Trp*), y también el polimorfismo *Arg280His* conserva su valor de OR (1,67, IC:0,97-2,86) con valores de p cercanos a la significación estadística ($p=0,06$), con lo cual parece que son coherentes las asociaciones hechas a partir de los genotipos y ambos polimorfismos confieren susceptibilidad al cáncer, aunque el del codón194 parece contribuir en mayor medida. El hecho de que el segundo haplotipo en frecuencia *399Gln-280Arg-194Arg* sólo difiera del primero por el alelo variante del polimorfismo *Arg399Gln* sugiere que este SNP no está ligado con los del codón 280 y 194, ya que un indicador de que hay alta correlación entre SNPs es que sus formas variantes aparecen simultáneamente en un haplotipo frecuente. Estas deducciones son corroboradas por el análisis de ligamiento que da por resultado valores de $D'=0,46$ para la combinación 399-280 y $D'=0,15$ para la combinación 399-194; ambos valores indican equilibrio, y con ello segregación independiente, mientras para la combinación 280-194 sí que detecta ligamiento con una $D'=0,97$. Los valores de D' concuerdan con lo descrito acerca de la estructura de XRCC1 y las distancias físicas entre *loci*; así por ejemplo, los *loci* 194 y 280 están situados muy próximos en la región bisagra que separa los dos dominios globulares de XRCC1. A su vez, se deduce que 399 está más distante de 194 que de 280, ya que 399 está en la región central del dominio BRCTI y 194 en la región bisagra más cercana al dominio NTD, mientras que 280 está más próximo al dominio BRCTI en la región de señalización nuclear NLS.

A pesar, de la importancia de los análisis de haplotipos, los datos publicados al respecto son casi nulos. En más de 30 estudios epidemiológicos que evalúan la asociación entre polimorfismos en genes de reparación y cáncer hallamos contadas citas al respecto, una indica desequilibrio de ligamiento para el haplotipo *399Gln-194Trp* en el cáncer de mama (Smith *et al.*, 2003) y otra resalta el incremento del riesgo de

envenenamiento por benceno para individuos con los alelos *399Arg-280His-194Arg* de *XRCC1* sugiriendo que los polimorfismos del codón 194 y 280 de *XRCC1* contribuyen a dicho riesgo en la población china (Zhang *et al.*, 2005). Este estudio mostró incrementos de 2,96 veces (OR, 2,96; 95% IC, 1,60-5,49; p=0,001) en el riesgo de envenenamiento para sujetos con esa combinación de alelos de *XRCC1*, incluso cuando se comparó con aquellos que portan los alelos *399Arg-280Arg-194Arg*, lo que confirma la asociación del alelo *280 His* con un mayor riesgo (Zhang *et al.*, 2005)

De forma similar, el análisis de haplotipos también ha confirmado que el alelo *His* del codón 280 incrementa el riesgo al cáncer de pulmón y el *Trp* de 194 lo disminuye. La combinación que implica al alelo variante *280His* confirió tres veces más riesgo que el haplotipo donde los alelos de *XRCC1* eran de tipo salvaje (Ratnasinghe *et al.*, 2001).

En cambio, otros estudios hallan que los polimorfismos *Arg280His* y *Arg399Gln* de *XRCC1* están en desequilibrio de ligamiento, de manera que el alelo variante del codón 280 cosegrega con el salvaje del codón 399. Así, los autores describen que cuando estos polimorfismos están combinados sus efectos aparecen independientemente. Los portadores de la variante del codón 399 tuvieron un efecto protector no significativo y, por el contrario los individuos heterocigotos del codón 280 incrementaron significativamente su susceptibilidad al cáncer de colon (Skjelbred *et al.*, 2006).

Debemos puntualizar que, por el hecho de que los polimorfismos *Arg280His* y *Arg194Trp* muestren resultados de asociación con el riesgo, no podemos concluir de forma absoluta de que estos alelos sean realmente los causantes de modificar el riesgo de la enfermedad. Para ello, sería necesario contar con información de estudios funcionales que demostrasen un efecto biológico diferente entre los alelos (Ladiges, 2006); así, a la asociación observada podrían contribuir otro u otros polimorfismos, no estudiados, que estuviese altamente correlacionados.

Si la integridad de *XRCC1* es importante es para el buen funcionamiento de BER, no lo es menos la actuación de *OGG1*. La proteína *OGG1* es una glicosilasa con actividad AP liasa intrínseca que cataliza la remoción de los aductos de 8-OHdG como parte del mecanismo BER. La actuación de la enzima depende del ataque nucleofílico de su lisina sobre el enlace N-glicosídico del DNA (Marsin *et al.*, 2003).

El gen *OGG1* está somáticamente mutado en algunos cánceres y es altamente polimórfico en las poblaciones humanas. De las más de 20 variantes que se conocen, en

la secuencia de esta glicosilasa, la más estudiada es la que implica la sustitución en el codón 326 de serina por cisteína, *Ser326Cys* (Hung *et al.*, 2005b)

Teóricamente, la susceptibilidad al cáncer puede variar en dependencia del genotipo de *Ser326Cys* de *OGGI*. Este supuesto se basa en las evidencias de que el alto contenido de 8-oxo-guanina en el DNA se ha asociado con un incremento de riesgo al cáncer y que los alelos del polimorfismo *Ser326Cys* influyen de manera diferente sobre la actividad enzimática (Kohno *et al.*, 1998). Además, los estudios epidemiológicos que detectan asociación de cáncer con el alelo *326Cys* avalan esta hipótesis (Kim *et al.*, 2003).

De hecho, la asociación de este polimorfismo con el riesgo para diversos tumores refleja resultados bastante coherentes, independientemente de las diferencias étnicas. El meta-análisis de los más de 30 estudios realizados para esta variante de *OGGI* refiere incrementos significativos en los valores de ORs asociadas al genotipo *Cys/Cys* en el cáncer de pulmón, de vías aerodigestivas altas y de próstata (Goode *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2005b). Sin embargo, otros autores sugieren un papel menor para este polimorfismo en la tumorigénesis de pulmón en poblaciones caucásicas (Hardie *et al.*, 2000; Wikman *et al.*, 2000).

Valores de OR por debajo de la unidad revelan una relación inversa del genotipo variante con el riesgo para el cáncer de estómago (Hung *et al.*, 2005b); y, estudios recientes con poblaciones nórdicas sobre susceptibilidad al cáncer de mama no encuentran asociación entre genotipo y cáncer (Vogel *et al.*, 2003, 2004). También se sugiere que este polimorfismo no incrementa el riesgo de cáncer de colon (Kim *et al.*, 2003), ni la susceptibilidad a mesoteliomas malignos inducida por el amianto (Dianzani *et al.*, 2006). Finalmente, y a pesar de su relevancia en la reparación del DNA, no se ha encontrado tampoco asociación significativa con tumores laríngeos (Monteiro *et al.*, 2005) ni cervicales, en la población japonesa (Niwa *et al.*, 2005).

En modelos experimentales se ha descrito que la inactivación del gene *Ogg1* en levaduras y en ratones incrementa la frecuencia de mutación espontánea (Shinmura y Yokota, 2001). A su vez, estudios funcionales para este polimorfismo en el ensayo de complementación en *Escherichia coli* deficiente en la reparación de 8-OHdG, sugieren que el alelo *Ser* tiene capacidad reducida para reparar el aducto 8-oxoguanina o baja afinidad por el sustrato (Kohno *et al.*, 1998). Por el contrario, hay estudios con líneas celulares humanas en los que la sustitución del alelo no se asocia con variación en la actividad funcional enzimática de *OGGI* (Wikman *et al.*, 2000; Janssen *et al.*, 2001;

Goode *et al.*, 2002), ni se ha encontrado correlación entre el genotipo variante *Cys/Cys* y los niveles de 8oxoG en el DNA (Hardie *et al.*, 2000). Las discordancias de estos estudios funcionales *in vivo* o *in vitro* ha sido recientemente revisada y, aunque en términos generales se asocia el cambio a una reducción enzimática, los resultados no son concluyentes para poder afirmar que el polimorfismo en *OGG1* afecte de manera importante a la función reparadora y a la carcinogénesis (Park *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2005b; Weiss *et al.*, 2005; Arai *et al.*, 2006).

En nuestro estudio ningún genotipo incrementó las ORs de manera significativa, con lo cual podemos decir que el polimorfismo *Ser326Cys* de *OGG1* no afectó la susceptibilidad al cáncer de tiroides en la población española muestreada, indicando su irrelevancia en la carcinogénesis del tiroides, al menos en las condiciones a las que se encontró expuesta nuestra población.

Genes de reparación de roturas dobles por recombinación homóloga

Las roturas de doble cadena son el daño más pernicioso que sufre el DNA, y son frecuentemente inducidas por xenobióticos químicos o por radiación ionizante. Estas lesiones se traducen en roturas cromosómicas y reordenamientos que pueden conducir a la apoptosis o a la tumorigénesis. De hecho, se reconoce a la radiación ionizante como un factor importante de riesgo en la malignización de las células tiroideas, con lo cual las roturas de doble cadena son de las lesiones del DNA que más comúnmente subyacen en la carcinogénesis del tiroides. La reparación, por recombinación homóloga, es uno de los mecanismos con que cuentan las células para eliminar las roturas de doble cadena (Kuschel *et al.*, 2002), de lo que se infiere lo atinado de evaluar el efecto que sobre la susceptibilidad al cáncer de tiroides tienen las variaciones en los genes implicados en este mecanismo. Dentro de los más de 20 genes que involucra esta vía de reparación se encuentran *XRCC2* y *XRCC3*. Estos genes, parálogos de *RAD51* facilitan la formación del *foci* *RAD51* y la estabilización del multímero de *RAD51*, con el sitio dañado del DNA (Liu *et al.*, 1998; Masson *et al.*, 2001; Sonoda *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006).

Los polimorfismos de estos genes son buenos candidatos como marcadores de susceptibilidad en diferentes tumores. Sin embargo, hasta el presente, no hay estudios de la posible asociación de polimorfismos en genes de reparación por recombinación

homóloga y el cáncer de tiroides; de hecho, tampoco son numerosas las evaluaciones de asociación de polimorfismos de *XRCC2* con el desarrollo de otros procesos tumorales.

Nuestro hallazgo de que el genotipo *Arg/Arg* de *XRCC2* incrementa el riesgo contrasta con lo obtenido para el cáncer pancreático, donde el alelo variante *His/His* es el que reduce de manera significativa la supervivencia a este carcinoma (Li *et al.*, 2006). También, para el cáncer de mama, Rafii y colaboradores citan que hay una asociación significativa entre el alelo variante, dependiente del número de copias, y el riesgo (Rafii *et al.*, 2002). Pero, hay que señalar que para este cáncer los resultados no son congruentes, ya que algunos autores refieren una asociación marginalmente significativa con el alelo variante (Kuschel *et al.*, 2002), y otros estudios llegan a la conclusión que no hay asociación entre este polimorfismo *XRCC2* y el riesgo de cáncer de mama (Han *et al.*, 2004c; Millikan *et al.*, 2005; García-Closas *et al.*, 2006). El genotipo homocigoto variante se considera de riesgo para el cáncer faríngeo (Benhamou *et al.*, 2004) y, en cambio, para el carcinoma de células basales, el melanoma y el cáncer de ovario se asocia con una reducción del riesgo (Han *et al.*, 2004 a; Auranen *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2005). Finalmente, la susceptibilidad al adenoma colorectal no parece verse afectada por este polimorfismo (Tranah *et al.*, 2004)

El polimorfismo *Arg188His* de *XRCC2* es un cambio no conservativo en una región codificante, pero que no pertenece a ningún dominio funcional conocido de *XRCC2* (Liu *et al.*, 1998 Kuschel *et al.*, 2002). Por ello, su papel en el funcionamiento de *XRCC2* es desconocido, aunque es interesante mencionar que parece tener una función conservada puesto que las comparaciones de las proteínas *XRCC2* humana, de ratón y de hámster muestran que la arginina en la posición 188 es invariante. Recientemente se han descrito regiones que participan en la interacción con otras proteínas de la familia RAD51, pero el polimorfismo en análisis tampoco se solapa con estas regiones.

Hay un solo estudio publicado que aborda las consecuencias funcionales de los alelos del codón 188 de *XRCC2*, donde se indica que tanto las células con una delección del aminoácido, como con una sustitución de la arginina cargada positivamente por la alanina neutra fueron más sensibles a los efectos de la mitomicina C que las células con el alelo salvaje; sin embargo, la sustitución por histidina no representó variaciones sustanciales en la supervivencia, ni frente a las mayores dosis de exposición al mutágeno. Esto indica que el cambio que implica este polimorfismo tiene efectos sutiles sobre la habilidad para reparar los daños inducidos en el DNA (Rafii *et al.*, 2002).

A modo de resumen, aceptamos que el SNP *Arg188His* de *XRCC2* muestra evidencias de asociación con el cáncer de tiroides. Si consideramos, además, los precedentes epidemiológicos y las pruebas funcionales podemos hacer varias observaciones: estamos en presencia de una fuerte interacción gen-ambiente que es específica de cada tumor; la capacidad reparadora mayor del alelo más frecuente *Arg* se limita a un contexto de bajos niveles de daño al DNA; quedando abolida esa aparente ventaja funcional cuando los daños son extensos (Han *et al.*, 2004b).

En nuestro estudio apreciamos que la sustitución del aminoácido en el codón 241, correspondiente a *Thr241Met* de *XRCC3* no provoca variaciones significativas en los valores de ORs.

El papel de este polimorfismo de *XRCC3*, en relación a la susceptibilidad a cánceres de diversos órganos, ha sido ampliamente estudiado en epidemiología molecular. Se ha descrito que incrementa la susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama (Kuschel *et al.*, 2002; Garcia-Closas *et al.*, 2006) o, por el contrario, que no tiene relación con este riesgo (Jacobsen *et al.*, 2003). No aumenta el riesgo para el cáncer de pulmón (Butkiewicz *et al.*, 2001; David-Beabes *et al.*, 2001; Misra *et al.*, 2003; Zienolddiny *et al.*, 2006), estómago (Shen *et al.*, 2004), carcinoma colorectal (Tranah *et al.*, 2004; Skjelbred *et al.*, 2006) y piel (Jacobsen *et al.*, 2003); mientras que su relación con el riesgo de cáncer de ovario es inversa y dependiente de la dosis alélica (Auranen *et al.*, 2005)

Los resultados para el melanoma son confusos, unos refieren asociación con el riesgo (Winsey *et al.*, 2000) y otros no (Duan *et al.*, 2002; Bertram *et al.*, 2004). Algunas investigaciones no hallan evidencias de asociación con el riesgo de cáncer de vejiga (Matullo *et al.*, 2001a; Stern *et al.*, 2001, 2002; Sanyal *et al.*, 2004) pero otras sí (Matullo *et al.*, 2005). Finalmente, el genotipo *Thr/Thr* se ha asociado con un incremento de la susceptibilidad a la leucemia (Seedhouse *et al.*, 2004), la fibrosis subcutánea y la ataxia telangiectasia (Andreassen *et al.*, 2003).

Son escasas las evidencias de que este polimorfismo altere la función de la proteína. A favor de su posible efecto funcional está la propia naturaleza de la sustitución, se trata de un cambio no conservativo de un hidroxilaminoácido de un residuo hidrofílico neutral por uno hidrofóbico con un grupo sulfhidrilo y esto debería variar el entorno electrónico de la proteína, traducible en un cambio de su función. En contra de su relevancia en la funcionalidad proteica está que el cambio no se localiza en

un dominio de enlace al ATP, que es el único dominio funcional descrito hasta el momento (Winsey *et al.*, 2000; Matullo *et al.*, 2001; Kuschel *et al.*, 2002).

Los efectos funcionales de este polimorfismo permanecen prácticamente desconocidos. Se dispone de alguna información acerca de la asociación de la variante *Met* con niveles elevados de aductos en linfocitos, lo que sugiere el posible papel de XRCC3 en la reparación de aductos (Matullo *et al.*, 2001b). También se ha comentado una asociación altamente significativa entre esta variante y la inducción de micronúcleos cinetocóro positivos en fumadores (Stern *et al.*, 2002). Sin embargo, otros autores no observan que esta variante tenga especial influencia sobre la sensibilidad al daño inducido por mitomicina, lo cual es coherente con la no asociación entre el alelo *Met* y el retraso en la fase G2 inducido por la radiación ionizante (Han *et al.*, 2004b). El polimorfismo del codón 241 de XRCC3 tampoco se ha descrito que afecte a los niveles de AC y SCE (Norppa, 2004; Tuimala *et al.*, 2004).

Los ligeros incrementos de ORs para el genotipo variante parecen indicar que este cambio de aminoácidos por sí solo no tiene repercusión en la actuación de la proteína y es irrelevante en el riesgo para desarrollar cáncer de tiroides. Sin embargo, en un artículo acerca de la asociación del polimorfismo con el riesgo de cáncer de tiroides, se cita que el genotipo homocigoto variante *Met/Met* está más presente en pacientes blancos no hispánicos con enfermedades benignas y cáncer diferenciado de tiroides, que en su correspondiente población control (Sturgis *et al.*, 2005). Esta discordante ausencia del efecto del polimorfismo en nuestro estudio, puede ser consecuencia de que las interacciones gen-ambiente en nuestra población no incrementen la susceptibilidad o que, un posible ligamiento con la mutación funcional difiera entre las etnias o que, realmente no sea XRCC3 un gen importante en la carcinogénesis de tiroides.

Los resultados obtenidos para el polimorfismo *IVS5-14* de XRCC3 indican que el genotipo homocigoto variante es menos frecuente entre los pacientes con cáncer de tiroides, en relación a los controles, y que este efecto protector recesivo es más relevante en los pacientes con cáncer papilar.

Los estudios epidemiológicos para contrastar nuestros resultados son escasos. Este polimorfismo ha sido, hasta fechas recientes, poco estudiado al parecer porque se ubica en una región no codificante (Liu *et al.*, 1998; Kuschel *et al.*, 2002). El interés por su estudio se ha incrementado en los últimos tiempos, a la luz de su considerable frecuencia en la población y sobre todo por la razón de que cualquier variante

potencialmente funcional, aún no siendo directamente ensayada, es probable que esté en desequilibrio de ligamiento con este SNP.

Así, por ejemplo, Kuschel y colaboradores refieren que el alelo 17893G tiene un efecto protector, aparentemente dominante: tanto los heterocigotos como los homocigotos para este alelo tienen una reducción significativa en el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Kuschel *et al.*, 2002). Sin embargo, también encontramos resultados de ausencia de asociación de este alelo con el riesgo de mama (Han *et al.*, 2004b).

En dos estudios casos-control que evalúan la asociación entre genes de reparación de roturas de doble cadena y cáncer colorectal, no se observó asociación para ninguno de los genotipos de *IVS5-14*, aunque sí una tendencia a que los pacientes acumularan el genotipo homocigoto sin el cambio (Tranah *et al.*, 2004). En el cáncer de ovario y también en el de riñón, la variante alélica se asoció a un efecto protector (Auranen *et al.*, 2005; Matullo *et al.*, 2005)

De Ruyck y colaboradores señalan, por el contrario, que los portadores de este alelo tienen mayor riesgo de desarrollar reacciones tardías a la radioterapia (De Ruyck *et al.*, 2005). En concordancia con este resultado, recientemente se ha publicado una relación directa con el riesgo para el alelo mutante de este polimorfismo; así, los homocigotos para el cambio tuvieron más mortalidad entre los pacientes aquejados de cáncer de páncreas. Los autores de este trabajo sugieren que este alelo puede afectar la eficiencia en la reparación de roturas de doble cadena inducidas por la radiación (Li *et al.*, 2006).

Del análisis de las combinaciones de los polimorfismos *IVS5-14* (A17893G) *Thr241Met* (C18067T) de *XRCC3* obtuvimos que los haplotipos AT y GT se asociaron con incrementos no significativos de riesgo; en tanto que el haplotipo GC fue asociado con una reducción del riesgo para el cáncer de tiroides, aunque no significativa. Este haplotipo contiene el alelo *G-IVS5*, que en el análisis de genotipos ya ha sido asociado con la reducción del riesgo, lo cual confirma la observación del efecto protector del alelo. Sin embargo, la combinación AT, que implica los alelos de riesgo de ambos SNPs, respecto al haplotipo de menor riesgo GC, reveló incrementos significativos en el valor de OR. Con lo que asumimos que esta combinación de alelos se asocia a un riesgo mayor para el cáncer de tiroides.

Estos polimorfismos en combinación con un tercer SNP en la región 5'-UTR (A4541G) (*5'UTR:IVS5:Thr241Met*) han sido objeto de estudio en relación al cáncer de mama y se ha observado que los haplotipos AGC y GGC redujeron el riesgo de manera

no significativa, lo que parece ser coherente puesto que estos haplotipos contienen el 98% del alelo G de *IVS5*, que se ha asociado con una reducción del riesgo. El haplotipo AAT tuvo un efecto modesto sobre el riesgo, mientras que GAT tuvo un incremento significativo en el riesgo (Kuschel *et al.*, 2002). Jacobsen y colaboradores no encuentran relación entre el riesgo de mama y los polimorfismos/haplotipos de *XRCC3* (Jacobsen *et al.*, 2003). Las diferencias encontradas en las asociaciones del polimorfismo *Thr241Met*, y sus haplotipos, con el riesgo de cáncer de mama pueden ser reflejo de que el fenotipo susceptible depende de la interacción con el ambiente y que esas condiciones varían entre las poblaciones en estudio o también que el ligamiento a la mutación funcional responsable del efecto sea disímil entre grupos étnicos (Jacobsen *et al.*, 2003). De igual forma, se ha publicado otro artículo que no halla ninguna diferencia en los haplotipos de *XRCC3* entre controles y pacientes con cáncer de mama o de endometrio (Han *et al.*, 2004 b,c).

Para carcinomas de células basales y escamosas se ha observado que el haplotipo con el alelo variante *Met* estaba significativamente menos representado en los pacientes que en los controles (Han *et al.*, 2004a). El estudio haplotípico de *XRCC3*: 4541A>G, *IVS5-14*, *Thr241Met* en relación al cáncer de vejiga, reveló un elevado riesgo para portadores del alelo *Met*, fueran fumadores o no, en tanto que un ligero efecto inverso se asoció con el alelo G de *IVS5-14* en los fumadores. El haplotipo AAT incrementó el riesgo en fumadores y el haplotipo AAC redujo la susceptibilidad al cáncer de vejiga en todos los individuos (Matullo *et al.*, 2005). En otro estudio que evaluó el efecto sobre el riesgo de cáncer de pulmón, de igual combinación de polimorfismos de *XRCC3*, se observó que el haplotipo AAC tuvo mayor influencia sobre la susceptibilidad al cáncer de pulmón que GAC lo que sugiere que el riesgo se asocia al alelo del primer SNP y que la combinación de alelos de *IVS5-14* y *Thr241Met* es menos relevante (Jacobsen *et al.*, 2004).

Ninguno de los haplotipos de *XRCC3* se ha asociado con riesgo para el adenoma colorectal y tampoco se halló que estos polimorfismos estuviesen ligados (Tranah *et al.*, 2004). Resultados similares se han citado para el cáncer de ovario, donde ningún haplotipo tuvo efectos sobre la susceptibilidad a este carcinoma (Auranen *et al.*, 2005). Los haplotipos de *XRCC3* mostraron no ser significativamente diferentes entre controles y pacientes con linfoma folicular, no obstante atribuírsele a los polimorfismos del gen un importante efecto en la susceptibilidad al linfoma (Smedby *et al.*, 2006).

Después de considerar el modesto efecto de *Thr241Met* sobre el riesgo de cáncer de tiroides cuando se analiza sólo, en contraste con el incremento en la susceptibilidad cuando se estudia en combinación, podemos sugerir que este polimorfismo, en las condiciones de exposición estudiadas no modula la susceptibilidad al cáncer de tiroides y que, posiblemente, sean otras las variantes funcionales que influyen en el efecto (Sturgis *et al.*, 2005).

Genes relacionados con la síntesis hormonal del tiroides

Diversos meta-análisis sobre la epidemiología del cáncer de tiroides revelan que, junto a las radiaciones ionizantes, el bocio y las enfermedades benignas del tiroides, son los factores de riesgo más relevantes (Franceschi *et al.*, 1999; Hishinuma *et al.*, 1999, 2005).

Los desequilibrios hormonales constituyen uno de los principales mecanismos que causan enfermedades del tiroides, por lo cual todos los genes que codifican proteínas tiroideas, que participan en el control y en la síntesis de hormonas del tiroides, pueden estar involucrados en las patologías del tiroides, incluyendo la carcinogénesis de la glándula. Así, la relevancia que tiene los genes que codifican para TG y TSHR, en las patologías benignas del tiroides los hace candidatos de susceptibilidad al cáncer de tiroides (Bosetti *et al.*, 2002; Álvarez-Nuñez *et al.*, 2003; Matakidou *et al.*, 2004; Tomer y Greenberg, 2004 a,b).

Las variantes de *TG* se han asociado con enfermedades inmunes y con otras enfermedades benignas del tiroides como el bocio familiar, el hipotiroidismo, el bocio simple no endémico, el adenomatoso y el multinodular (OMIM 188450). El análisis conjunto de varios estudios indica que las personas aquejadas de adenomas y nódulos benignos del tiroides, tiene un mayor riesgo de malignización celular, con valores de ORs asociados especialmente altos (OR = 29,9, 95% IC: 14,5–62,0). Este elevado riesgo se hace más significativo cuando la asociación se realiza en un período de 2–4 años previos al diagnóstico del cáncer, pero también se encontraron valores elevados de ORs, aunque hayan mediado 10 años o más entre la asociación y la aparición del tumor (Franceschi *et al.*, 1999; Hishinuma *et al.*, 1999; 2005; Preston-Martin *et al.*, 2003).

Las variantes de *TG* también se han explorados como marcadores en neoplasias epiteliales de tiroides (Álvarez-Nuñez *et al.*, 2003). 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).

Apenas existen estudios precedentes de asociación entre polimorfismos de TG y cáncer tiroideo, en la literatura sólo hallamos un estudio en el cual se planteó la hipótesis de que la variante polimórfica *Gln2511Arg* de TG incrementara la susceptibilidad a desarrollar cáncer tiroideo-no medular. Si bien la asociación fue modesta, por la prevalencia de este polimorfismo en la población (~50% en poblaciones caucásicas), se sugirió que puede contribuir significativamente a la incidencia de carcinomas no medulares de tiroides (Matakidou *et al.*, 2004). Aunque el mecanismo por el cual TG confiere esta susceptibilidad aún no es conocido, se sabe que este cambio no conservativo se localiza en un dominio de homología con la acetilcolinesterasa, en la región C terminal de TG, cuya función es importante para la maduración conformacional y la secreción normal de TG (Park y Arvan, 2004).

Todas las variantes polimórficas estudiadas en los exones 10, 12 y 33 incrementaron la susceptibilidad al cáncer de tiroides. Al parecer, su localización en exones que se corresponden con dominios funcionales de la proteína, hace que afecten su funcionalidad y, con ello, la fisiología tiroidea.

La proteína TG se caracteriza por una estructura compleja y altamente organizada que incluye unidades repetitivas ricas en cisteína, sitios hormonogénicos y dominios de enlace al receptor (Mendive *et al.*, 2001). El exón 10 se piensa que está relacionado con los sitios hormonogénicos, específicamente con ciertos residuos de tirosilo que se consideran actúan como dadores de yodofenoxil a una yodotirosina aceptora (Moya *et al.*, 2000; Mendive *et al.*, 2001). Los exones 10 y 12, además, participan en la codificación de las unidades repetitivas ricas en cisteína. Se ha sugerido que el exón 10 está involucrado, específicamente, en la codificación de la repetición tipo 1-7, y el exón 12 en las repeticiones tipo 1-3 y 1-8. Como es conocido, la hidrólisis catalítica de TG por el sistema lisosomal es la última etapa en la biosíntesis de hormonas tiroideas (Moya *et al.*, 2000) y, al parecer, las repeticiones tipo 1 son las que regulan la degradación de la TG madura por una inhibición selectiva y reversible de las proteasas lisosomales (Mendive *et al.*, 2001; Targovnik *et al.*, 2001;).

Además, se ha sugerido que el dominio de TG responsable de su unión a la membrana se localiza entre el exón 10 (Ser789) y el 16 (Met1173) (Mendive *et al.*,

2001), con lo cual, los cambios de base del exón 10 y 12 pudieran repercutir en una baja afinidad por su receptor.

El exón 33 codifica para la repeticiones ricas en cisteína tipo 3, estas cisteínas juega un importante papel en la formación de puentes disulfuros, que permiten la correcta estructura terciaria y el plegamiento de la proteína y, con ello, su transporte intracelular (Hishinuma *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2004). Por ello, pensamos que el cambio de un aminoácido hidrofílico positivamente cargado, como es la arginina, por uno hidrofóbico, como es el triptófano, pudiera alterar la estructura de esta región y, por consiguiente la conformación de la proteína (Ban *et al.*, 2003). La proteína alterada no puede escapar del control de calidad del retículo endoplasmático y, en consecuencia no puede ser exportada al sitio de yodación (Park y Arvan, 2004). Este tráfico defectuoso de TG desde el RE hasta el complejo de Golgi, se ha sugerido que es el responsable de deficiencias hormonales congénitas (Kim *et al.*, 1998; Hishinuma *et al.*, 1999; Park y Arvan, 2004). Este cambio del exón 33 se localiza en un dominio, de homología con la acetilcolinesterasa, en la región C terminal de TG, cuya función es importante para la maduración conformacional (homodimerización por formación de puentes disulfuro) y la secreción normal de TG (Mendive *et al.*, 2001; Park y Arvan, 2004). El cambio aminoacídico pudiera generar una proteína que no puede alcanzar el complejo de Golgi para ser glicosilada (transferencia de complejo de azúcar al N del grupo amino de la asparagina) y, por tanto, no incluirse en las vesículas para ser secretada por exocitosis. En otras palabras, el cambio no afectaría a la expresión proteica pero si el incorrecto plegamiento, que provocaría una retención intracelular de TG (Park y Arvan, 2004).

En conclusión, el plegamiento, la dimerización y la exportación anormal de TG como consecuencia del cambio de base pudieran contribuir a las deficiencias hormonales y a que se desencadenen respuestas que conduzcan a la hiperplasia o la hipertrofia glandular, con predisposición a la malignización de las células tiroideas.

En este punto resulta interesante resaltar que la TG folicular actúa como controlador negativo de la función tiroidea, suprimiendo la expresión de TTF-1, TTF-2 y Pax-8 y, por consiguiente, reduce la expresión de los genes *TG*, *TPO*, *NIS* y *TSHR*. Estos hallazgos apoyan la idea de que TG no es sólo sustrato para la biosíntesis de hormonas tiroideas, sino también un regulador de la función tiroidea actuando en la señalización transcripcional, o estando involucrada en algún mecanismo todavía no determinado (Park y Arvan, 2004).

En resumen, las variantes polimórficas de *TG* pudieran originar una pléyade de alteraciones estructurales y funcionales en la proteína, que abarcan desde dificultades para transportarse intracelularmente, yodarse, unirse a su receptor, glicosilarse y degradarse; así, como también pueden alterar la señalización transcripcional y la expresión génica en el tiroides.

Las sustituciones aminoacídicas de los polimorfismos en los exones 10, 12 y 33 del gen *TG* se han asociado a riesgo de enfermedades autoinmunes murinas y humanas. Tanto el conjunto de SNPs de los exones 10 y 12, como el SNP del exón 33 resultaron buenos marcadores de susceptibilidad a la enfermedad de Graves y a la tiroiditis de Hashimoto, en poblaciones norteamericanas. Aunque el fuerte desequilibrio entre ellos imposibilita determinar cuál de los SNPs de los exones 10 y 12 es el que confiere la susceptibilidad (Ban *et al.*, 2003). Collins y colaboradores contradicen estos resultados puesto que no hallaron asociación entre estos SNPs y el desarrollo de enfermedades autoinmunes en poblaciones inglesas (Collins *et al.*, 2004). En las poblaciones japonesas tampoco el SNP del exón 33 tuvo influencia en las enfermedades autoinmunes del tiroides (Ban *et al.*, 2004).

En este contexto y en vista de nuestros resultados, parece evidente que todas las variantes estudiadas de *TG*, incluyendo el cambio silencioso, son potenciales marcadores de riesgo para el cáncer de tiroides diferenciado.

Al estudiar los haplotipos de los SNPs de *TG*: *Ser734Ala* (T2200G) *Pro778Pro* (T2334C) *Met1027Val* (A3082G) *Arg1980Trp* (C5995T) y su asociación con el riesgo, apreciamos la concordancia con los estudios de asociación alélica de *TG*, de manera que el haplotipo *Ala:Pro:Val:Trp* (que incluye los alelos variantes de todos los polimorfismos) incrementó significativamente el riesgo a desarrollar cáncer. Igual resultado se obtuvo con el haplotipo *Ala:Pro:Val:Arg* que sólo se diferencia del anterior en que el alelo del exón 33 no es variante. El hecho de que las formas variantes del exón 10 y 12 aparezcan simultáneamente en estos dos haplotipos frecuentes, nos hace pensar en una fuerte correlación entre ellos, indicio de ligamiento. La observación de que los alelos del exón 33 se presentan indistintamente en estos haplotipos sugiere que no cosegregan con el bloque que, al parecer, forman los alelos del exón 10 y 12.

Por otra parte, el segundo haplotipo en frecuencia, que se distingue del de referencia por presentar el alelo mutante del polimorfismo del exón 33, incrementó los valores de OR con alta significación estadística, lo que corrobora el efecto sobre el

riesgo de este alelo detectado en el estudio de asociación de *Arg1980Trp*. Es evidente que el alelo variante *Trp* confiere un incremento del riesgo a desarrollar cáncer de tiroides. Su sola presencia en este haplotipo bastó para incrementar la susceptibilidad; este hallazgo, tiene además otra interpretación y es la confirmación de que está en equilibrio de ligamiento. Por último, el haplotipo *Ser:Pro:Met:Trp*, que se distingue por presentar tanto el alelo variante de *Arg1980Trp* del exón 33, como el del *Pro778Pro* del exón 10, estuvo también más representado, de manera significativa, en los pacientes. Los otros haplotipos que contenían al menos uno de los alelos variantes de los polimorfismos del exón 10 y 12 en combinación con el variante del 33 también incrementaron las ORs aunque no alcanzaron la significación estadística. El estudio de ligamiento corroboró que los SNPs de los exones 10 y 12 están en desequilibrio pero no cosegregan con el polimorfismo del exón 33.

A modo de conclusión podemos decir que los polimorfismos de los exones 10, 12 y 33, son buenos marcadores de susceptibilidad al cáncer de tiroides, por lo cual el gen TG parece ser relevante en la carcinogénesis tiroidea.

La hormona TSH actúa como el principal regulador de la diferenciación y proliferación celular tiroidea por lo que no es desacertado concebir que las alteraciones en su receptor impliquen desequilibrios morfo-funcionales en la glándula que conduzcan a la tumorigénesis. El descubrimiento de la presencia de mutaciones somáticas y germinales en *TSHR* en tumores foliculares apoya la hipótesis de que la cascada de AMPc puede ser importante en este proceso, y ha motivado el interés por el estudio de como los polimorfismos germinales en componentes de la cascada, en particular en *TSHR*, pudieran afectar la susceptibilidad al cáncer de tiroides.

El análisis de asociación del polimorfismo *Pro52Thr* refleja modestos incrementos de OR cuando los alelos variantes están en homocigosis y, con preferencia, en la variante papilar. La no significación de esta asociación nos hace postular que este polimorfismo no es buen marcador para el cáncer de tiroides.

Los estudios pioneros y más abundantes para este polimorfismo de *TSHR* se centran en enfermedades inmunes del tiroides y, particularmente, en la enfermedad de Graves (OMIM 603372). Precisamente, la localización del polimorfismo *Pro52Thr* en la región N terminal del dominio extracelular del receptor (subunidad A) fue lo que hizo pensar en la posibilidad de que la sustitución de los aminoácidos pudiese cambiar la

secuencia de los epítomos inmunogénicos del ectodominio de TSHR y, con ello, alterar la susceptibilidad a desarrollar autoinmunidad en el tiroides. Sin embargo, sólo los primeros estudios encontraron incrementos de riesgo para esta patología inmune del tiroides (Bahn *et al.*, 1994; Cuddihy *et al.*, 1995) mientras que otros, por el contrario, no hallaron efectos sobre la susceptibilidad (Simanainen *et al.*, 1999; Chistiakov *et al.*, 2000; Kaczur *et al.*, 2000; Ban *et al.*, 2002; Chistiakov, 2003; Ho *et al.*, 2003). Estos resultados han hecho que se asuma como bastante concluyente que este polimorfismo no está asociado con la enfermedad de Graves (Ban *et al.*, 2002, Chistiakov, 2003; Ho *et al.*, 2003).

Sólo hay un estudio previo de evaluación de la influencia del polimorfismo sobre el riesgo a desarrollar carcinoma no medular de tiroides. Este trabajo encontró que no existe asociación entre esta variante de *TSHR* y el riesgo, tanto en poblaciones canadienses como británicas (Matakidou *et al.*, 2004).

El cambio en el nucleótido 253 del exón 1, correspondiente al SNP *Pro52Thr*, se localiza en el dominio extracelular de interacción con el ligando y ello plantea la hipótesis de su posible influencia en la cascada de señalización del AMPc. La unión de TSH con su receptor conduce al acoplamiento con su transductor (la proteína) G y a la activación de la adenilciclase (Kazanietz y Santa Coloma, 2000; Kopp, 2001). Esta cascada es el principal regulador del crecimiento, diferenciación y secreción hormonal en el tiroides. En consecuencia, se supone que las alteraciones en TSHR que impidan el acople con su ligando pueden afectar la vía y traducirse en desórdenes tiroideos.

Se ha predicho que la proteína variante de este polimorfismo tiene pérdida de un giro beta que potencialmente puede alterar la conformación tridimensional del receptor variando la afinidad por la hormona y, con ello, la activación de la adenilato ciclase. Se especula así que la cadena de eventos que transcurren desde la sustitución hasta el carcinoma implicaría la activación constitutiva de la vía del AMPc causando tirotoxicosis o nódulos tiroideos que derivarían a carcinomas. A favor de este supuesto hablan los estudios funcionales que encuentran niveles incrementados del AMPc en la variante *Thr* de *TSHR*, expresada en CHO (Chistiakov, 2003).

Así, los individuos homocigotos para la variante revelan niveles más bajos de TSH y de yodotironina (Peeters *et al.*, 2003), pero no exhiben anormalidades en la función tiroidea (Matakidou *et al.*, 2004).

El otro polimorfismo evaluado de *TSHR* (*Asp727Glu*) se ha relacionado con los carcinomas tiroideos diferenciados (Ohno *et al.*, 1995; Cetani *et al.*, 1999), pero su asociación más estudiada es con el bocio multinodular y los adenomas tóxicos tiroideos (Muhlberg *et al.*, 2000; Tonacchera y Pinchera, 2000). Los resultados al respecto no son coherentes, en tanto que unos hallan asociación con el desarrollo de bocio multinodular, mientras que otros no confirman el incremento de riesgo (Kopp, 2001; OMIM 603372). Para las enfermedades tóxicas no autoinmunes del tiroides, tampoco se han hallado diferencias en la frecuencia del polimorfismo del codón 727, respecto a poblaciones controles (Mühlberg *et al.*, 2000). Así también, los estudios de caso control con poblaciones caucásicas residentes en Alemania y Norteamérica no han encontrado asociación entre el polimorfismo y la enfermedad de Graves. Contrariamente, en poblaciones rusas se detectó una alta frecuencia del alelo *727Glu* en pacientes afectados por esta enfermedad (Ban *et al.*, 2002; Chistiakov *et al.*, 2002; Chistiakov, 2003). Un meta-análisis del conjunto de estudios hechos para la enfermedad de Graves indicó una débil asociación entre la variante polimórfica y la enfermedad (Chistiakov *et al.*, 2004). Asimismo, los polimorfismos de los codones 52 y 727 de *TSHR* tampoco son buenos marcadores del síndrome del prolapso de la válvula mitral asociado a la enfermedad de Graves y a la tiroiditis (Chou *et al.*, 2002). A la luz de estas evidencias, la opinión más general es que estos polimorfismos germinales no parecen estar asociados con desórdenes no autoinmunes de hiperfuncionamiento del tiroides ni con otras enfermedades tiroideas (Tonacchera y Pinchera, 2000).

Así, los resultados del análisis de asociación del polimorfismo *Asp727Glu* llevado a cabo en este estudio reflejan una relación inversa, aunque no significativa, para el genotipo homocigoto para el cambio, en cualquiera de las variantes del cáncer diferenciado.

Del análisis de los haplotipos de *TSHR* obtuvimos que el haplotipo más frecuente de los tres detectados incluyó el 88% de los casos. Los demás haplotipos, conteniendo sólo un alelo variante de uno u otro SNP, no incrementaron los valores de ORs. No se detectó el haplotipo doblemente variante, de lo que se intuye que ambos polimorfismos no están ligados. El análisis de ligamiento halló una *D'* con valor de 0,28, que así lo confirma. Otros autores coinciden en que, a pesar de la cercanía física, no hay evidencias de los alelos de estos *loci* de *TSHR* estén en desequilibrio de ligamiento (Matakidou *et al.*, 2004).

El estudio precedente de asociación con el cáncer de tiroides no medular, no encontró evidencia de que el polimorfismo *Asp727Glu* incrementara el riesgo. Los autores reconocen el poder limitado de su estudio por el bajo tamaño muestral, pero aún así cuestionan el papel de *TSHR* en la carcinogénesis (Matakidou *et al.*, 2004).

Como este polimorfismo implica un cambio de base en el exón 10, que codifica para el dominio carboxiterminal intracelular del receptor, y este es la región de unión a proteínas G, es concebible suponer que el cambio aminoacídico pudiera influir en la activación de la vía del AMPc. Los estudios funcionales que evalúan esta hipótesis observan que la variante de *Asp727Glu* (expresada en células eucariotas) tiene incrementos notables en los niveles de AMPc en respuesta a la estimulación por TSH (Gabriel *et al.*, 1999). Sin embargo, esta observación no se confirmó en estudios posteriores, en los que no se detectaron diferencias en los niveles de AMPc basales o en respuesta a TSH, en células COS-7 transfectadas y en células tiroideas que expresaban una u otra proteína (Nogueira *et al.*, 1999; Chistiakov *et al.*, 2003; Sykiotis *et al.*, 2003). Los estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que la delección de los residuos de 722 a 764 no afecta a la capacidad de transcripción de la señal del receptor (Sykiotis *et al.*, 2003).

Por otra parte, estudios *in vivo* han puesto en evidencia que sujetos heterocigotos *Asp/Glu* muestran niveles más bajos de TSH que los homocigotos para el alelo *Asp*. Estos datos concuerdan con el hallazgo de que la variante *727Glu* tiene una mayor activación de la cascada de AMPc en respuesta a TSH, ya que se requieren menores concentraciones de TSH para alcanzar una producción normal de hormonas tiroideas. Es por esto, que estos autores interpretan como relevante este polimorfismo funcional (Peeters *et al.*, 2003). La activación de la adenilciclase puede inducir una hipersecreción hormonal por el tirocito pero, en contraste con las mutaciones somáticas que activan constitutivamente la vía del AMPc, el polimorfismo germinal no produce una activación permanente de *TSHR* (Chistiakov *et al.*, 2002). No obstante, la activación constitutiva tampoco se ha reconocido como un evento frecuente en la progresión de tumores de tiroides diferenciados (Spambalg *et al.*, 1996).

Otro estudio al respecto observó que los mutantes *727Glu* no difieren de los salvajes en la activación de la cascada de AMPc. Pero, cuando el alelo forma el haplotipo *Asp727Glu/Arg593Asp* se activa constitutivamente la cascada. El polimorfismo mejora la activación de la proteína G en presencia de una mutación

funcional, aunque es inerte en el contexto de *TSHR* de tipo salvaje (Sykiotis *et al.*, 2003).

A modo de resumen consideramos que, a pesar del papel en la cascada de AMPc de los polimorfismos estudiados, éstos no son relevantes en la tumorigénesis de la glándula tiroidea.

Genotipos de genes relacionados con el ciclo celular

La fosforilación de la tirosina es un evento crucial en la regulación de procesos celulares tales como la proliferación, la diferenciación, la transducción de señales, la expresión génica, cambios en el citoesqueleto y la malignización celular (Zhang *et al.*, 1997; Zapata *et al.*, 2004). En este escenario las fosfatasa de tirosina actúan tanto como reguladores positivos o negativos en la transducción y por ello son esenciales para las funcionales celulares.

PTPRJ es un receptor de fosfatasa de tirosina de clase III, con un único sitio catalítico intracelular y repeticiones de fibronectina extracelulares. Este se expresa en el sistema hemotopoyético y en varios tejidos: páncreas, riñón, sistema nervioso, mama y tiroides (Kellie *et al.*, 2004). Al parecer, pertenece a la subfamilia de fosfatasa de tirosina que controlan la proliferación celular mediada por receptores de tirosina quinasa, y es una molécula crucial para muchas respuestas celulares mediadas por factores de crecimiento, ya que actúa específicamente como inhibidor de la proliferación, al tiempo que modula cambios en el citoesqueleto y en los contactos entre célula y sustrato (Kellie *et al.*, 2004).

El interés en estudiar el efecto del polimorfismo *Asp872Glu* del gen *PTPRJ* sobre la susceptibilidad al cáncer de tiroides surge del reconocimiento de las funciones biológicas previamente expuestas y del conocimiento del papel de *PTPRJ* en ciertas neoplasias murinas y humanas, especialmente en la carcinogénesis de células tiroideas de rata (Zhang *et al.*, 1997).

Nuestros hallazgos, sin llegar a ser estadísticamente significativos, sugieren que la sustitución en el codón 872 de *PTPRJ* pudiera tener un efecto protector a desarrollar cáncer de tiroides. Esta inferencia la sustentan otros resultados similares en relación a este tipo de carcinoma. Así, Iuliano y colaboradores, al evaluar SNPs de este gen hallaron que el genotipo homocigoto para el alelo salvaje de *Asp872Glu* estaba más representado en pacientes que en controles. Por otra parte, el análisis de haplotipos de

PTPRJ indicó que la presencia del alelo *872Asp* en la combinación era más frecuente en los pacientes con carcinoma de tiroides (Iuliano *et al.*, 2004). Estos autores concluyen que el perfil genotípico de *PTPRJ* afecta la susceptibilidad al cáncer de tiroides y que la pérdida alélica del gen está involucrada en la carcinogénesis del tiroides (Iuliano *et al.*, 2004). Otros estudios de asociación alélica de *PTPRJ* han indicado que determinados haplotipos confieren protección a desarrollar cáncer de mama y de pulmón (Ruivenkamp *et al.*, 2002).

El análisis de los polimorfismos de *PTPRJ* en líneas celulares humanas de carcinoma de tiroides reveló el predominio del alelo *872Asp*. También se comprobó que en líneas celulares híbridas, con un poder de malignidad menor que el de sus líneas parentales, la adquisición del alelo *872Glu* implicó el desarrollo de un genotipo desfavorable (Iuliano *et al.*, 2004).

El polimorfismo *Asp872Glu* se localiza en la región extracelular de la fosfatasa, en una región cercana al dominio transmembrana, específicamente en medio de la primera hélice, en una posición expuesta del dominio de fibronectina tipo III (Iuliano *et al.*, 2004). Además, varios estudios sobre *PTPRJ* han proporcionado evidencias de que la dimerización conduce a la inactivación del receptor y que la dimerización implica interacciones específicas con el dominio transmembrana (Chin *et al.*, 2005). Se especula que la presencia de *Asp* en el codón 872 pudiera facilitar la dimerización de la proteína; de hecho, la cadena lateral del aspartato es más corta que la del glutamato, lo cual reduce los efectos de las cargas negativas opuestas, favoreciendo la dimerización (Ruivenkamp *et al.*, 2002; Iuliano *et al.*, 2004). Se plantea que los polimorfismos pueden afectar la relación de *PTPRJ* con su ligando y, aunque estos no han sido definidos, si que se ha demostrado que ciertas moléculas influyen sobre su actividad enzimática (Sorby *et al.*, 2001). Así, los productos de los diferentes alelos pueden tener distinta afinidad por sus correspondientes ligandos y los genotipos con el cambio responden al estímulo externo con mayor eficiencia que los homocigotos normales. Alternativamente, si *PTPRJ* viene regulado por la dimerización dependiente de ligando, es probable que los heterodímeros puedan tener una menor afinidad por los ligandos, empeorando así la inactivación de la fosfata.

Nuestros resultados no detectan una reducción significativa del riesgo de cáncer de tiroides asociado a este polimorfismo de *PTPRJ*, pero indican una tendencia a que el genotipo variante tenga un efecto protector. A la luz de estas evidencias sería interesante ampliar los estudios en muestras mayores y en más polimorfismos de *PTPRJ*.

Interacciones gen-gen

Es concebible que un polimorfismo por sí sólo no tenga efectos espectaculares sobre la susceptibilidad individual a agentes endógenos o exógenos sino, que más bien, el fenotipo de malignidad sea el resultado de la acumulación de múltiples genotipos variantes. En este contexto cobra singular importancia el estudio de las interacciones entre diferentes genes polimórficos (Mitrunen y Hirvonen, 2003). Estos estudios, sin embargo, deben ser biológicamente justificables, ya sea, porque se trate de enzimas que siendo relevantes, para determinadas exposiciones, actúan secuencialmente en la misma ruta metabólica o, porque enzimas de metabolismo y reparación participen, sincronizada y complementariamente, para evitar los daños al DNA (Popanda *et al.*, 2004, Seedhouse *et al.*, 2004; Naccarati *et al.*, 2006).

A pesar de los múltiples argumentos que teóricamente respaldan que el riesgo de cáncer puede estar modulado de forma aditiva o multiplicativa por varios polimorfismos, son escasos los trabajos existentes, y se circunscriben a las localizaciones tumorales más frecuentes de mama, pulmón y vejiga, y con algunas evaluaciones para leucemias (Seedhouse *et al.*, 2002, 2004; Popanda *et al.*, 2004).

De lo anteriormente expuesto se deduce que éste es un campo inexplorado y de sumo interés para el carcinoma de tiroides.

Interacciones gen-gen para genes de reparación

El análisis de la interacción de múltiples genes dentro de una misma vía reparadora (particularmente entre aquellos que se conoce que forman complejos) puede proporcionar resultados más comprensibles acerca de cómo las variantes polimórficas de los genes de reparación afectan la susceptibilidad al cáncer (Goode *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2005b; Weiss *et al.*, 2005). Estos análisis ayudan a esclarecer las complejas interacciones entre las diversas vías involucradas en la reparación del DNA y el desarrollo de neoplasias y proporciona nuevas hipótesis para futuros estudios funcionales.

En apartados anteriores ya comentamos el papel de la interacción de la polimerasa β con XRCC1 para el funcionamiento correcto de BER, y la importancia de evaluar cómo las variaciones polimórficas en una u otra enzima pudieran afectar la integridad del mecanismo (Lunn *et al.*, 1999; Bhattacharyya y Banerjee, 2001; Lee *et*

al., 2001). Este supuesto es extensible a la interacción con otras enzimas de la vía BER, de la que se ha estudiado la interacción de XRCC1 con APE1. En este caso, aunque los efectos de la interacción sobre la sensibilidad a la radiación ionizante no alcanzaron significación, si que se apreció que hay una relación dependiente de la dosis del alelo variante sobre el retraso en el ciclo celular y la hipersensibilidad a la radiación ionizante (Hu *et al.*, 2001).

Con este precedente nos planteamos la hipótesis de que la interacción de SNPs de *OGG1* y *XRCC1* pudiera ser de importancia para la susceptibilidad al cáncer de tiroides.

Al estudiar la interacción *OGG1-XRCC1*, estamos analizando el efecto de dos proteínas copartícipes de la vía BER. La primera interviene en la etapa de reconocimiento y escisión de la guanina oxidada, y la otra actúa como coordinadora en todas las etapas. XRCC1 estimula a OGG1 para que escinda la base oxidada, garantizando la eficiencia de la maquinaria reparadora. De hecho, la interacción física de estas proteínas aumenta tres veces la actividad glicosilasa de OGG1 sobre 8oxoG (Marsin *et al.*, 2003).

La interacción de los genotipos *399Arg:326Cys* incrementó el valor de OR, pero sin que fuese significativa la asociación con el riesgo. Otros autores tampoco han hallado que esta combinación se asocie a un incremento en la susceptibilidad a adenomas o carcinomas de colon (Niwa *et al.*, 2005; Skjelbred *et al.*, 2006). La combinación *280His:326Cys* mostró una relación inversa con el riesgo, pero sin significación; sin embargo, *194Arg:326Cys* mostró una asociación con el riesgo próxima a la significación. Este resultado es interesante en tanto que sugiere una posible interacción entre estos genes y que sus polimorfismos pueden tener efectos sinérgicos sobre la susceptibilidad a la enfermedad. La proteína OGG1 interactúa con la región central de XRCC1, específicamente, con la región bisagra que media entre el dominio NTD y el BRCT1, región que como ya se ha comentado es donde se localiza el polimorfismo del codón 194. Ésta es una región desestructurada, pero la interacción con OGG1 pudiera estabilizar una estructura particular de XRCC1 e influir en su función. Los resultados epidemiológicos que asocian el polimorfismo del codón 194, localizado en esta región, con ciertos tumores o sensibilidad a agentes genotóxicos, apoyan la hipótesis de las repercusiones funcionales que tiene la alteración de la afinidad de XRCC1 con OGG1 u otras enzimas involucradas en el mecanismo BER (Marsin *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2005b).

Hace ya varios años que se especula que la vía BER y la de RH interactúan para reparar las roturas de las cadenas del DNA (Liu *et al.*, 1998) y, desde entonces su posible solapamiento en la reparación ha sido objeto de análisis (Hu *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003). Estudios con *Schizosaccharomyces pombe* y con células CHO han dado veracidad a la hipótesis (Memisoglu y Samson, 2000; Taylor *et al.*; 2000; Stern *et al.*, 2002) y, la observación de la colocalización de XRCC1 con Rad51 sustenta que la reparación de las roturas por XRCC1 es una actividad coordinada con eventos recombinacionales iniciados por las roturas de cadena durante la replicación (Taylor *et al.*, 2000). Por ello, resulta interesante evaluar el papel de las interacciones entre genes de reparación de ambos mecanismos, así como conocer el efecto de los distintos SNPs sobre estas interacciones.

En nuestro estudio hemos visto que la combinación del genotipo 280His/His de XRCC1 y A/AIVS5-14 de XRCC3, al igual que la combinación 194Arg/Trp de XRCC1 y 241Met/Met de XRCC3, se presentaron con más frecuencia entre los pacientes, lo que sugiere un incremento de la susceptibilidad para los portadores de los dobles genotipos de riesgo de XRCC1 y de XRCC3.

El efecto de 194Arg/Trp de XRCC1 y 241Met/Met de XRCC3, induce un incremento de la susceptibilidad para el cáncer de mama (Smith *et al.*, 2003) y para el cáncer de vejiga (Stern *et al.*, 2002). Además, en pacientes con los genotipos de riesgo de XRCC1 y de XRCC3 se observaron incrementos de radiosensibilidad y de riesgo a carcinomas ginecológicos (De Ruyc *et al.*, 2005). Otra cita interesante al respecto se refiere a la progresión del carcinoma colorectal, ligeramente favorecido por la interacción de los genes XRCC1 y XRCC3, específicamente por la combinación 399Arg/Arg y 241Met/Met (Krupa y Blasiak, 2004; Yeh *et al.*, 2005).

En este contexto, nuestros resultados confirman que la interacción de alteraciones polimórficas en XRCC1 y XRCC3 aumenta el riesgo a desarrollar cáncer de tiroides.

Por otra parte, consideramos, que una combinación que contenga al unísono variaciones en los genes que participan en la vía de reparación por recombinación homóloga pudiera favorecer la pérdida de fidelidad en este mecanismo y, conducir a la inestabilidad genómica. El incremento en la susceptibilidad al cáncer pancreático observado para la interacción del polimorfismo de XRCC2 y XRCC3 (Li *et al.*, 2006) y el mayor riesgo de desarrollar leucemia mieloide, aguda cuando se es portador de un

genotipo doble variante para *RAD51* y *XRCC3* (Seedhouse *et al.*, 2004) sustentan esta hipótesis.

Sin embargo, en nuestro estudio no fue posible cuantificar las ORs para estas combinaciones por no contar con individuos que portaran el genotipo doble homocigoto variante. Esta situación no es sorprendente si consideramos que nuestro tamaño muestral era limitante para la naturaleza de estos análisis. Varios trabajos que se han planteado estos análisis no han podido ser concluyentes por la misma razón (Kuschel *et al.*, 2002; Seedhouse *et al.*, 2002).

Interacciones entre genes de reparación y genes de metabolismo

Los polimorfismos en enzimas metabólicas se han asociado con el incremento de riesgo a varios tipos de tumores. Tanto las GST (involucradas en la detoxificación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos), como las NAT2 (involucradas en la acetilación de arilaminas) han sido objeto de múltiples análisis como marcadores de susceptibilidad al cáncer (Sanyal *et al.*, 2004). Además, estos genes se consideran buenos candidatos de estudios de interacción gen-gen, por el hecho de que sus enzimas tienen solapamiento de especificidad de sustrato (Mitrunen y Hirvonen, 2003).

Las GSTs constituyen una familia multigénica que se expresa en todos los órganos humanos y supone la defensa celular más importante frente a los compuestos electrofílicos tanto de origen endógeno como exógeno (Leiers *et al.*, 2003; Seedhouse *et al.*, 2004). Existen varias isoenzimas de GST cuyos polimorfismos se han asociado con el incremento de riesgo para varios tipos de tumores (Morari *et al.*, 2002; Sanyal *et al.*, 2004).

La clase M1 polimórfica es la más estudiadas de las pertenecientes a la familia de GSTM. Uno de sus SNPs consiste en la delección completa del gen, lo que tiene por consecuencia la ausencia total de la enzima. La delección se ha asociado con altos niveles de aductos y de SCE (Seedhouse *et al.*, 2004). Otra clase polimórfica de la familia GSTT es la T1, donde los individuos homocigotos para el alelo nulo presentan una pérdida de la función de la proteína, también producida por una delección del gen. La clase GSTP1 presenta un polimorfismo consistente en la transición 118 A>G en el exón 5, que causa un cambio de aminoácido en la proteína (*Ile105Val*) y con ello una disminución de la actividad catalítica (Taningher *et al.*, 1999).

Los estudios de asociación para polimorfismos de *GST* y riesgo de cáncer de tiroides son muy escasos y, mientras para unos no se halla relación entre las variantes de la *GST* y la predisposición a desarrollar tumores oxífilicos (Stankov *et al.*, 2006), otros sugieren que la combinación de polimorfismos de *GST* produce un modesto incremento en el riesgo, específicamente para la variante papilar (Gaspar *et al.*, 2004), sobre todo cuando se combina el genotipo nulo de *GSTM1* y *GSTT1* (Morari *et al.*, 2002). Asimismo un incremento de riesgo no significativo se asoció con los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* nulo (Mertens *et al.*, 2004). Para nuestra población hay un estudio previo que indica que ninguno de los polimorfismos de las *GST*, por separado o en combinación, constituyeron factores de riesgo para la presentación de carcinomas diferenciados de tiroides (Hernández *et al.*, 2003).

Estos resultados no nos han desalentado en el intento de analizar si la interacción de polimorfismos de estas enzimas con los de proteínas de reparación pudiera resultar en un fenotipo más susceptible al carcinoma tiroideo. Sin embargo, después de analizar todas las combinaciones posibles, no hallamos ninguna combinación de genotipos de las *GST* con las enzimas de reparación que tuviera efecto significativo sobre el riesgo a desarrollar cáncer de tiroides, aunque apreciamos valores de ORs con valores de *p* cercanos a la significación estadística para la combinación *GSTM1*nulo:Arg280His y *GSTM1*nulo:IVS5-14.

Son escasas las referencias respecto a las interacciones entre genes de metabolismo y de la reparación, y más aún las que implican a las *GSTs*. En relación a las primeras hallamos el precedente de que el fenotipo resultante de interacción de *XRCC1* y *XRCC3* con la enzima de fase I, oxidoreductasa de quinona dependiente de NADPH no incrementa el riesgo a la leucemia (Seedhouse *et al.*, 2002). Respecto a las segundas, encontramos que la interacción entre *OGG1* y *GSTs* no influye sobre el riesgo de cáncer de pulmón (Wikman *et al.*, 2000, Le Marchand *et al.*, 2002). Sin embargo, el riesgo al carcinoma hepatocelular fue significativo para los individuos con genotipo *GSTT1* nulo y genotipo mutante de *XRCC1*; así como también hubo incrementos de susceptibilidad, pero no significativos, para los portadores de *GSTM1* nulo con los genotipos de riesgo de *XRCC1*. Finalmente, los dobles mutantes de *GSTM1* y *GSTT1* en asociación con los polimorfismos de *XRCC1* también influyeron en el riesgo (Yu *et al.*, 2003). En otro estudio se ha encontrado que la presencia simultánea de las variantes de los loci *GSTM1* y *XRCC1* (codones 280 y 399), incrementa el riesgo de cáncer de

mucosa oral (Majumder *et al.*, 2005). Estos resultados son lógicos y congruentes con los de los experimentos que estudian los efectos de los SNP de estos genes por separado. Se reconoce que las GSTs, junto a la bleomicina hidrolasa y las NATs son la principal maquinaria metabólica para reducir la reactividad de mutágenos que producen roturas en el DNA (tales como la bleomicina); al tiempo que se ha reconocido que el polimorfismo del codón 280 de XRCC1 se asocia con incrementos en la sensibilidad a la bleomicina (Tuimala *et al.*, 2002). Estos dos eventos hacen concebible que las variaciones polimórficas que afecten la capacidad detoxificadora y, las que impidan la reparación de las lesiones inducidas por ella, multipliquen el riesgo. En este contexto, otros autores sugieren que la combinación de la variante de *Arg399Gln* de XRCC1 y los dobles mutantes nulos de *GSTT1/GSTM1* tiene un modesto efecto sobre la susceptibilidad al adenocarcinoma pancreático (Duell *et al.*, 2002).

La combinación de polimorfismos de GSTs con XRCC3 ha sido asociada con un incremento en el riesgo de leucemia, sobre todo cuando se combina el *GSTM1* nulo con los genotipos mutantes de enzimas del mecanismo de RH (*RAD51* y *Thr241Met*), (Seedhouse *et al.*, 2004).

Aunque nuestros resultados con polimorfismos para GSTs y genes de reparación no son concluyentes, la tendencia al incremento del riesgo que se observó para la combinación *GSTM1nulo:Arg280His* y *GSTM1nulo:IVS5-14*, sugiere la posibilidad de interacción entre las variantes de estos genes y plantea la necesidad de hacer estudios con poblaciones de mayor tamaño.

De otra parte, las N-acetil transferasas constituyen una familia de enzimas que actúan en la fase II del metabolismo. Su función principal es acetilar el átomo de nitrógeno presente en las aminas aromáticas e hidracinas, aunque también pueden catalizar la unión del acetyl al átomo de oxígeno de las arilaminas hidroxiladas (Taningher *et al.*, 1999; Hein *et al.*, 2000). En estudios de asociación de riesgo, la ausencia o disminución de la actividad de las NATs se ha asociado con el aumento del riesgo de padecer diversos cánceres como el de vejiga, de riñón, el colorectal, el de próstata, de cabeza y cuello, de boca, de esófago y laringe, de pulmón y de mama (Hein, 2002).

El segundo *locus* que codifica para NAT funcionales, el NAT2, ha sido explorado exhaustivamente por su relevancia en farmacogenética. Se trata de una

familia altamente polimórfica, con 36 variantes alélicas reconocidas hasta el momento (Doll y Hein, 2001). Las NATs podrían ser de relevancia en la susceptibilidad individual al cáncer de tiroides debido al papel que juegan en la metabolización de un amplio abanico de carcinógenos a los que estamos expuestos (Hein, 2002). Sin embargo, no hallamos trabajos publicados al respecto; en cambio, dispusimos de datos facilitados por Hernández y colaboradores acerca del genotipado de la NATs en una muestra importante de nuestra población. En este trabajo se ha encontrado asociación positiva entre el genotipo homocigoto salvaje *NAT2*5* y el cáncer de tiroides. Además, la combinación de mutantes de *NAT2*6-NAT2*7*, también parece que actúa aumentando el riesgo de cáncer. Los autores señalan que ser de fenotipo acetilador lento o intermedio/rápido no influye en el riesgo de cáncer de tiroides.

En nuestro estudio las combinaciones del genotipo de riesgo de *NAT2*5* y los polimorfismos de los codones 399 y 280 de *XRCC1* fueron más frecuentes entre los pacientes con cáncer, indicando que la interacción de estos genes aumenta la susceptibilidad a la malignización del tiroides. Igualmente, ser portador del alelo variante del codón 280 y poseer el fenotipo acetilador lento, incrementa el riesgo. Esta variante de *XRCC1*, en combinación con *NAT2*6*, también hizo más susceptibles a sus portadores y, a su vez, esta variante polimórfica de *NAT2* tuvo igual efecto en asociación con el genotipo de riesgo de *IVS5-14*.

De este modo, nuestros resultados, corroboran que los efectos negativos de determinadas exposiciones ambientales se potencian por el genotipo *NAT2* (en concreto por *NAT2*5* +/+ y *NAT2*6*) en individuos en los que los mecanismos reparadores están alterados por los polimorfismos en *XRCC1* y *XRCC3*.

Los resultados en modelos experimentales validan este planteamiento. Así, por ejemplo, ya se ha comentado como la interacción de los polimorfismos en genes del metabolismo y de la reparación puede modular la respuesta a la bleomicina (Tuimala *et al.*, 2002). Las NAT son una de esas enzimas de desintoxicación del compuesto radiomimético; cuya actividad catalítica ha quedado demostrada en modelos experimentales de resistencia a bleomicina, tanto en el actinomiceto *Streptomyces verticillus*, como en células de ratón transfectadas con un gen de la acetiltransferasa (Tuimala *et al.*, 2002). Por todo ello, es admisible que las interacciones de NAT con el genotipo variante de *Arg280His* de *XRCC1*, puedan tener un efecto potenciador sobre el riesgo de cáncer, ya que coincidirían defectos en la reparación y la desintoxicación.

Hay que señalar que la interacción de *NAT2* con *XRCC3* se ha asociado con el cáncer de vejiga, y se ha sugerido que ambas proteínas pueden formar parte de una vía común para evitar los daños de los aductos de DNA (Matullo *et al.*, 2001). Estos autores especulan que la asociación entre la formación de aductos y el genotipo *Met/Met* del codón 241 de *XRCC3* (particularmente en los acetiladores lentos) puede estar relacionada con la exposición a aminas aromáticas, o ser consecuencia de procesos oxidativos (Matullo *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2002). Estos resultados son algo sorprendentes ya que los aductos son reparados fundamentalmente por el mecanismo NER, lo cual pudiera ser indicio de que *XRCC3* disminuye los niveles de aductos participando en más de una vía de reparación.

Nuestros resultados sugieren que los polimorfismos de la *NATs* no sólo se asocian con el riesgo de cáncer de tiroides (Hernández y colaboradores, comunicación personal), sino que también contribuyen, en asociación con otros polimorfismos de genes de reparación, al incremento de esta susceptibilidad. Por lo tanto, parece ser que el alelo variante de *NAT2**5, en combinación con polimorfismos de *XRCCI* y *XRCC3*, puede actuar como protector frente al desarrollo de cáncer de tiroides en ciertas exposiciones ambientales.

Interacción con la edad y género

La edad tiene una relación exponencial con el riesgo de padecer cáncer. De hecho, se considera como el principal factor en la susceptibilidad de la mayoría de los carcinomas (Creus *et al.*, 2002). La importancia de la edad como factor pronóstico en el cáncer de tiroides ha sido demostrada en numerosos estudios (Sanders *et al.*, 1998; Abdulmughni *et al.*, 2004; Falvo *et al.*, 2004; Picó *et al.*, 2004) Se ha descrito que la agresividad de dicho tumor es dependiente de la edad, de manera que suele ser más agresivo cuanto más tarde aparece en la vida del individuo, lo que se podría explicar como consecuencia del deterioro de la capacidad de reparación del DNA ligado a la edad (Berwick y Vineis, 2000). Sin embargo, una edad que sobrepase los 70 años ya es por si solo, un factor de pronóstico desfavorable. Así, pues, los pacientes con mejor pronóstico son las mujeres menores de 50 años de edad y los hombres menores de 40 años de edad (NCI, 2005).

En base a los datos epidemiológicos previamente comentados, hemos estudiado la asociación entre la edad de aparición del cáncer de tiroides y el genotipo

considerando 1) 40 años como edad de riesgo, y dos grupos, uno con los mayores de 40 y otro con esta edad o menores, ó 2) considerando los cuartiles y por ende comparando los 4 grupos resultantes. Los resultados de ambos análisis no indicaron diferencias significativas y son coincidentes en relación a la distribución de los genotipos de riesgo en relación a la edad, por lo que decidimos hacer los comentarios en relación al análisis de dos grupos: mayores y menores de 40 años.

Cuando los polimorfismos *Arg280His*, *Arg194Trp* de *XRCC1*, *IVS5-14* de *XRCC3* y *Ser734Ala*, *Pro778Pro*, *Met1027Val*, *Arg1908Trp* de *TG* que, según nuestro estudio son de susceptibilidad al cáncer de tiroides, se relacionaron con la edad observamos que todos (excepto el del codón 280 de *XRCC1*) tuvieron valores de ORs inferiores a uno, lo que indica que los genotipos de riesgo se acumularon en el grupo de pacientes menores de 40 años. Esta tendencia sugeriría que los genotipos analizados pudieran influir en un desarrollo del cáncer de tiroides a edades más tempranas. La observación de que los genotipos de riesgo pueden modular la edad de aparición del cáncer ha sido citada por algunos autores (Sturgis *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2005b). Sin embargo, las asociaciones entre los genotipo de riesgo y la edad en ninguno de los polimorfismos fue de significación estadística, lo cual es concordante con los resultados de otros estudios que evalúan esta interacción con genes de reparación (Duell *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2005b; Kietthubthew *et al.*, 2006).

El género puede ser otro factor modulador de la incidencia de cáncer. Así, se conoce que el riesgo de varias enfermedades con base genética ambiental está modulado por las diferencias entre sexos (Stroombergen y Waring, 1999). El cáncer de tiroides, por ejemplo, es aproximadamente tres veces más frecuente en mujeres que en hombres, con lo cual se considera al género como uno de sus factores de riesgo (Nagataki y Nystrom, 2002). La razón de la elevada incidencia de patologías del tiroides entre las mujeres es algo que todavía no se comprende con claridad, aunque se ha especulado más de una vez con que las hormonas femeninas juegan un papel en la etiología del cáncer de tiroides (Negri *et al.*, 1999; Preston-Martin *et al.*, 2003)

Se ha propuesto que la estimulación tirotrópica puede ser un factor importante en la promoción y propagación del cáncer tiroideo. Algunos investigadores indican que hay un incremento del riesgo de cáncer con el número de embarazos y partos, aunque otros autores lo contradicen (Memon *et al.*, 2004). En general, los datos de la literatura

señalan una débil asociación entre los factores reproductivos y el riesgo de cáncer de tiroides (Negri *et al.*, 1999).

El factor hormonal, visto desde otra perspectiva, implica a los efectos de las hormonas sexuales. Existen estudios que hablan en favor de un mecanismo hormonal, específicamente estrogénico, en el origen del cáncer tiroideo (NCI, 2005, <http://www.cancer.gov>). En los cánceres de tiroides, y en particular, en los bien diferenciados, se promueven los receptores para hormonas sexuales en especial para estrógenos. Estas hormonas, experimentalmente han demostrado ser capaces de inducir carcinomas tiroideos en animales (Negri *et al.*, 1999). Además, algunos autores añaden que estas hormonas aumentan los niveles de triglicéridos y lípidos y con ello los niveles de ROS. Entre los daños mediados por radicales libres, inducidos por estrógenos, están las roturas de simple cadena, el incremento en la formación de 8-hidroxiguanina, la formación de aductos de DNA, la oxidación de proteínas y la peroxidación lipídica. También se considera que los estrógenos estimulan la proliferación celular y, este crecimiento rápido incrementa la posibilidad de error genético, siendo las roturas de simple cadena las lesiones más prevalentes. Una vez introducida la mutación en la célula, los estrógenos aumentan la replicación de clones de células mutantes. Se teoriza que el aumento en la proliferación celular y los efectos genotóxicos pueden actuar de modo sinérgico o aditivo (Mitrunen, y Hirvonen, 2003).

Sin embargo, los estudios en humanos no muestran ninguna correlación entre la incidencia de tumor tiroideo y la expresión de receptores para estrógenos, progesterona y andrógenos (Lewy-Trenda, 2002); ni tampoco se hallan diferencias entre sexos en la expresión de estos receptores, aunque sí se detecta un incremento significativo de la expresión en respuesta al 17 beta-estradiol (Manole *et al.*, 2001). El estradiol promueve la proliferación celular posiblemente por sobreexpresión de Bcl-xL, induciendo las vías de señalización antiapoptóticas (Lee *et al.*, 2005b).

Otros autores plantean que los estrógenos por sí mismos pueden dañar al DNA o incrementar sinérgicamente los daños inducidos por el tabaco. Se señala que las mujeres fumadoras exhiben más daño oxidativo que los hombres, y este efecto se ha asociado con efectos de los estrógenos (Duell *et al.*, 2002). En conclusión y en términos generales, los datos epidemiológicos al respecto son limitados y a menudo contradictorios, principalmente por lo reducido del tamaño de las muestras (Galanti *et al.*, 1996; Rossing *et al.*, 1998, Mack *et al.*, 1999).

Bajo la hipótesis de una asociación entre género e incidencia del cáncer, fue analizada la modulación del riesgo por el sexo y la distribución de los genotipos, estratificado por género. Aunque la estratificación implica reducir el número de la muestra, estos análisis pueden contribuir al planteamiento de hipótesis biológicas *a priori*.

Ser portador del genotipo de riesgo de cualquiera de los polimorfismos estudiados y, además, ser mujer fue asociado a incrementos valores de ORs, interpretables como un incremento en la susceptibilidad al cáncer. Sin embargo, la interacción sólo fue significativa en el caso de los polimorfismos *Arg194Trp* de *XRCC1*, *Arg188His* de *XRCC2*, *IVS5-14* de *XRCC3*, los 4 estudiados en *TG* y *Asp872Glu* de *PTPRJ*. En nuestro caso la interpretación debe ser cautelosa y considerar que el tamaño de la muestra limita el poder del análisis estadístico, quizás el menor número de hombres contribuye a que no se detecten los efectos del genotipo sobre la susceptibilidad.

Otros autores han evaluado cómo la interacción entre sexo y genotipos de *XRCC1* modula el riesgo al cáncer, y han señalado que las mujeres con los genotipos de riesgo de *XRCC1* tienen una mayor susceptibilidad a padecer diversos carcinomas (Sturgis *et al.*, 1999; She *et al.*, 2000; Seedhouse *et al.*, 2002). Al estratificar la población por sexos corroboramos que la susceptibilidad asociada a los genotipos era de mayor magnitud en la población femenina. Para el polimorfismo *Arg194Trp* la variación de OR y el efecto protector sólo fue significativo en las mujeres ($p=0,05$ vs $p=0,58$ en los hombres). Asimismo, el genotipo de riesgo de *Asp872Glu* de *PTPRJ* tuvo una OR con valor de p marginal, sólo en las mujeres ($p=0,08$). En los polimorfismos con baja frecuencia del alelo variante, como el *His/His* del codón 280 de *XRCC1*, apreciamos que los individuos con el genotipo de riesgo que desarrollaron cáncer eran mujeres. El análisis por género de los polimorfismos de *TG* reveló que las diferencias en la distribución de genotipos entre controles y pacientes fueron significativas en las mujeres pero no en los hombres.

A sabiendas de que estos análisis necesitan confirmación, sobre todo incrementando el número de hombres a incluir en el estudio, no podemos obviar las evidencias que sugieren que los factores hormonales pueden hacer que las mujeres con genotipos de riesgo sean individuos más proclives a desarrollar el cáncer de tiroides. Esta modulación del riesgo por el género, podría ayudar a explicar la mayor prevalencia del carcinoma tiroideo en las mujeres.

Evaluación de la interacción entre factores genéticos y ambientales

El material genético está siendo dañado constantemente por agentes exógenos resultantes de estilos de vida, hábitos, y la exposición ambiental (Doll y Peto, 1981; Mack *et al.*, 2003; Preston-Martin *et al.*, 2003). Se ha planteado que alrededor del 70% de los casos de cáncer, en las poblaciones occidentales, son debidos a la dieta y al estilo de vida, con lo cual es evidente que la interacción gen-factores ambientales es importante en la modulación del riesgo de padecer cáncer (Hu *et al.*, 2002; Nagataki y Nystrom, 2002). La observación de que la susceptibilidad al cáncer varía entre individuos de igual genotipo pero con diferencias en la exposición, o que los efectos de algunos polimorfismos sólo sean evidentes en presencia de determinados agentes exógenos (Mitrinen y Hirvonen, 2003), justifica que en los estudios sobre marcadores de susceptibilidad sea útil evaluar los efectos moduladores de factores ambientales (Goode *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2005b; Hung *et al.*, 2005b; Boffeta y Hashibe, 2006).

El tabaco y el alcohol actúan como fuentes de carcinógenos (incluyendo nitrosaminas, aminas heterocíclicas e hidrocarburos policíclicos), de ROS y en la formación de aductos (Skjelbred *et al.*, 2006) y sus efectos pueden estar modulados por polimorfismos en genes que codifican para enzimas de su metabolismo o que participan en la reparación de los daños que ellos inducen en el DNA. (Dumitrescu y Shields 2005; Boffeta y Hashibe, 2006; Boffeta *et al.*, 2006). En concreto, el consumo de alcohol se ha relacionado con cánceres de boca, laringe, faringe, esófago, hígado, colon y, en mujeres, con cáncer de mama, páncreas y pulmón. Así, los carcinomas atribuibles al consumo de alcohol representan el 3,6% de todos los cánceres y contribuyen al 3,5% de todas las muertes por tumores (Boffetta y Hashibe, 2006).

No obstante, la relevancia de los factores ambientales en el desarrollo del cáncer, los estudios epidemiológicos demuestran que el estilo de vida y los hábitos de consumo no tienen efectos trascendentes sobre el riesgo de cáncer de tiroides (Navarro *et al.*, 2005). Sin embargo, se reconoce que tanto el consumo de alcohol como el hábito de fumar pueden influenciar sobre la función tiroidea, aunque la naturaleza de esta relación no esté totalmente esclarecida. Al parecer, los efectos del alcohol y del tabaco sobre el riesgo de cáncer de tiroides son de relativa corta duración y se relacionan con una reducción de la proliferación celular mediada posiblemente por las acciones de TSH, los estrógenos u otros mecanismos aun no identificados (Rossing *et al.*, 2000; Dumitrescu y Shields, 2005).

El cáncer de tiroides no es considerado como uno de los tumores en cuya etiología juega un papel significativo el hábito de fumar. Algunos estudios epidemiológicos han revelado una relación inversa entre el riesgo de padecer enfermedad maligna del tiroides y el consumo de tabaco (Rossing *et al.*, 2000; Mack *et al.*, 2003). Se proponen diversos mecanismos para explicar esta relación. El primero se relaciona con la secreción de TSH, y considera que los niveles elevados de TSH incrementan el riesgo de cáncer de tiroides, siendo estos niveles más bajos en los fumadores, aunque los datos al respecto son inconcluyentes. La segunda explicación descarta que la asociación esté mediada por alteraciones en el tamaño del tiroides, considerando los efectos bociógenos y sobre el tamaño glandular del tabaco (debido al tiocianato que contiene). 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). En contraste con su irrelevancia en la carcinogénesis tiroidea, el hábito de fumar se considera como uno de los factores ambientales de mayor influencia sobre el estrés oxidativo. En correspondencia con ello, resulta interesante evaluar si el efecto del tabaco modula el riesgo de cáncer asociado a polimorfismos de genes que participan en la reparación, hormonogénesis o control del ciclo celular en el tiroides.

El conjunto de estudios epidemiológicos sobre el cáncer de tiroides indica que el riesgo se reduce entre los fumadores y bebedores de alcohol, aunque el efecto de este último se elimina cuando los resultados se ajustan por el hábito de fumar. Las reducciones de riesgo asociadas al hábito de fumar son de hasta un 40%, tanto en hombres como en mujeres. Si bien esta reducción es interesante, tanto etiológica como biológicamente, los resultados siempre deben ser interpretados a la luz del impacto que sobre la salud pública tienen las enfermedades relacionadas con el tabaco, incluida el cáncer del sistema respiratorio y las enfermedades cardiovasculares (Mack *et al.*, 2003).

En el caso de los polimorfismos de *XRCCI* observamos que los incrementos de riesgo estuvieron, fundamentalmente, asociados a los individuos que no toman alcohol pero fuman, siendo estas interacciones significativas para los genotipos de *Arg399Gln* y *Arg194Trp*. De hecho, en el polimorfismo *Arg194Trp*, los incrementos fueron significativos sólo para la población no expuesta, lo que indica un efecto protector para fumadores y bebedores. Para el cáncer de pulmón se han hallado similares resultados

(Ratnasinghe *et al.*, 2001). Por otra parte, el genotipo de riesgo del codón 280 no tuvo interacciones de significativas con los hábitos.

Varios autores concuerdan que los polimorfismos de *XRCCI* pueden modificar el riesgo de cáncer de tiroides asociado al consumo de alcohol, y el carácter de la interacción es de protección para los bebedores (Sturgis *et al.*, 1999; Rossing *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2000; Ratnasinghe *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2005b), mientras que otros plantean que no hay efecto modulador (Sturgis *et al.*, 1999; Preston-Martin *et al.*, 2003; Shu *et al.*, 2003) o que, por el contrario, la interacción alcohol-genotipo opera incrementando el riesgo (Lee *et al.*, 2001; Ratnasinghe *et al.*, 2001).

Los estudios de modulación del riesgo de cáncer por efecto del tabaco en interacción con los polimorfismos de *XRCCI*, han tenido diversas lecturas, pero predominan los resultados no significativos de interacción entre las variantes de esta proteína y la exposición (Butkiewicz *et al.*, 2001; Duell *et al.*, 2001, 2002; Ratnasinghe *et al.*, 2001; Olshan *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2005). El meta-análisis de los estudios caso-caso en relación al tabaco y los polimorfismos de *XRCCI* concluyó que el genotipo de riesgo del codón 280 no tiene interacciones significativas con este hábito, y que el del 194 tiene un ligero efecto protector entre los no fumadores. En el caso del genotipo de riesgo del 399, se han hallado ORs menos multiplicativas para los fumadores (Hung *et al.*, 2005b) o, por el contrario, un efecto potenciador del riesgo (Metsola *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2005). Es posible que el efecto protector del tabaco se deba a que se incremente la apoptosis en respuesta a los altos niveles de daño genético como consecuencia de la exposición al tabaco. Otra hipótesis es que el tabaco induzca la capacidad reparadora en respuesta al daño; en apoyo de esta propuesta se han señalado los menores niveles de roturas cromosómicas encontrados en fumadores frente a no fumadores, después de una exposición a bleomicina o benzopireno diol epóxido (Wang *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2005b).

El análisis de la interacción entre estos hábitos y el genotipo *Cys/Cys* de *Ser326Cys* de *OGGI*, indicó la ausencia del genotipo variante entre los bebedores y su menor frecuencia en los fumadores, sin que la interacción fuese significativa. Con lo cual asumimos que ninguno de estos hábitos modula el riesgo de cáncer de tiroides en asociación con la inducción de aductos de 8oxoG.

No son muy numerosos los estudios de asociación de riesgo de este polimorfismo de *OGGI* que hayan analizado la interacción con los hábitos. En unos se

ha encontrado que el consumo de alcohol se asocia con inducción de 8oxoG, en el cáncer de estómago asociado al genotipo *Cys/Cys*. En cambio, para el hábito de fumar estos autores no hallan interacción (Takezaki *et al.*, 2002) La falta de interacción con el hábito de fumar también se ha encontrado para el cáncer de pulmón (Wikman *et al.*, 2000) El carácter limitado de la influencia de estos hábitos en la susceptibilidad al cáncer asociada al polimorfismo de *OGGI* se ha descrito para distintos tipos de cánceres como el de estómago, de mama, de colon, y de pulmón, entre otros (Duell *et al.*, 2002; Le Marchand *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Takezaki *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2005b Weiss *et al.*, 2005;).

El análisis de la interacción del genotipo de riesgo de *XRCC2* con estos hábitos mostró que los individuos bebedores con este genotipo tienen significativamente menos riesgo que los no bebedores con igual genotipo. Por su parte, la interacción con el hábito de fumar sin ser significativa sugiere que el hábito de fumar pudiera disminuir el riesgo pero sólo en los portadores del genotipo *Arg/Arg*. No hallamos publicaciones acerca del análisis de esta interacción en asociación con otros carcinomas.

En el caso del polimorfismo *Thr241Met* de *XRCC3*, el estudio caso-caso reflejó que los individuos con el genotipo de riesgo que bebían alcohol eran más frecuentes entre los pacientes, sin que esta mayor representación alcanzara a ser significativa. De hecho, el análisis estratificado evidenció que el incremento significativo del riesgo sólo se detecta en la población bebedora. Este resultado es interesante si consideramos que en la población total y no bebedora no detectamos asociación de riesgo para el genotipo *Met/Met*. Ya hemos comentado la importancia de los hábitos en la modulación del efecto del genotipo, y de este modo otros autores coinciden en afirmar que el riesgo asociado al genotipo homocigoto variante de este polimorfismo solo es evidente en individuos consumidores de alcohol (Goode *et al.*, 2002). Aunque los fumadores con el genotipo variante de este polimorfismo fueron más propensos a desarrollar el cáncer, esta mayor susceptibilidad no fue de significación estadística; tampoco detectamos diferencias en la distribución de los genotipos en los grupos estratificados por el hábito de fumar.

Ser portador del genotipo homocigoto *AA* del polimorfismo *IVS5* y, además, ser bebedor, representa un incremento significativo del riesgo. Sin embargo, el hábito de fumar no modula el riesgo asociado a este genotipo.

Pocos estudios precedentes han abordado las interacciones entre los polimorfismos de *XRCC3* y los hábitos. En la mayoría de ellos no se detecta una interacción estadística clara entre estos polimorfismos y el hábito de fumar o ingerir alcohol (Stern *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004; Tranah *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2005; Skjelbred *et al.*, 2006). Otros, en cambio, citan que estos polimorfismos sí que interactúan con el alcohol y el tabaco incrementando el riesgo (Goode *et al.*, 2002; Kietthubthaw *et al.*, 2006).

En relación a los polimorfismos de *TG* se observó que entre los pacientes hubo una proporción mayor de no bebedores con los genotipos de riesgo de cualquiera de los SNPs. Sin embargo, la interacción genotipo-alcohol sólo fue significativa para el polimorfismo del exón 33. Los fumadores portadores de los genotipos de riesgo fueron más susceptibles, pero sin que este efecto alcanzara la significación. Con lo cual, parece que estos hábitos no tiene un efecto de consideración sobre la modulación del riesgo.

Igualmente, la asociación del riesgo con los polimorfismos de *TSHR* y de *PTPRJ* no fue modulada ni por el consumo de alcohol ni por el tabaco. En la literatura consultada no se hallaron trabajos que permitiesen contrastar nuestros resultados de la interacción entre genotipos de *TG*; *TSHR* y *PTPRJ* y los hábitos.

A pesar de que el número reducido de individuos en algunos subgrupos puede limitar el poder estadístico del análisis y, que algunos de los resultados pudieran requerir confirmación, es indudable que los datos que se aportan son de interés. Este estudio es, hasta donde sabemos, el primero que evalúa las interacciones entre genes y ambiente, asociado al riesgo de cáncer de tiroides.

Integrando los hallazgos de este estudio podemos aceptar que *XRCC1*, *XRCC2* y *XRCC3* se asocian al riesgo de cáncer de tiroides, que las enzimas de ambas vías reparadoras pueden interactuar sobre las lesiones que subyacen en la carcinogénesis tiroidea, sobre todo en aquellas que condicionan el desarrollo de la variante papilar. La susceptibilidad se incrementa cuando a las alteraciones de las enzimas reparadoras *XRCC1* y *XRCC3* se le suman las de la enzima del metabolismo *NAT2*. Asimismo, detectamos que los polimorfismos de *TG* resultaron ser los marcadores de susceptibilidad más relevantes de riesgo de cáncer de tiroides, siendo mayor el riesgo para el sexo femenino. Finalmente, el consumo de alcohol parece ser el único hábito que modula, con carácter de protección, el riesgo asociado a estos genotipos.

Conclusiones



5. CONCLUSIONES

De los resultados presentados y la discusión de los mismos se derivan las siguientes conclusiones:

1. El polimorfismo *Arg399Gln* de *XRCC1* no afecta la susceptibilidad al cáncer de tiroides.
2. El genotipo heterocigoto *Arg/His*, correspondiente al polimorfismo *Arg280His* de *XRCC1*, se asoció con un incremento del riesgo de cáncer de tiroides, sobre todo, con su variante papilar.
3. La sustitución del alelo *Arg* por *Trp*, en el codón 194 de *XRCC1*, ejerce un efecto protector frente al carcinoma de tiroides.
4. Los haplotipos con los alelos *280His* y *194Arg* de *XRCC1* se asocian a incrementos de riesgo. Estos alelos están en desequilibrio de ligamiento.
5. El polimorfismo *Ser326Cys* de *OGGI* no afecta la susceptibilidad al cáncer de tiroides en la población española muestreada, indicando su irrelevancia en la carcinogénesis del tiroides.
6. El genotipo homocigoto mutante de *Arg188His* de *XRCC2* disminuye la susceptibilidad a la carcinogénesis de la glándula tiroidea.
7. El alelo *G-IVS5* de *XRCC3* tiene un efecto protector recesivo frente a la variante papilar del cáncer de tiroides.
8. El cambio de aminoácido que representa el polimorfismo *Thr241Met* de *XRCC3* es irrelevante sobre la susceptibilidad. Sin embargo, el alelo *Met* en combinación haplotípica con el alelo A de *IVS5-14* se asocia con incrementos significativos de riesgo, posiblemente por estar en desequilibrio con un SNP funcional y de susceptibilidad al cáncer de tiroides.
9. Los alelos variantes, solos y en combinación haplotípica, de los polimorfismos *Ser734Ala*, *Pro778Pro*, *Met1027Val* y *Arg1980Trp* de *TG*, resultan buenos marcadores de susceptibilidad para cáncer de tiroides, con lo cual mutaciones en el gen *TG* parecen ser relevante en la carcinogénesis tiroidea.
10. Los polimorfismos *Pro52Thr* y *Asp727Glu* de *TSHR* no están implicados en la carcinogénesis del tiroides.
11. El polimorfismo *Asp872Glu* de *PTPRJ* no se asocia con el riesgo, aunque se observa una tendencia a que el genotipo variante tenga un efecto protector.

12. La combinación de algunos genotipos de *XRCC1* y de *XRCC3*, *280His/His-A/IVS5-14*, *194Arg/Trp-241Met/Met*, aumentan la susceptibilidad al cáncer y revela la interacción entre enzimas de dos mecanismos reparadores.
13. Las interacciones de los genotipos de las *GST* con las enzimas de reparación no tuvieron efecto significativo sobre el riesgo a desarrollar cáncer de tiroides.
14. La susceptibilidad al cáncer de tiroides se incrementa por el genotipo *NAT2* (en concreto por *NAT2*5* +/+ y *NAT2*6*) en individuos donde los mecanismos reparadores están alterados por los polimorfismos en el codón 280 y 399 de *XRCC1*, y *IVS5-14* de *XRCC3*.
15. Las mujeres portadoras de los genotipo de riesgo de los polimorfismos *Arg194Trp* de *XRCC1*, *Arg188His* de *XRCC2*, *IVS5-14* de *XRCC3*, los 4 SNPs estudiados en *TG* y *Asp872Glu* de *PTPRJ* tienen una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer de tiroides.
16. Los polimorfismos *Arg194Trp*, *Arg399Gln*, *Arg188His*, *Arg1980Trp* modifican el riesgo de cáncer de tiroides asociado al consumo de alcohol, y el carácter de la interacción es de protección para los bebedores; en cambio, el alcohol incrementa el riesgo asociado a los polimorfismos de *XRCC3*.
17. La edad y el hábito de fumar no modularon el riesgo de cáncer de tiroides asociado a los genotipos.

Bibliografía



7. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Rahman S., El-Zein R. 2000a. The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett.* 159: 63-71.
- Abdel-Rahman S., Soliman A., Bondy M., Omar S., El-Badawy S., Khaled H., Seifeldin I., Levin B. 2000b. Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett.* 159: 79-86.
- Abdulmughni Y., Al-Hureibi M., Al-Hureibi K., Ghafoor M., Al-Wadan A., Al-Hureibi Y. 2004. Thyroid cancer in Yemen. *Saudi Med. J.* 25: 55-59.
- ACOR Association of Cancer Online Resources. 2005. Cáncer de la tiroides. <http://www.acor.org/cnet/256718.html>.
- Adeniran A., Zhu Z., Gandhi M., Steward D., Fidler J., Giordano T., Biddinger, P., Nikiforov Y. 2006. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 30: 216-222.
- Ahmadian A., Gharizadeh B., O'Meara D., Odeberg J., Lundeberg J. 2001. Genotyping by apyrase-mediated allele-specific extension. *Nucleic Acids Res.* 29: e121-e126.
- Akamizu T., Ikuyama S., Saji M., Kosugi S., Kozak C., McBride O., Kohn L. 1990. Cloning, chromosomal assignment, and regulation of the rat thyrotropin receptor: expression of the gene is regulated by thyrotropin, agents that increase cAMP levels, and thyroid autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 5677-5681.
- Akslen L., Haldorsen T., Thoresen S., Glatte E. 1993. Incidence pattern of thyroid cancer in Norway: influence of birth cohort and time period. *Int. J.Cancer.* 53: 183-187.
- Albores-Saavedra J. 2002. Hiperplasia de células C y carcinoma medular de tiroides. Centro Nacional De Investigaciones Oncologicas Carlos III CNIO.
- Almudevar E., Puras A., De Miguel C., Urbiola E., Lopez-Cousillas A., Menendez E., Garcia de Jalon J., Romeo I. 2000. Value of the expression of p21RAS, P53,

- Bcl-2 oncoproteins and Ki-67(MIB-1) antigen of cellular proliferation in the diagnosis and prognosis of thyroid. *An. Sist. Sanit. Navar.* 23: 247- 255.
- Alvárez-Nuñez F., Mora J., Matias-Guiu X. 2003. Thyroid carcinomas of the follicular epithelium: tumor markers and oncogenes. *Med. Clin. (Barc).* 121: 264-269.
- American Cancer Society. (ACS) 2005. *Que es el cáncer de Tiroides?* Atlanta, Ga: American Cancer Society. <http://www.cancer.org/>
- Andreassen C., Alsner J., Overgaard M., Overgaard J. 2003. Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother. Oncol.* 69: 127-135.
- Andrisin T., Humma L., Johnson J. 2002. Collection of genomic DNA by the non-invasive mouthwash method for use in pharmacogenetic studies. *Pharmacotherapy.* 22: 954-960.
- Arai T., Kelly V., Minowa O., Noda T., Nishimura S. 2006. The study using wild-type and Ogg1 knockout mice exposed to potassium bromate shows no tumor induction despite an extensive accumulation of 8-hydroxyguanine in kidney DNA. *Toxicology.* 221: 179-86.
- Arthur J. 1995. Glutathione peroxidase functions of Selenium. In: *Proceedings Of The Symposium on Biotechnoloin Feed Industry. Memories of the XII Symposium on biotechnology in the feend industry.* Nothingham: Alltech. 143: 14-54.
- Arturi F., Scarpelli D., Coco A., Sacco R., Bruno R., Filetti S., Russo D. 2003. Thyrotropin receptor mutations and thyroid hyperfunctioning adenomas ten years after their first discovery: unresolved questions. *Thyroid.* 13: 341-343.
- Auranen A., Song H., Waterfall C., Dicioccio R., Kuschel B., Kjaer S., Hogdall E., Hogdall C., Stratton J., Whittemore A, Easton D., Ponder B., Novik K., Dunning A., Gayther S., Pharoah P. 2005. Polymorphisms in DNA repair genes and epithelial ovarian cancer risk. *Int. J. Cancer.* 117: 611-618.
- Aust G., Steinert M., Boltze C., Kiebling S., Simchen C. 2001. GRO- α in normal and pathological thyroid tissues and its regulation in thyroid -derived cells. *J. Endocrinol.* 170: 513-520.
- Baas F., van Ommen G., Bikker H., Arnberg A., Vijlder J. 1986. The human thyroglobulin gene is over 300 kb long and contains introns of up to 64 kb. *Nucleic Acids Res.* 14: 5171–5186.

- Bahn R., Dutton C., Heufelder A., Sarkar G. 1994. A genomic point mutation in the extracellular domain of the thyrotropin receptor in patients with Graves' ophthalmopathy. *J. Clin. Endocr. Metab.* 78: 256-260.
- Ban Y., Greenberg D., Concepción E., Tomer Y. 2002. A germline single nucleotide polymorphism at the intracellular domain of the human thyrotropin receptor does not have a major effect on the development of Graves' disease. *Thyroid.* 12: 1079-1083.
- Ban Y., Greenberg D., Concepción 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., Ban Y. 2004. Association of a thyroglobulin gene polymorphism with Hashimoto's thyroiditis in the Japanese population. *Clinical Endocrinol.* 61: 263-268.
- Belge G., Thode B., Bullerdiel J., Bartnitzke S. 1991. Deletion of part of long arm chromosome 13 as the only karyotypic aberration in a follicular thyroid adenoma. *Cancer Genet.* 56: 277-280.
- Belge G., García E., de Jong P., Bartnitzke S., Bullerdiel J. 1995. FISH analysis of a newly established thyroid tumor cell line showing at (1;19)(p35 or p36.1;q13) reveal that the breakpoint lies between 19q13.3-13.4 and 19q13.4. *Cytogenet. Cell Genet.* 69: 220-222.
- Belge G., Bruckmann S., Thode B., Bartnitzke S., Bullerdiel J. 1996. Deletion of the short arm of chromosome 2 characterize a new cytogenetic subgroup of benign thyroid tumors. *Genes Chromos. Cancer.* 16: 149-151.
- Belge G., Roque L., Soares J., Bruckmann S., Thode B., Fonseca E., Clode A., Bartnitzke S., Castedo S., Bullerdiel J. 1998. Cytogenetic investigations of 340 thyroid hyperplasias and adenomas revealing correlations between cytogenetic findings and histology. *Cancer Genet. Cytogenet.* 101: 42-8.
- Benhamou S., Tuimala J., Bouchardy C., Dayer P., Sarasin A., Hirvonen A. 2004. DNA repair gene XRCC2 and XRCC3 polymorphisms and susceptibility to cancers in the upper aerodigestive tract. *Int. J. Cancer.* 112: 901-904.
- Bergers G., Hanahan D., Coussens L.M. 1998. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 995-1002.

- Bernard P., Wittwer C. 2000. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridisation probes. *Clinic. Chem.* 46: 147-148.
- Bernard P., Ajioka R., Kushner J., Wittwer C. 1998. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Amer. Pathol.* 153: 1055-1061.
- Bernard P., Pritham G., Wittwer C. 1999. Color multiplexing hybridisation probes using the apolipoprotein E locus as a model system for genotyping. *Anal. Biochem.* 273: 221-228.
- Bernard P., Reiser A, Pritham G. 2001. Mutation detection by fluorescent hybridization probe melting curves. In: *Real-time PCR: methods and applications*. Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K. (Eds.). Springer-Verlag Berlín, Heidelberg.
- Bertram J. 2001. The molecular biology of cancer. *Mol. Aspects Med.* 21: 167-223.
- Bertram C., Gaut R., Barrett J., Randerson-Moor J., Whitaker L., Turner F., Bataille V., dos Santos Silva I., Swerdlow A., Bishop D., Newton Bishop J. 2004. An assessment of a variant of the DNA repair gene XRCC3 as a possible nevus or melanoma susceptibility genotype. *J. Invest. Dermatol.* 122: 429-432.
- Berwick M., Vineis P. 2000. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an Epidemiologic Review. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 874-897.
- Besic N., Hocevar M., Zgajnar J., Petric R., Pilko G. 2006. Aggressiveness of therapy and prognosis of patients with hurthle cell papillary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 16: 67-72.
- Bhattacharyya N., Banerjee S. 2001. A novel role of XRCC1 in the functions of a DNA polymerase beta variant. *Biochemistry.* 40: 9005-9013.
- Blanco Carrera C., Pelaez Torres N., García-Díaz J, Maqueda Villaizan E., Sanz J., Álvarez Hernández J. 2005. Epidemiological and clinicopathological study of thyroid cancer in east Madrid *Rev. Clin. Esp.* 205: 307-310.
- Boffetta P., Hashibe M. 2006. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 7: 149-156.
- Boffetta P., Hashibe M., La Vecchia C., Zatonski W., Rehm J. 2006. The burden of cancer attributable to alcohol drinking. *Int. J. Cancer.* 23. en prensa
- Bond J., Wyllie F., Rowson J., Radulescu A., Wynford-Thomas D. 1994. In vitro reconstruction of tumour initiation in a human epithelium. *Oncogene.* 9: 281-290.
- Bosetti C., Negri N., 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., Glattre E., Lund E., Levi F., Linos D., La Vecchia C. 2002. Pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer VII. Cruciferous and other vegetables (International) Cancer Causes Control.13: 765-775.
- Bottema C., Sommer S. 1993. PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutat. Res.* 288: 93-102.
- Braasch D., Corey D. 2001. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem. Biol.* 8: 1-7.
- Brenneman M., Weiss A., Nickoloff J., Chen D. 2000. XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. *Mutat. Res. DNA Repair.* 459: 89-97
- Brenneman M., Wagener B., Miller C., Allen C., Nickoloff J. 2002. XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Molec. Cell.* 10: 387-395.
- Brooks R., Williamson J., Hensley A., Butler E., Touchton G., Smith E. 2003. Buccal cells as a source of DNA for comparative animal genomic analysis. *Biotechnol. Lett.* 25: 451-454.
- Butkiewicz D., Rusin M., Enewold L., Shields P.G., Chorazy M., Harris C.C. 2001. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis.* 22: 593-597.
- Caldecott K. 2003. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair.* 2: 955-969.
- Calin G., Trapasso F., Shimizu M., Dumitru C., Yendamuri S., Godwin A., Ferracin M., Bernardi G., Chatterjee D., Baldassarre G., Rattan S., Alder H., Mabuchi H., Shiraishi T., Hansen L., Overgaard J., Herlea V., Mauro F., Dighiero G., Movsas B., Rassenti L., Kipps T., Baffa R., Fusco A., Mori M., Russo G., Liu C., Neubergh D., Bullrich F., Negrini M., Croce C. 2005. Familial cancer associated with a polymorphism in ARLTS1. *N. Engl. J. Med.* 352: 1667-1676.
- Callebaut I., Labesse G., Durand P., Poupon A., Canard L., Chomilier J., Henrissat B., Mornon J.P. 1997. *Cell Mol. Life Sci.* 53: 621-645.
- Cartwright R., Tambini C., Simpson P., Thacker J. 1998. The XRCC2 DNA repair gene from human and mouse encodes a novel member of the recA/RAD51 family. *Nucleic Acids Res.* 26: 3084-3089.
- Céspedes T., Sánchez D. 2001. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev. Cubana Cardiol.* 14: 55-60.

- Cetani F., Tonacchera M., Pinchera A., Barsacchi R., Basolo F., Miccoli P., Pacini F. 1999. Genetic analysis of the TSH receptor gene in differentiated human thyroid carcinomas. *J. Endocrinol. Invest.* 22: 273-278.
- Chacko P., Rajan B., Joseph T., Nathew D., Pillai M. 2005. Polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 and increased genetic susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res. Treatm.* 89: 15-21.
- Chin C., Sachs J., Engelman D. 2005. Transmembrane homodimerization of receptor-like protein tyrosine phosphatases. *FEBS Lett.* 579: 3855-3858.
- Chistiakov D. 2003. Thyroid stimulating hormone receptor and its role in Graves' disease. *Mol. Gen. Metab.* 80: 377-388.
- Chistyakov D., Savost'anov K., Turakulov R., Petunina N., Trukhina L., Kudinova A., Balabolkin M., Nosikov V. 2000. Complex association analysis of Graves disease using a set of polymorphic markers. *Mol. Genet. Metab.* 70: 214-218.
- Chistiakov D., Savost'anov K., Turakulov R., Petunina N., Balabolkin M., Nosikov V. 2002. Further studies of genetic susceptibility to Graves' disease in a Russian population. *Med. Sci. Monit.* 8: CR180-184.
- Chistiakov D., Savost'anov K., Turakulov R. 2004. Screening of SNPs at 18 positional candidate genes, located within the GD-1 locus on chromosome 14q23-q32, for susceptibility to Graves' disease: a TDT study. *Mol. Genet. Metab.* 83: 264-270.
- Chou H., Shi Y., Chang C., Tsai F. 2002. The polymorphisms of codon 727 and 52 of thyroid-stimulating hormone receptor gene are not associated with mitral valve prolapse syndrome in Taiwan Chinese. *Jpn. Heart. J.* 43: 655-666.
- Ciampi R., Knauf J., Kerler R., Gandhi M., Zhu Z., Nikiforova M., Rabes H., Fagin J., Nikiforov Y. 2005. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J. Clin. Invest.* 115: 20-23.
- Cian D., Demarchi R., Gay C., Pérez M. 2004. Patología tiroidea. Prevalencia de patología benigna y maligna. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina.* 135: 17-20. http://med.unne.edu.ar/revista/revista135/pat_tiroi.pdf
- Clayton D., Chapman J., Cooper J. 2004. Use of unphased multilocus genotype data in indirect association studies. *Genet. Epidemiol.* 27: 415-428.
- Collins J., Heward J., Howson J., Foxall H., Carr-Smith J., Franklyn J., Gough S. 2004. Common allelic variants of exons 10, 12, and 33 of the thyroglobulin gene are not associated with autoimmune thyroid disease in the United Kingdom. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 6336-6339.

- Cordell H., Clayton D. 2005. Genetic association studies. *Lancet*. 366: 1121-1131.
- Corral J., Martin C., Perez R., Sanchez I., Mories M., San Millan J., Miralles J., González-Sarmiento R. 1993. Thyroglobulin gene point mutation associated with non-endemic simple goitre. *Lancet*. 341: 462-464.
- Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Microbiol. Clin.* 22: 299-305.
- Cotterill S., Pearce M., Parker L. 2001. Thyroid cancer in children and young adults in the North of England. Is increasing incidence related to the Chernobyl accident?. *Eur. J. Cancer*. 37: 1020-1026.
- Cox M., Goodman M., Kreuzer K., Sherratt D., Sandler S., Marians K. 2000. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*. 404: 37-41.
- Creus A. 2002. Genotoxicidad, Mutagénesis y Carcinogénesis. en: *Carcinogénesis en: Genética Toxicológica y Carcinogénesis*. Paz y Miño C., Creus A., Cabre O., Leone P. (eds). PUCE, FUNDACYT.
- Criado B., Barros A., Suijkerbuijk R., Weghuis D., Seruca R., Fonseca E., Castedo S. 1995. Detection of numerical alterations for chromosomes 7 and 12 in benign thyroid lesions by in situ hybridization. *Histolog. Implicat.* 147: 136-144.
- Cuddihy R., Dutton C., Bahn R. 1995. A polymorphism in the extracellular domain of the thyrotropin receptor is highly associated with autoimmune thyroid disease in females. *Thyroid*. 5: 89-95.
- Dal Maso L., La Vecchia C., Franceschi S., Preston-Martin S., Ron E., Levi F., Mack W., Mark S., McTiernan A., Kolonel L., Mabuchi K., Jin F., Wingren G., Galanti M., Hallquist A., Glatte E., Lund E., Linos D., Negri E. 2000. A pooled analysis of thyroid cancer studies. V. Anthropometric factors. *Cancer Causes Control*. 11: 137-144.
- Dantzer F., de La Rubia G., Menissier-De Murcia J., Hostomsky Z., de Murcia G., Schreiber V. 2000. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*. 39: 7559-7569.
- David-Beabes G., London S. 2001. Genetic polymorphism of XRCC1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians. *Lung Cancer*. 34: 333-339.
- David-Beabes G., Lunn R., London S. 2001. No association between the XPD (Lys751Gln) polymorphism or the XRCC3 (Thr241Met) polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10: 911-912.

- Day J., Bergstrom D., Hammer R., Barany F. 1999. Nucleotide analogs facilitate base conversion with 30 mismatch primers. *Nucleic Acids Res.* 27: 1810–1818.
- De Brakeleer S., Teugels E., De Greve J. 2005. Familial cancer and ARLTS1. *N. Engl. J Med.* 353: 313-4.
- De Ruyck K., Van Eijkeren M., Claes K., Morthier R., De Paepe A., Vral A., De Ridder L., Thierens H. 2005. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 62: 1140-1149.
- de Silva D., Wittwer C. 2000. Monitoring hybridization during polymerase chain reaction. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 741: 3-13.
- Deans B., Griffin, C., Maconochie M., Thacker J. 2000. XRCC2 is required for genetic stability, embryonic neurogenesis and viability in mice. *EMBO J.* 19: 6675-6685.
- Demant P. 2003. Cancer Susceptibility In The Mouse: Genetics, Biology And Implications For Human Cancer. *Nature Rev. Genet.* 4: 721-735.
- Dherin C., Radicella J., Dizdaroglu M., Boiteux S. 1999. Excision of oxidatively damaged DNA base by the human alpha-hOGG1 protein and polymorphic alpha-hOGG1 (Ser326Cys) which is frequently found in human populations. *Nucl. Acids Res.* 27: 4001-4007.
- Dianova I., Sleeth K., Allinson S., Parsons J., Breslin C., Caldecott K., Dianov G. 2004. XRCC1-DNA polymerase beta interaction is required for efficient base excision repair. *Nucleic. Acids Res.* 32: 2550-2555.
- Dianzani I., Gibello L., Biava A., Giordano M., Bertolotti M., Betti M., Ferrante D., Guarrera S., Betta G., Mirabelli D., Matullo G., Magnani C. 2006. Polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma in a general population study. *Mutat Res.* 23. En prensa.
- Divine K., Gilliland F., Crowell R., Stidley C., Bocklage T., Cook D., Belinsky S. 2001. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat. Res.* 461: 273-278.

- Diwan B., Henneman J., Rice J., Nims R. 1996. Enhancement of thyroid and hepatocarcinogenesis by 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene in rats at doses that cause maximal induction of CYP2B. *Carcinogenesis*. 17: 37-43.
- Doll M., Hein D. 2001. Comprehensive human NAT2 genotype method using single nucleotide polymorphism-specific polymerase chain reaction primers and fluorogenic probes. *Analyt. Biochem.* 288: 106-108.
- Donnelly J. 2004. Pharmacogenetics in cancer chemotherapy: balancing toxicity and response. *Ther. Drug Monit.* 26: 231–235.
- Duan Z., Shen H., Lee J., Gershenwald J., Ross M., Mansfield P., Duvic M., Strom S., Spitz M., Wei Q. 2002. DNA repair gene XRCC3 241Met variant is not associated with risk of cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 1142-1143.
- Duarte J., Colombo A., Baptista A., Silva A. 2005a. Polymorphisms of the DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3* in a Brazilian population. *Genetics and Molecular Biology*. 28: 397-401.
- Duarte M., Colombo J., Rossit A., Caetano A., Borim A., Wornrath D., Silva A. 2005b. Polymorphisms of DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3*, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 11: 6593-6600.
- Duell E., Wiencke J., Cheng T., Varkonyi A., Zuo Z., Ashok T., Mark E., Wain J., Christiani D., Kelsey K. 2000. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*. 21: 965–971.
- Duell E., Millikan R., Pittman G., Winkel S., Lunn R., Tse C., Eaton A., Mohrenweiser H., Newman B., Bell D. 2001. Polymorphisms in the DNA repair gene *XRCC1* and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10: 217–222.
- Duell E., Holly E., Bracci P., Wiencke J., Kelsey K. 2002. A population-based study of the Arg399Gln polymorphism in X-ray repair cross- complementing group 1 (*XRCC1*) and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 62: 4630-466.
- Dumitrescu R., Shields P. 2005. The etiology of alcohol-induced breast cancer. *Alcohol*. 35: 213-225.
- Dunning A., Healey C., Pharoah P., Teare M., Ponder B., Easton D. 1999. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8: 843-854.

- Eng P., Cardona G., Fang S., Previti M., Alex S. Carrasco N., Chin W., Braverman L. 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.
- Essers J., van Steeg H., de Wit J., Swagemakers S., Vermeij M., Hoeijmakers J., Kanaar R. 2000. Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. *EMBO J*. 19: 1703-1710.
- Evans M. 2005. Prostate Cancer and DNA Repair. National Institute on Aging. National Institutes of Health. <http://www.grc.nia.nih.gov/branches/bc/dnarepair.htm>
- Fagin J. 2006. Editorial: Challenging dogma in thyroid cancer molecular genetics-role of *RET/PTC* and *BRAF* in tumor initiation. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 89: 4264-4266.
- Fagin J., Matsuo K., Karmakar A., Chen D., Tang S., Koeffler H. 1993. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J. Clin. Invest*. 91: 179-184.
- Falvo L., Catania A., Sorrenti S., Andrea V., Berni A., De Stefano M., De Antoni E. 2004. Prognostic significance of the age factor in the thyroid cancer: statistical analysis. *J. Surg. Oncol*. 88: 217-222.
- Fan F., Liu C., Tavare S., Arnheim N. 1999. Polymorphisms in the human DNA repair gene XPF. *Mutat. Res*. 406: 115-120.
- Featherstone C., Jackson S. 1998. DNA repair: the Nijmegen breakage syndrome protein. *Curr. Biol*. 8: 622-625.
- Feigelson H., Rodríguez C., Robertson A., Jacobs E., Calle E., Reid Y., Thun M. 2001. Determinants of DNA yield and quality from bucal cell samples collected with mouthwash. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*. 10: 1005-1008.
- Ferrís J., García J., Berbel O. 2001. Dieta y cáncer pediátrico. *Rev. Esp. Pediatr*. 57: 75-92.
- Figueiredo J., Knight J., Briollais L., Andrulis I., Ozcelik H. 2004. Polymorphisms XRCC1-R399Q and XRCC3-T241M and the risk of breast cancer at the Ontario site of the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 13: 583-591.
- Fleites G. 1999. Dieta y cáncer del tiroides. *Rev Cubana Oncol* 15: 119-130.

- Ford B., Ruttan C., Kyle V., Brackley M., Glickman B. 2000. Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis*. 21: 1977–1981.
- Foukakkis T., Thoppe S., Lagercrantz S., Dwight T., Weng W., Svensson A., Hoog A., Zedenius J., Wallin G., Lui W., Larsson C. 2005. Molecular cytogenetic characterization of primary cultures and established cell lines from non-medullary thyroid tumors. *Int. J. Oncol.* 26: 141-149.
- Franceschi S., Preston-Martin S., Dal Maso L., Negri E., La Vecchia C., Mack W., McTiernan A., Kolonel L., Mark S., 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.
- Frisk T., Zedenius J., Lundberg J., Wallin G., Kytola S., Larsson C. 2001. CGH alterations in medullary thyroid carcinomas in relation to the RET M918T mutation and clinical outcome. *Int. J. Oncol.* 18: 1219-1225.
- Fuller L., Painter R. 1988. A Chinese hamster ovary cell line hypersensitive to ionizing radiation and deficient in repair replication. *Mutat. Res.* 193: 109-21.
- Gabriel E., Bergert E., Grant C., van Heerden J., Thompson G., Morris J. 1999. Germline polymorphism of codon 727 of human thyroid-stimulating hormone receptor is associated with toxic multinodular goiter. *J. Clin. Endocr. Metab.* 84: 3328-3335.
- Galanti M., Sparen P., Karlsson A., Grimelius L., Ekbom A. 1995. Is residence in areas of endemic goiter a risk factor for thyroid cancer?. *Int. J. Cancer*. 61: 615-621.
- Galanti M., Hansson L., Lund E., Bergstrom R., Grimelius L., Stalsberg H., Carlsen E., Baron J., Persson I., Ekbom A. 1996. Reproductive history and cigarette smoking as risk factors for thyroid cancer in women: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 5: 425-431.
- Garcia-Closas M., Egan K., Abruzzo J., Newcomb P., Titus-Ernstoff L., Franklin T., Bender P., Beck J., Le Marchand L., Lum A., Alavanja M., Hayes R., Rutter J., Buetow K., Brinton L., Rothman N. 2001. Collection of genomic DNA in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 10: 687–696.
- Garcia-Closas M., Egan K., Newcomb P., Brinton L., Titus-Ernstoff L., Chanock S., Welch R., Lissowska J., Peplonska B., Szeszenia-Dabrowska N., Zatonski W.,

- Bardin-Mikolajczak A., Struewing J. 2006. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and risk of breast cancer: two population-based studies in USA and Poland, and meta-analyses. *Hum Genet.* 17. en prensa
- García-Rostán G., Tallin G., Herrero A., D'Aquila T., Carcangiu M., Rimm D. 1999. Frequent mutation and nuclear localization of β -catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 59: 1811-1815.
- García-Rostán G., Costa A., Pereira-Castro I., Salvatore G., Hernández R., Hermsem M., Herrero A., Fusco A., Cameselle-Teijeiro J., Santoro M. 2005. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res.* 65: 10199-10207.
- Gaspar J., Rodrigues S., Gil O., Manita I., Ferreira T., Limbert E., Goncalves L., Pina J., Rueff J. 2004. Combined effects of glutathione S-transferase polymorphisms and thyroid cancer risk. *Cancer Genet. Cytogenet.* 151: 60-67.
- Godballe C., Asschenfeldt P., Jørgensen K., et al. 1998. Prognostic factors in papillary and follicular thyroid carcinomas: p53 expression is a significant indicator of prognosis. *Laryngoscope.* 108: 243-9.
- Goode E., Ulrich C., Potter J. 2002. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 1513-1530.
- Goto A., Sakamoto A., Machinami R. 2001. An immunohistochemical analysis of cyclin D1, p53, and p21waf1/cip1 proteins in tumors originating from the follicular epithelium of the thyroid gland. *Pathol. Res. Pract.* 197: 217-222.
- Graf H. 2005. Poorly differentiated thyroid carcinomas: new therapeutics considerations. *Arq Bras. Endocrinol. Metabol.* 49: 711-718.
- Guerra J. 2001. Carcinoma anaplásico de tiroides: Consideraciones de actualidad. *Rev. Cubana Cir.* 40: 99-105. <http://scielo.sld.cu/scielo.php?>
- Han J., Colditz G., Samson L., Hunter D. 2004a. Polymorphisms in DNA double strand break repair genes and skin cancer risk. *Cancer Res.* 64: 3009-3030.
- Han J., Hankinson S., Hunter D.J., De Vivo I. 2004b. Genetic variations in XRCC2 and XRCC3 are not associated with endometrial cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13: 330-331.
- Han J., Hankinson S., Ranu H., De Vivo I., Hunter D. 2004c. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *Carcinogenesis.* 25: 189-195.
- Hanahan D., Weinberg R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100: 57-70.

- HapMap-CEU. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ss.cgi?ss=ss1819012
- Hardie L., Briggs J., Davidson L., Allan J., King R., Williams G., Wild C. 2000. The effect of hOGG1 and glutathione peroxidase I genotypes and 3p chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer. *Carcinogenesis*. 21: 167-172.
- Hashiguchi, Stuart J., de Souza-Pinto N., Bohr V. 2004. The C-terminal α O helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial β -Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. *Nuclei Acids*. 32: 5596-5608
- Hattersley A., MacCarthy M. 2005. What makes a good genetic association study?. *Lancet*. 366: 1315-1323.
- Hedinger C. 1981. Geographic pathology of thyroid disease. *Pathol. Res. Pract.* 171: 285-292.
- Hedinger C., Williams E., Sobin L. 1988. (Eds). *Histological typing of thyroid tumours*. Springer Verlag, Berlin, No. of pages: 67 + xii.
- Hein D. 2002. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mut. Res.* 506-507: 65-77.
- Hein D., Doll M., Rustan T., Ferguson R. 2000. Metabolic activation of N-hydroxyarylamines and N-hydroxyarylamides by 16 recombinant human NAT2 allozymes: effects of 7 specific NAT2 nucleic acid substitutions. *Cancer Res.* 55: 3531-3536.
- Heldin N., Gustavsson B., Westermark K., Westermark B. 1991. A somatic point mutation in a putative ligand binding domain of the TSH receptor in a patient with autoimmune hyperthyroidism. *J. Clin. Endocr. Metab.* 73: 1374-1376.
- Hemminki K., Shields P. 2002. Skilled use of DNA polymorphisms as a tool for polygenic cancers. *Carcinogenesis*. 23: 379-380.
- Hermann S., Sturm I., Mrozek A., Klosterhalfen B., Hauptmann S, Dorken B., Daniel P. 2001. Bax expression in benign and malignant thyroid tumours: desregulation of wild-type P53 is associated with a high Bax and P21 expression in thyroid carcinoma. *Int. J. Cancer*. 92: 805-811.
- Hernández A., Cespedes W., Xamena N., Surralles J., Creus A., Galofre P., Marcos R. 2003. Glutathione S-transferase polymorphisms in thyroid cancer patients. *Cancer Lett.* 190: 37-44.

- Hishinuma A., Fukata S., Kakudo K., Murata Y., Ieiri T. 2005. High incidence of thyroid cancer in long-standing goiters with thyroglobulin mutations. *Thyroid*. 15: 1079-1084.
- 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 S., Goh S., Khoo D. 2003. Association of Graves' disease with intragenic polymorphism of the thyrotropin receptor gene in a cohort of Singapore patients of multi-ethnic origins. *Thyroid*. 13: 523-528.
- Hoeijmakers J. 2001a. DNA repair mechanisms. *Maturitas*. 38:17-22
- Hoeijmakers J. 2001b. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 411: 366-374.
- Honda H., Inazawa J., Nishida J., Yazaki Y., Hirai H. 1994. Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of a novel protein-tyrosine phosphatase, HPTP eta. *Blood*. 84:4186-4194.
- Hong Y., Lee K., Kim W., Choi S., Woo Z., Shin S., Kim H. 2005. Polymorphisms of XRCC1 gene, alcohol consumption and colorectal cancer. *Int. J. Cancer*. 116: 428-432.
- Houlston R., Tomlinson P. 2000. Detecting low penetrance genes in cancer: the way ahead. *J. Med. Genet.* 37: 161-167.
- Hrafinkelsson J., Tulinius H., Kjeld M., Sigvaldason H., Jonasson J. 2000. Serum thyroglobulin as a risk factor for thyroid carcinoma. *Acta Oncol.* 39: 973-977.
- Hu J., Smith T., Miller M., Mohrenweiser H., Golden A., Case L. 2001. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*. 22: 917-922.
- Hu J., Mohrenweiser H., Bell D., Leadon S., Miller M. 2002. Symposium Overview: Genetic polymorphisms in DNA repair and cancer risk. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185: 64-73.
- Hundahl S., Fleming I., Fremgen A., Menck H. 1998. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer*. 83: 2638-2648.

- Hung R., Brennan P., Canzian F., Szeszenia-Dabrowska N., Zaridze D., Lissowska J., Rudnai P., Fabianova E., Mates D., Foretova L., Janout V., Bencko V., Chabrier A., Borel S., Hall J., Boffetta P. 2005a. Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *J. Natl. Cancer Inst.* 97: 567–576.
- Hung R, Hall J, Brennan P, Boffetta P. 2005b. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 162: 925-42.
- Ieiri T., Cochaux P., Targovnik H., 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: 1901-2005.
- Imyanitov E., Togo A., Hanson K. 2004. Searching for cancer-associated polymorphisms: promises and obstacles. *Cancer Lett.* 204: 3-14.
- Iniesta R., Guinó E., Moreno V. 2005. Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gac. Sanit.* 19: 333-341.
- ISMWG (International SNP Map Working Group). 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 409: 928–933.
- Iuliano R., Le Pera I., Cristofaro C., Baudi F., Arturi F., Pallante P., Martelli M., Trapasso F., Chiariotti L., Fusco A. 2004. The tyrosine phosphatase PTPRJ/DEP-1 genotype affects thyroid carcinogenesis. *Oncogene.* 23: 8432-8438.
- Jacobsen N., Bentzen J., Meldgaard M., Jakobsen M.H., Fenger M., Kauppinen S., Skouv J. 2002a. LNA-enhanced detection of single nucleotide polymorphisms in the apolipoprotein E. *Nucleic Acids Res.* 30: e100.
- Jacobsen N., Fenger M., Bentzen J., Rasmussen S., Jakobsen M., Fenstholt J., Skouv J. 2002b. Genotyping of the apolipoprotein B R3500Q mutation using immobilized locked nucleic acid capture probes. *Clin. Chem.* 48: 657–660.
- Jacobsen N., Nexø B., Olsen A., Overvad K., Wallin H., Tjønneland A., Vogel U. 2003. No association between the DNA repair gene XRCC3 T241M polymorphism and risk of skin cancer and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 584-585.

- Jacobsen N., Raaschou-Nielsen O., Nexø B., Wallin H., Overvad K., Tjønneland A., Vogel U. 2004. XRCC3 polymorphisms and risk of lung cancer. *Cancer Lett.* 213: 67-72.
- Jaiswal M., LaRusso N., Nishioka N., Nakabeppu Y., Gores G. 2001. Human Ogg1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide. *Cancer Res.* 61: 6388-6393.
- Janssen K., Schlink K., Gotte W., Hipper B., Kaina B., Oesch F. 2001. DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326. *Mutat. Res.* 486: 207-216.
- Jin M., Chen K., Song L., Fan C., Chen Q., Zhu Y., Ma X., Yao K. 2005. The association of the DNA repair gene XRCC3 Thr241Met polymorphism with susceptibility to colorectal cancer in a Chinese population. *Cancer Genet. Cytogenet.* 163: 38-43.
- Johnson M., Haupt L., Griffiths L. 2004. Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using real-time PCR. *Nucleic Acids Research.* 32: 55.
- Johnson R., Jasin M. 2001. Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 196–201.
- Johnson R., Liu N., Jasin M. 1999. Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature* 401: 397-399.
- Jones N., Cox R., Thacker J. 1987. Isolation and cross-sensitivity of X-ray-sensitive mutants of V79-4 hamster cells. *Mutat. Res.* 183: 279-286.
- Judkins T., Hendrickson B., Deffenbaugh A., Scholl T. 2005. Single nucleotide polymorphisms in clinical genetic testing: the characterization of the clinical significance of genetic variants and their application in clinical research for BRCA1. *Mutat. Res.* 573: 168-179.
- Kaczur V., Takacs M., Szalai C., Falus A., Nagy Z., Berencsi G., Balazs C. 2000. Analysis of the genetic variability of the 1st (CCC/ACC, P52T) and the 10th exons (bp 1012-1704) of the TSH receptor gene in Graves' disease. *Eur. J. Immunogenet.* 27: 17-23.
- Kakinuma A., Nagayama Y. 2002. Multiple messenger ribonucleic acid transcripts and revised gene organization of the human TSH receptor. *Endocr. J.* 49: 175-180.

- Kattah W. 2004. Enfermedad Tiroidea Autoinmune. Pruebas de diagnóstico y seguimiento. Médico-Legal. X. http://www.medicolegal.com.co/3_2004/salud_2.htm
- Kazanietz M., Santa Coloma T. 2000. Receptores acoplados a proteínas G-heterotriméricas. En: Farmacología Molecular: Receptores, transducción de señales y activación de genes (Kazanietz M. ed.). Universidad Nacional de Quilmes Ediciones, Buenos Aires, pp. 25.
- Kellie S., Craggs G., Bird I., Jones G. 2004. The tyrosine phosphatase DEP-1 induces cytoskeletal rearrangements, aberrant cell-substratum interactions and a reduction in cell proliferation. *J. Cell. Sci.* 117: 609-618.
- Kietthubthew S., Sriplung H., Au W., Ishida T. 2006. Polymorphism in DNA repair genes and oral squamous cell carcinoma in Thailand. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 209: 21-29.
- Kim J., Park Y., Kim K., Kim J., Song B., Lee M., Kim C., Chang S. 2003. hOGG1 Ser326Cys polymorphism modifies the significance of the environmental risk factor for colon cancer. *World J. Gastroenterol.* 9: 956-960.
- Kim P., Hossain S., Park Y., Lee I., Yoo S., Arvan P. 1998. A single amino acid change in the acetylcholinesterase-like domain of thyroglobulin causes congenital goiter with hypothyroidism in the cog/cog mouse: a model of human endoplasmic reticulum storage diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 9909-9913.
- King I., Satia-About J., Thornquist M., Bigler J., Patterson R., Kristal A., Shattuck A., Potter J., White E., Abouta J. 2002. Buccal cell DNA yield, quality, and collection costs: comparison of methods for large-scale studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 1130-1133.
- Kingman S. 1992. Thyroid cancer rises after Chernobyl. *Br. Med. J.* 305: 601-602.
- Kirk B., Feinsod M., Favis R., Kliman R., Barany F. 2002. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. *Nucleic Acids Res.* 30: 3295-3311.
- Kitamura Y., Shimizu K., Tanaka S., Ito K., Emi M. 2000. Allelotyping of anaplastic thyroid carcinoma: frequent allelic losses on 1q, p9, 11, 17, 19p and 22q. *Genes Chromosomes Cancer* 27: 244-251.
- Kitamura Y., Shimizu K., Ito K., Tanaka S., Emi M. 2001. Allelotyping of follicular thyroid carcinoma: frequent allelic losses in chromosome arms 7q, 11p, and 22q. *J. Clin. Endocrinol.* 86: 4268-4272.

- Kohno T., Shinmura K., Tosaka M., Tani M., Kim S., Sugimura H., Nohmi T., Kasai H., Yokota J. 1998. Genetic polymorphisms and alternative splicing on the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene*. 16: 3219-3225.
- Kolonel L., Hankin J., Wilkens L., Fukunaga F., Hinds M. 1990. An epidemiologic study of thyroid cancer in Hawaii. *Cancer Causes Control*. 1: 223-234.
- Kopp P. 2001. The TSH receptor and its role en thyroid disease. *Human Genome and Diseases. Cell. Mol. Life. Sci.* 58: 1301-1322.
- Kroll T. 2004. Molecular events in follicular thyroid tumors. *Cancer Treat. Res.* 122: 85-105.
- Krupa R., Blasiak J. 2004. An association of polymorphism of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 with colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 23: 285-294.
- Kubbota Y., Nash R., Klungland A., Schar P., Barnes, D. Lindahl T. 1996. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerasa β and the XRCC1 protein. *EMBO J.*15: 6662-6670.
- Kurumizaka H., Ikawa S., Nakada M., Enomoto R., Kagawa W., Kinebuchi T., Yamazoe M., Yokoyama S., Shibata T. 2002. Homologous pairing and ring and filament structure formation activities of the human Xrcc2*Rad51D complex. *J Biol. Chem.* 277: 14315-14320.
- Kuschel B., Auranen A., McBride S., Novik K., Antoniou A., Lipscombe J., Day N., Easton D., Ponder B., Pharoah P., Dunning A. 2002. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum. Mol. Genet.* 11: 1399-1407.
- Ladiges W. 2006. Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer. *Oncogene*. 25: 1612-1619.
- Ladiges W., Wiley J., Macauley A. 2003. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and age-related disease. *Mech. Ageing. Dev.* 124: 27-32.
- Ladiges W., Kemp C., Packenham J., Velazquez J. 2004. Human gene variation: from SNPs to phenotypes. *Mutat Res.* 545: 131-139.
- Laffon B., Pérez-Cadahía B., Loureiro J., Méndez J. Pásaro E. 2004. Papel de los polimorfismos genéticos para enzimas de reparación en el daño en el ADN producido por estireno y estireno 7,8 oxido. *Rev. Toxicol.* 21: 92-97.

- Lamerdin J., Montgomery M., Stilwagen S., Scheidecker L., Tebbs R., Brookman K., Thompson L., Carrano A. 1995. Genomic sequence comparison of the human and mouse XRCC1 DNA repair gene regions. *Genomics*. 25: 547-54.
- Latorra D., Campbell K., Wolter A. Hurley J. 2003. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum. Mutat.* 22: 79–85.
- Lawyer F., Stoffel S., Saiki R., Chang S., Landre P., Abramson R., Gelfand D. 1993. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl.* 4: 275–287.
- Laxman K., Crawford E. 2002. Treatment of thyroid carcinoma: emphasis on high-dose ¹³¹I outpatient therapy. *J. Nucl. Med. Technol.* 30: 165-171.
- Lay M., Wittwer C. 1997. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clinical Chem.* 43: 2262-2267.
- Le Marchand L., Lum-Jones A., Saltzman B., Visaya V., Nomura A., Kolonel N. 2001. Feasibility of collecting buccal cell DNA by mail in a cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10: 701–703.
- Le Marchand L., Donlon T., Lum-Jones A., Seifried A. Wilkens L. 2002. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 409-412.
- Lee J.E., Choi J., Lee J., Lee M. 2005. Gene SNPs and mutations in clinical genetic testing: haplotype-based testing and analysis. *Mutat. Res.* 573: 195-204.
- Lee J.M., Lee Y.C., Yang S., Yang P., Luh S., Lee C.J., Chen C., Wu M. 2001. Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of the esophageal cancer. *Int. J. Cancer.* 95: 240-246.
- Lee M., Chen G., Vlantis A., Tse G., Leung B., van Hasselt C. 2005. Induction of thyroid papillary carcinoma cell proliferation by estrogen is associated with an altered expression of Bcl-xL. *Cancer J.* 11: 113-121.
- Lei Y., Hwang S., Chang C., Kuo H., Luo J., Chang M., Cheng T. 2002. Effects on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 in smokers. *Mutat. Res.* 519: 93-101.

- Leiers B., Kampkotter A., Grevelding C., Link C., Johnson T., Henkle-Duhrsen K. 2003. A stress-responsive glutathione S-transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Radic. Biol. Med.* 34: 1405-1415.
- León A. 2005. Patología Quirúrgica de la Glándula tiroides. Manual de Cabeza y Cuello. <http://escuela.med.puc.cl/publ/ManualCabezaCuello/PatologiaQuirurgicaTiroide.html>
- Leonardo M., Kornblihtt A. 1993. La Reacción En Cadena De La Polimerasa El método y sus aplicaciones. *Ciencia Hoy.* 4(23) <http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy23/reaccion.htm>.
- Lesueur F., Pharoah P., Laing S., Ahmed S., Jordan C., Smith P., Luben R., Wareham N., Easton D., Dunning A., Ponder B. 2005. Allelic association of the human homologue of the mouse modifier Ptprij with breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* 14: 2349-2356.
- Letertre C., Perelle S., Dilasser F., Arar K., Fach P. 2003. Evaluation of the performance of LNA and MGB probes in 5'-nuclease PCR assays. *Mol. Cell. Probes.* 17: 307–311.
- Lewy-Trenda I. 2002. Estrogen and progesterone receptors in neoplastic and non-neoplastic thyroid lesions. *Pol. J. Pathol.* 53: 67-72.
- Li D., Liu H., Jiao L., Chang D., Beinart G., Wolff R., Evans D., Hassan M., Abbruzzese J. 2006. Significant effect of homologous recombination DNA repair gene polymorphisms on pancreatic cancer survival. *Cancer Res.* 66: 3323-3330.
- Li F. 1990. Familial cancer syndromes and clusters. *Curr. Probl. Cancer.* 14: 73-114.
- Libert F., Parmentier M., Maenhaut C., Lefort A., Gerard C., Perret J., Van Sande J., Dumont J.E., Vassart G. 1990. Molecular cloning of a dog thyrotropin (TSH) receptor variant. *Mol. Cell Endocrinol.* 68: 15-17.
- Lindahl T. 2000. Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Mutat. Res.* 462: 129–135.
- Liu N., Lamerdin J., Tebbs R., Schild D., Tucker J., Shen M., Brookman K., Siciliano M., Walter C., Fan W., Narayana L., Zhou Z., Adamson A., Sorensen K., Chen D., Jones N., Thompson L. 1998. XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol. Cell.* 1: 783–793.

- Lohmueller K., Pearce C., Pike M., Lander E., Hirschhorn J. 2003. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat. Genet.* 33: 177–182.
- Loktionov A. 2004. Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Lett.* 208: 1-33.
- Lu R., Nash H., Verdine G. 1997. A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Curr. Biol.* 7: 397-407.
- Lucas S., Ek B., Rask L., Rastad J., Akerstrom G., Juhlin C. 1995. Identification of a 35 kD tumor-associated autoantigen in papillary thyroid carcinoma (Meeting abstract). *Anticancer Res.* 15: 1627-1628.
- Lundgren C., Hall P., Dickman P., Zedenius J. 2006. Clinically significant prognostic factors for differentiated thyroid carcinoma. *Cancer.* 106: 524-531.
- Lunn R., Langlois R., Hsieh L., Thompson C., Bell D. 1999. XRCC1 polymorphisms: Effects on aflatoxin B1–DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res.* 59: 2557–2561.
- MacAuley A., Ladiges W. 2005. Approaches to determine clinical significance of genetic variants. *Mutat. Res.* 573: 205–220.
- Maciel R., Kimura E., Cerutti J. 2005. Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular). *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 49: 691-700.
- Mack W., Preston-Martin S., Bernstein L., Qian D., Xiang M. 1999. Reproductive and hormonal risk factors for thyroid cancer in Los Angeles County females. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8: 991-997.
- Mack W., Preston-Martin S., Bernstein L, Qian D. 2002. Lifestyle and other risk factors for thyroid cancer in Los Angeles County females. *Ann. Epidemiol.* 12: 395-401.
- Mack W., Preston-Martin S., Dal Maso L., Galanti M., Xiang M., Franceschi S., Hallquist A., Jin F., Kolonel L., La Vecchia C., Levi F., Linos A., Lund E., McTiernan A., Mabuchi K., Negri N., Wingren G., Ron E. 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.
- Mackay I., Arden K., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucl. Acids Res.* 30: 1292-1305.

- Majumder M., Sikdar N., Paul R., Roy B. 2005. Increased risk of oral leukoplakia and cancer among mixed tobacco users carrying XRCC1 variant haplotypes and cancer among smokers carrying two risk genotypes: one on each of two loci, GSTM3 and XRCC1 (Codon 280). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 2106-2112.
- Mangasser-Stephan K., Tag C., Reiser A., Gressner A. 1999. Rapid genotyping of hemochromatosis gene mutations on the LightCycler with fluorescent hybridisation probes. *Clinical Chem.* 45: 1875-1878.
- Manole D., Schildknecht B., Gosnell B., Adams E., Derwahl M. 2001. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1072-1077.
- Marintchev A., Maciejewski M., Mullen G. 1999a. ¹H, ¹⁵N, and ¹³C resonance assignments for the N-terminal 20 kDa domain of the DNA single-strand break repair protein XRCC1. *J. Biomol. NMR.* 13: 393-394.
- Marintchev A., Mullen M., Maciejewski M., Pan B., Gryk M., Mullen G. 1999b. Solution structure of the single-strand break repair protein XRCC1 N-terminal domain. *Nat. Struct. Biol.* 6: 884-893.
- Marsh D., Zori R. 2002. Genetic insights into familial cancers-update and recent discoveries. *Cancer Lett.* 181: 125-164.
- Marsh D., Mulligan L., Eng C. 1997. RET proto-oncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. *Horm. Res.* 47: 168-178.
- Marsh D., Theodosopoulos G., Martin-Schulte K., Richardson A., Philips J., Roher H., Delbridge L., Robinson B. 2003. Genome-wide copy number imbalances identified in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 1866-1872.
- Marsin S., Vidal A., Sossou M., Menissier de Murcia J., Le Page F., Boiteux S., de Murcia G., Radicella J. 2003. Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *J. Biol. Chem.* 278: 44068-44074.
- Marth G., Czabarka E., Murvai J., Sherry S. 2004. The allele frequency spectrum in genome-wide human variation data reveals signals of differential demographic history in three large world populations. *Genetics.* 166: 351-372.

- Masson J., Tarsounas M., Stasiak A., Stasiak A., Shah R., McIlwraith M., Benson F., West S. 2001. Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev.* 15: 3296–3307.
- Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. 1998. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell Biol.* 18: 3563-3571.
- Matakidou A., Hamel N., Popat S., Henderson K., Kantemiroff T., Harmer C., Clarke SE., 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.
- Mateuca R., Aka P., De Boeck M., Hauspie R., Kirsch-Volders M., Lison D. 2005. Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. *Toxicol Lett.* 156: 277-288.
- Matias-Guiu X. 2005. Clasificación de la OMS de cáncer de tiroides (2004). XXII Congreso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica. Palma de Mallorca. 25 - 28/V/2005. <http://www.seapcongresos.com/2005/Cursos/>
- Matsubara Y., Fujii K., Rinaldo P., Narisawa K. 1999. A fluorogenic allele-specific amplification method for DNA-based screening for inherited metabolic disorders. *Acta Paediatr. Suppl.* 88: 65–68.
- Matsuo K., Hamajima N., Suzuki R., Andoh M., Nakamura S., Seto M., Morishimae Y., Tajima K. 2004. Lack of association between DNA base excision repair gene XRCC1 Gln399Arg polymorphism and risk of malignant lymphoma in Japan. *Cancer Genet. Cytogenet.* 149: 77-80.
- Matullo G., Guarrera S., Carturan S., Peluso M., Malaveille C., Davico L., Piazza A., Vineis P. 2001a. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int. J. Cancer.* 92: 562-567.
- Matullo G., Palli D., Peluso M., Guarrera S., Carturan S., Celentano E., Krogh V., Munnia A., Tumino R., Polidoro S., Piazza A., Vineis P. 2001b. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and 32P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis* 22: 1437–1445.

- Matullo G., Guarrera S., Sacerdote C., Polidoro S., Davico L., Gamberini S., Karagas M., Casetta G., Rolle L., Piazza A., Vineis P. 2005. Polymorphisms/haplotypes in DNA repair genes and smoking: a bladder cancer case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 14: 2569-2578.
- Mayayo E., Moros M., Labarta J. 1998. Anatomía y fisiología de la glándula tiroidea. En: Borrajo E. (ed). *Atlas De Endocrinología Pediátrica. TOMO IV: TIROIDES.* <http://www.seep.es/privado/atlas/Tomo4/Tiroides1/Tomo4Cap1.htm>.
- Mazzaferri E., Kloos R. 2001. Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1447-1463.
- McConahey W., Hay I., Woolner L., van Heerden J., Taylor W. 1986. Papillary thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. *Mayo Clin. Proc.* 61: 978-996.
- McTiernan A., Weiss N., Daling J. 1984. Incidence of thyroid cancer in women in relation to previous exposure to radiation therapy and history of thyroid disease. *J. Natl. Cancer Inst.* 73: 575-581.
- McTieran A., Weiss N., Daling J. 1987. Incidence of thyroid cancer in women in relation to known or suspected risk factors for breast cancer. *Cancer Res.* 47: 292-295.
- Melillo R., Castellone M., Guarino V., De Falco V., Cirafici A.M., Salvatore G., Caiazzo F., Basolo F., Giannini R., Kruhoffer M., Orntoft T. *et al.* 2005. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J. Clin. Invest.* 115: 1068-1081.
- Memisoglu A., Samson L. 2000. Contribution of base excision repair, nucleotide excision repair, and DNA recombination to alkylation resistance of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 182: 2104-2112.
- Memon A., Radovanovic Z., Suresh A. 2004. Epidemiological evidence for a link between postpartum thyroiditis and thyroid cancer. *Eur. J. Epidemiol.* 19: 607-609.
- Mendive F., Rivolta C., Moya C., Vassart G., Targovnik H. 2001. Genomic organization of the human thyroglobulin gene: the complete intron-exon structure. *Eur. J. Endocrinol.* 145: 485-496.
- Mendoza L., Pérez M., Moreno L., Salgado C. 2000. Tamizaje de cancer de pulmón, tiroides, próstata y piel. Guías de práctica clínica basadas en la evidencia. www.ascofame.org.co

- Mertens A., Mitby P., Radloff G., Jones I., Perentesis J., Kiffmeyer W., Neglia J., Meadows A., Potter J., Friedman D., Yasui Y., Robison L., Davies S. 2004. XRCC1 and glutathione-S-transferase gene polymorphisms and susceptibility to radiotherapy-related malignancies in survivors of Hodgkin disease. *Cancer*. 101: 1463-1472.
- Metsola K., Kataja V., Sillanpaa P., Siivola P., Heikinheimo L., Eskelinen M., Kosma V., Uusitupa M., Hirvonen A. 2005. XRCC1 and XPD genetic polymorphisms, smoking and breast cancer risk in a Finnish case-control study. *Breast Cancer Res. 7*: R987-997.
- Millikan R., Player J., Decotret A., Tse C., Keku T. 2005. Polymorphisms in DNA repair genes, medical exposure to ionizing radiation, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 2326-2334.
- Misra R., Ratnasinghe D., Tangrea J., Virtamo J., Andersen M., Barrett M., Taylor P., Albanes D. 2003. Polymorphisms in the DNA repair genes XPD, XRCC1, XRCC3, and APE/ref-1, and the risk of lung cancer among male smokers in Finland. *Cancer Lett.* 10:1 71-78.
- Mitrunen K., Hirvonen A. 2003. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat. Res.* 544: 9-41.
- Mohrenweiser H., Wilson D., Jones I. 2003. Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. *Mutat. Res.* 526: 93-125.
- Moller S., Mouritzen P. 2002. SNP chip genotyping using LNA microarrays. Technical note. *Genotyping applications LNA 7*, Exiqon. <http://www.exiqon.com/technical>
- Monteiro E., Varzim G., Silva R., da Costa B., Lopes C. 2005. Polymorphisms of the human OGG1 gene in laryngeal cancer: implications in radiotherapy response and survival. *Rev. Laryngol. Otol. Rhinol.* 126: 135-140.
- Morari E., Leite J., Granja F., da Assumpcao L., Ward L. 2002. The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 1485.
- Moreno J. 2001. Nuevos genes implicados en el hipotiroidismo congénito. *An. Esp. Pediatr.* 54: 20-27.
- Moretti F., Nanni S., Pontecorvi A. 2000. Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 14: 517-539.

- Moullan N., Cox D., Angele S., Romestaing P., Gerard J., Hall J. 2003. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 1168-1174.
- Mouritzen P., Nielsen A., Pfundheller H., Choleva Y., Kongsbak L. Moller S. 2003. Single nucleotide polymorphism genotyping using locked nucleic acid (LNA). *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3: 27-38.
- Moya C., Mendive F., Rivolta C., Vassart G., Targovnik H. 2000. Genomic organization of the 5' region of the human thyroglobulin gene. *Eur. J. Endocrinol.* 143: 789-798.
- Mühlberg T., Herrmann K., Joba W., Kirchberger M., Heberling H., Heufelder A.E. 2000. Lack of association of nonautoimmune hyperfunctioning thyroid disorders and a germline polymorphism of codon 727 of the human thyrotropin receptor in a European Caucasian population. *J. Clin. Endocr. Metab.* 85: 2640-2643.
- Naccarati A., Soucek P., Stetina R., Haufroid V., Kumar R., Vodickova L., Trtkova K., Dusinska M., Hemminki K., Vodicka P. 2006. Genetic polymorphisms and possible gene-gene interactions in metabolic and DNA repair genes: effects on DNA damage. *Mutat Res.* 593: 22-31.
- Nagataki S., Nystrom E. 2002. Epidemiology and primary prevention of thyroid cancer. *Thyroid* 12: 889-896.
- Nagayama, Y.; Kaufman, K.; Seto, P.; Rapoport, B. 1989. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 1184-1190.
- National Cancer Institute (NCI). 2005. Cáncer de la tiroides (PDQ®): Tratamiento. <http://cme.nci.nih.gov/espanol/pdq/tratamiento/tiroides/HealthProfessional#Reference1.23>
- Navarro Silvera S., Miller A., Rohan T. 2005. Risk factors for thyroid cancer: a prospective cohort study. *Int. J. Cancer.* 116: 433-438.
- Negri E., Dal Maso L, Ron E., La Vecchia C., Mark S.D, Preston-Martin S., McTiernan A., Kolonel L., Yoshimoto Y., Jin F., Wingren G., Rosaria Galanti M., Hardell L., Glatte E., Lund E., Levi F., Linos D., Braga C., Franceschi S. 1999. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. II. Menstrual and reproductive factors. *Cancer Causes Control.* 10: 143-155.
- Negri N., Ron E., Franceschi S., La Vecchia C., Preston-Martin S., Kolonel L., Kleinerman R., Mabuchi K., Jin F., Wingren G., Hallquist A., Levi F., Linos A.,

- Fraumeni Jr J. 2002. Risk factors for medullary thyroid carcinoma: a pooled analysis. *Cancer Causes Control*. 13: 365-372.
- Nelson H., Kelsey K., Mott L., Karagas M. 2002. The XRCC1 Arg399Gln polymorphism, sunburn, and non-melanoma skin cancer: evidence of gene-environment interaction. *Cancer Res*.62: 152-155.
- Newton C., Graham A., Heptinstall L., Powell S., Summers C., Kalsheker N., Smith J., Markham A. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 17: 2503–2516.
- Niwa Y., Matsuo K., Ito H., Hirose K., Tajima K., Nakanishi T., Nawa A., Kuzuya K., Tamakoshi A., Hamajima N. 2005. Association of XRCC1 Arg399Gln and OGG1 Ser326Cys polymorphisms with the risk of cervical cancer in Japanese subjects. *Gynecol. Oncol*. 99: 3-9.
- Nix P., Nicolaides A., Coatesworth A. 2006. Thyroid cancer review 3: management of medullary and undifferentiated thyroid cancer. *Int. J. Clin. Pract*. 60: 80-84.
- Nogueira C., Kopp P., Arseven O., Santos C., Jameson J., Medeiros-Neto G. 1999. Thyrotropin receptor mutations in hyperfunctioning thyroid adenomas from Brazil. *Thyroid*. 9: 1063-8.
- Norppa H. 2004. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol. Lett*.149: 309-34.
- Ohno M., Endo T., Ohta K., Gunji K., Onaya T. 1995. Point mutations in the thyrotropin receptor in human thyroid tumors. 5: 97-100.
- Olshan A., Watson M., Weissler M., Bell D. 2002. *XRCC1* polymorphisms and head and neck cancer. *Cancer Lett*. 178: 181-186.
- OMIM Online Mendelian Inherotance in Man 188450 Thyroglobulin, TG
- OMIM Online Mendelian Inherotance in Man 603372 Thyroid-stimulating hormone receptor; TSHR
- O'Regan P., Wilson C., Townsend S., Thacker J. 2001. XRCC2 is a nuclear RAD51-like protein, required for damage-dependent RAD51 focus formation without the need for ATP binding. *J. Biol. Chem*. 276: 22148–22153.
- Orum H., Jakobsen M., Koch T., Vuust J. Borre M. 1999. Detection of the factor V Leiden mutation by direct allele-specific hybridization of PCR amplicons to photoimmobilized locked nucleic acids. *Clin. Chem*. 45: 1898–1905.

- Park J., Lee S., Jeon H., Bae N., Chae S., Joo S., Kim C., Park J., Kam S., Kim I., Jung T. 2002. Polymorphism of the DNA repair gene XRCC1 and risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers.* 11: 23-27.
- Park J., Chen L., Tockman M., Elahi A., Lazarus P. 2004. The human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (hOGG1) DNA repair enzyme and its association with lung cancer risk. *Pharmacogenetics* 14: 103–109.
- Park Y., Choi E., Choi J., Park J., You H., Chung M. 2001. Genetic changes of hOGG1 and the activity of the oh8Gua glycosylase in colon cancer. *Eur. J. Cancer.* 37: 340-346
- Park Y., Arvan P. 2004. The acetylcholinesterase homology region is essential for normal conformational maturation and secretion of thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 279: 17085-17089.
- Parthasarathy K., Crawford M. 2002. Treatment of Thyroid Carcinoma: Emphasis on High-Dose 131I Outpatient Therapy. *J. Nucl. Med. Technol.* 30: 165-171.
- Patel A., Calle E., Pavluck A., Feigelson H., Thun M., Rodriguez C. 2005. A prospective study of XRCC1 (X-ray cross-complementing group 1) polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 7: R1168-1173
- 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.
- Peeters R., van Toor H., Klootwijk W., de Rijke Y., Kuiper G., Uitterlinden A., Visser T. 2003. Polymorphisms in thyroid hormone pathway genes are associated with plasma TSH and iodothyronine levels in healthy subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 2880-2888.
- Pérez, M., Dubner, D., Michelin S., Gisone P., Carosella E. 2002. Telomeros y reparación de daño genómico: su implicancia en patología humana. *Medicina.* 62: 593-603.
- Petersen M., Wengel J. 2003. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol.* 21: 74–81.
- Pharoah P., Dunning A., Ponder B., Easton D. 2004. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat. Rev. Cancer.* 4: 850-860.

- Picchi P., Faloci C., Salabe G. 2001. Hormonal and reproductive factors and cigarette smoking as risk factors for thyroid cancer in women. A case control study. *Minerva Endocrinol.* 26: 53-57.
- Picó A., López P., López A. 2004. Nuevos marcadores del cáncer diferenciado de tiroides (CDT) y tiroglobulina (Tg) tras TSH-recombinante (TSHr). Implicaciones genéticas. Jornada de Patología Molecular. Cáncer de Tiroides. Biología e implicaciones terapéuticas. CNIO
- Pierce A., Johnson R., Thompson, L., Jasin M. 1999. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev.* 1: 2633–2638.
- Pittman D., Schimenti J. 2000. Midgestation lethality in mice deficient for the RecA related gene, Rad51d/Rad51l3. *Genesis.* 26: 167-173.
- Powell N., Dudley E., Morishita M., Bogdanova T., Tronko M., Thomas G. 2004. Single nucleotide polymorphism analysis in the human phosphatase PTPRJ gene using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 18: 2249-2254.
- Popanda O., Schattenberg T., Phong C., Butkiewicz D., Risch A., Edler L., Kayser K., Dienemann H., Schulz V., Drings P., Bartsch H., Schmezer P. 2004. Specific combinations of DNA repair gene variants and increased risk for non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis.* 25: 2433-2441.
- Prasad R., Lavrik O., Kim S., Kedar P., Yang X., Vande Berg B., Wilson S. 2001. DNA polymerase β -mediated long patch base excision repair: poly(ADP-ribose) polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 276: 32411–32414.
- Preston-Martin S., Jin F., Duda M., Mack W. 1993. A case-control study of thyroid cancer in women under age 55 in Shanghai (People's Republic of China). *Cancer Causes Control.* 4: 431-440.
- 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.
- Price E., Bourne S., Radbourne R., Lawton P., Lamerdin J., Thompson L., Arrand J. 1997. Rare microsatellite polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC3 and XRCC5 associated with cancer in patients of varying radiosensitivity. *Somat. Cell Mol. Genet.* 23: 237–247.

- Pritchard J. 2001. Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *Am. J. Hum. Genet.* 69: 124–137.
- Proligo. Application Note: TrueSNP™ Allele-Specific PCR Primers: Improved Real-Time Allele-Specific PCR with LightCycler™ and SYBR® Green Detection. http://www.proligo.com/pdf_files/PP_TrueSNP_AppNote_1.pdf
- Proligo. Application Note: TrueSNP™ Allele-Specific PCR Primers: Optimal Assay Conditions. http://www.proligo.com/pdf_files/PP_TrueSNP_AppNote_3.pdf
- Proligo. Application Note: TrueSNP™ Allele-Specific PCR Primers: Increased Specificity in Allele Specific PCR. http://www.proligo.com/pdf_files/PP_TrueSNP_AppNote_2.pdf
- Rabes H. 2001. Gene rearrangements in radiation-induced thyroid carcinogenesis. *Med. Pediatr. Oncol.* 36: 574-582.
- Radicella J., Dherin C., Desmaze C., Fox M.S., Boiteux S. 1997. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 8010-8015.
- Rafii S., O'Regan P., Xinarianos G., Azmy I., Stephenson T., Reed M., Meuth M., Thacker J., Cox A. 2002. A potential role for the XRCC2 R188H polymorphic site in DNA-damage repair and breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* Jun. 11: 1433-1438.
- Ratnasinghe D., Yao S., Tangrea J., Qiao Y., Andersen M., Barrett M., Giffen C., Erozan Y., Tockman M., Taylor P. 2001. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers.* 10: 19-23.
- Relton C., Daniel P., Fisher A., Chase D., Burn J., Tawn E. 2002. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and the frequency of somatic mutations at the glycoporphin A locus in newborns. 2002. *Mutat. Res.* 502: 61-68.
- Relton C., Daniel C., Hammal D., Parker L., Janet Tawn E., Burn J. 2004. DNA repair gene polymorphisms, pre-natal factors and the frequency of somatic mutations in the glycoporphin-A gene among healthy newborns. *Mutat Res.* 545: 49-57.
- Robledo M., Gil L., Pollán M., Cebrián A., Ruíz S., Azañedo M., Benitez J., Menárguez J.; Rojas J. 2003. Polymorphisms G691S/S904S of RET as Genetic Modifiers of MEN 2A. *Cancer Research.* 63: 1814-1817.
- Rodrigues-Serpa A., Catarino A., Soares J. 2003. Loss of heterozygosity in follicular and papillary thyroid carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 141: 26-31.

- Roldan-Arjona T.; Wei Y.; Carter K.; Klungland A.; Anselmino C.; Wang R.; Augustus M.; Lindahl T. 1997. Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*: 94: 8016-8020.
- Ron E., Modan B. 1982. Thyroid. In: Schottenfeld D., Fraumeni J.(eds). *Cancer Epidemiology and prevention*. Philadelphia: Saunders: 837-854.
- Roque L., Clode A., Belge G., Pinto A., Bartnitzke S., Santos J., Thode B., Bullerdiek J., Castedo S., Soares J. 1998 Follicular thyroid carcinoma: chromosome analysis of 19 cases. *Genes Chromosomes Cancer*. 21: 250-255.
- Rossing M., Voigt L., Wicklund K., Williams M., Daling J. 1998. Use of exogenous hormones and risk of papillary thyroid cancer. *Cancer Causes Control*. 9: 341-349.
- Rossing M., Cushing K., Voigt L., Wicklund K. 2000. Risk of papillary thyroid cancer in women in relation to smoking and alcohol consumption. *Epidemiology*. 11: 49-54.
- Rousseau-Merck M., Misrahi M., Loosfelt H., Atger M., Milgrom E., Berger R. 1990. Assignment of the human thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) gene to chromosome 14q31. *Genomics* 8: 233-236.
- Ruivenkamp C., van Wezel T., Zanon C., Stassen A.P., Vlcek C., Csikos T., Klous A., Tripodis N., Perrakis A., Boerrigter L., Groot P.C., Lindeman J., Mooi W.J., Meijjer G., Scholten G., Dauwerse H., Paces V., van Zandwijk N., van Ommen G., Demant P. 2002. Ptpnj is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus Scc1 and is frequently deleted in human cancers. *Nature. Genet.* 31: 295-300.
- Ruttan C., Glickman B. 2002. Coding variants in human double-strand break DNA repair genes. *Mutat. Res.* 509: 175-200.
- Rybicki B., Conti D., Moreira A., Cicek M., Casey G., Witte J. 2004. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13: 23-29.
- 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. Molec. Genet.* 10: 1379-1386.

- Sanders L., Cady B. 1998. Differentiated thyroid cancer: reexamination of risk groups and outcome of treatment. *Arch. Surg.* 133: 419-425.
- 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_PSantisteban.pdf.
- Sanyal S., Festa F., Sakano S., Zhang Z., Steineck G., Norming U., Wijkstrom H., Larsson P., Kumar R., Hemminki K. 2004. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis.* 25: 729-734.
- Sapi Z., Luckacs G., Sztan M., Papp J., Olah E. 1995. Contribution of p53 gene alterations to development of metastatic forms of follicular thyroid carcinoma. *Diagn. Mol. Pathol.* 4: 256-260.
- Schlumberger M., Metivier H., Pacini F. 1999. Chernobyl 13 years after: consequences for protection of populations. *Rev. Prat.* 49: 1489-1491.
- Schmid K., Totsch M., Ofner D. 1996. Immunohistochemical co-expression of p53 and mdm-2 oncoprotein in thyroid carcinoma (Meeting abstract). *J. Pathol.* 178 (Suppl): 30a.
- Schrenk D. 1998. Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1155-1162.
- Seedhouse C., Bainton R., Lewis M., Harding A., Russell N., Das-Gupta E. 2002. The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia. *Blood.* 100: 3761-3766.
- Seedhouse C., Faulkner R., Ashraf N., Das-Gupta E., Russell N. 2004. Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 10: 2675-80.
- Segev D., Umbricht U., Zeiger M.A. 2003. Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg. Oncol.* 12: 69-90.
- Shahedian B., Shi Y., Zou M., Farid N.R. 2001. Thyroid carcinoma is characterized by genomic instability: evidence from p53 mutations. *Mol. Genet. Metabol.* 72: 155-163.
- Shen H., Xu Y., Qian Y., Yu R., Qin Y., Zhou L., Wang X., Spitz MR., Wei Q. 2000. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int. J. Cancer.* 88: 601-606.

- Shen H., Wang X., Hu Z., Zhang Z., Xu Y., Hu X., Guo J., Wei Q. 2004. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC3 Thr241Met and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Cancer Lett.* 206: 51-58.
- Shen M., Jones I., Mohrenweiser H. 1998. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.* 58: 604-608.
- Shen M., Hung R., Brennan P., Malaveille C., Donato F., Placidi D., Carta A., Hautefeuille A., Boffetta P., Porru S. 2003. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1, XRCC3, XPD, interaction with environmental exposures, and bladder cancer risk in a case-control study in northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers.* 12: 1234-1240.
- Shi M. 2001. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin. Chem.* 47: 164-172.
- Shields P., Harris C. 2000. Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *J. Clin. Oncol.* 18: 2309-2315.
- Shinmura K., Kohno T., Tekeuchi-Sasaki M., Maeda M., Segawa T., Kamo T., Sugimura H., Yokota J. 2000. Expression of the OGG1 type 1a (nuclear form) protein in cancerous and non-cancerous human cells. *Int. J. Oncol.* 16: 701-707.
- Shinmura K., Yokota J. 2001. The OGG1 gene encodes a repair enzyme for oxidatively damaged DNA and is involved in human carcinogenesis. *Antioxi. Redox Signal.* 3: 597-609.
- Shu X.O., Cai Q., Gao Y.T., Wen W., Jin F., Zheng W. 2003. A population-based case-control study of the Arg399Gln polymorphism in DNA repair gene XRCC1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12: 1462-1467.
- Shu Z., Smith, S., Wang, L., Rice M., and Kmiec, E. 1999. Disruption of *muREC2/RAD51L1* in mice results in early embryonic lethality which can be partially rescued in a $p53^{(-/-)}$ background. *Mol. Cell. Biol.* 19: 8686-8693
- Siciliano M., Bachinski L., Dolf G., Carrano A., Thompson L. 1987. Chromosomal assignments of human DNA repair genes that complement Chinese hamster ovary (CHO) cell mutants. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 46: 691-692.
- Simanainen J., Kinch A., Westermark K., Winsa B., Bengtsson M., Schuppert F., Westermark B., Heldin N. 1999. Analysis of mutations in exon 1 of the human thyrotropin receptor gene: high frequency of the D36H and P52T polymorphic variants. *Thyroid.* 9: 7-11.

- Simeonov A., Nikiforov T. 2002. Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic acid (LNA) probes and fluorescence polarization detection. *Nucleic Acids Res.* 30: e91.
- Singh S., Nielsen P., Koshkin A. Wengel J. 1998. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem. Comm.* 4: 455-456.
- Skjelbred C., Saebo M., Wallin H., Nexø B., Hagen P., Lothe I., Aase S., Johnson E., Hansteen I., Vogel U., Kure E. 2006. Polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XPD genes and risk of colorectal adenoma and carcinoma, in a Norwegian cohort: a case control study. *BMC Cancer.* 6: 67.
- Smedby K., Lindgren C., Hjalgrim H., Humphreys K., Schollkopf C., Chang E., Roos G., Ryder L., Falk K., Palmgren J., Kere J., Melbye M., Glimelius B., Adami H. 2006. Variation in DNA repair genes ERCC2, XRCC1, and XRCC3 and risk of follicular lymphoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15: 258-265.
- Smith T., Levine E., Perrier N., Miller M., Freimanis R., Lohman K., Case L., Xu J., Mohrenweiser H., Hu J. 2003. DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 1200-1206.
- SNPStas. SNPStats Your web tool for SNP analysis. Institut Català d'Oncologia. Hospital Duran y Reynals. <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/>
- Solórzano del Río H. 2002. Un mineral que reduce el 52 % la probabilidad de contraer cáncer. *Terapia Bioquímica Nutricional.* <http://www.hector.solorzano.com/articulos/selenio>
- Sonoda E., Takata M., Yamashita Y., Morrison C., Takeda S. 2001. Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 8388-8394.
- Sorby M., Sandstrom J., Ostman A. 2001. An extracellular ligand increases the specific activity of the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1. *Oncogene.* 20: 5219-24.
- Spambalg D., Sharifi N., Elisei R., Gross J., Medeiros-Neto G., Fagin J. 1996. Structural studies of the thyrotropin receptor and Gs alpha in human thyroid cancers: low prevalence of mutations predicts infrequent involvement in malignant transformation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 3898-901.
- Stankov K., Landi S., Gioia-Patricola L., Bonora E., Volante M., Papotti M., Romeo G. 2006. GSTT1 and M1 polymorphisms in Hurthle thyroid cancer patients. *Cancer Lett.* 19: en prensa.

- Stern M., Umbach D., van Gils C., Lunn R., Taylor J. 2001. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10: 125–131.
- Stern M., Umbach D., Lunn R., Taylor J. 2002. DNA repair gene XRCC3 codon 241 polymorphism, its interaction with smoking and XRCC1 polymorphisms, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 939-943.
- Stroombergen M., Waring R. 1999. Determination of glutathione S-transferase mu and theta polymorphisms in neurological disease. *Hum. Exp. Toxicol.* 18: 141-145.
- Sturgis E., Castillo E., Li L., Zheng R., Eicher S., Clayman G., Strom S., Spitz M., Wei Q. 1999. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis.* 20: 2125-2129.
- Sturgis E., Zhao C., Zheng R., Wei Q. 2005. Radiation response genotype and risk of differentiated thyroid cancer: a case-control analysis. *Laryngoscope.* 115: 938-945.
- Sugimura H., Kohno T., Wakai K., Nagura K., Genka K., Igarashi H., Morris B., Baba S., Ohno Y., Gao C., Li Z., Wang J., Takezaki T., Tajima K., Varga T., Sawaguchi T., Lum J., Martinson J., Tsugane S., Iwamasa T., Shinmura K., Yokota J. 1999. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8: 669-674.
- Suh Y., Cantor C. 2005. Single nucleotide polymorphisms (SNPs): detection, interpretation, and application. *Mutat. Res.* 573: 1-2.
- Suh Y., Vijg J. 2005. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. *Mutat. Res.* 573: 41-53.
- Sunaga N., Kohno T., Yanagitani N., Sugimura H., Kunitoh H., Tamura T., Takei Y., Tsuchiya S., Saito R., Yokota J. 2002. Contribution of the NQO1 and GSTT1 polymorphisms to lung adenocarcinoma susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 730–738.
- Sykiotis G., Neumann S., Georgopoulos N., Sgourou A., Papachatzopoulou A., Markou K., Kyriazopoulou V., Paschke R., Vagenakis A., Papavassiliou A. 2003. Functional significance of the thyrotropin receptor germline polymorphism D727E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301: 1051-1056.
- Syvanen A. 2001. Assessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature. Rev. Genet.* 2: 930–942.

- Taillon-Miller P., Saccone S., Saccone N., Duan S., Kloss E., Lovins E., Donaldson R., Phong A., Ha C., Flagstad L., Miller S., Drendel A., Lind D., Miller R., Rice J., Kwok P. 2004. Linkage disequilibrium maps constructed with common SNPs are useful for first-pass disease association screens. *Genomics*. 84: 899-912
- Takahashi T. 2003. A mutant receptor tyrosine phosphatase, CD148, causes defects in vascular development. *Mol. Cell. Biol.* 23: 1817–1831.
- Takata M., Sasaki M., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A., Takeda S. 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 17: 5497-5508.
- Takata M., Sasaki M., Sonoda E., Fukushima T., Morrison C., Albala J., Swagemakers S., Kanaar R., Thompson L., Takeda S. 2000. The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol. Cell Biol.* 20: 6476-6482.
- Takata M., Sasaki M., Tachiiri S., Fukushima T., Sonoda E., Schild D., Thompson L., Takeda S. 2001. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol.* 21: 2858-2866.
- Takezaki T., Gao C., Wu J., Li Z., Wang J., Ding J., Liu Y., Hu X., Xu T., Tajima K., Sugimura H. 2002. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and modification by environmental factors of stomach cancer risk in Chinese. *Int. J. Cancer.* 99: 624-627.
- Tambini C., George A., Rommens J., Tsui L., Scherer S., Thacker J. 1997. The XRCC2 DNA repair gene: identification of a positional candidate. *Genomics*. 41: 84-92.
- Taningher M., Malacarne D., Izzoti A., Ugolini D., Parodi S. 1999. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat. Res.* 436: 227-261.
- Targovnik H., Mendive F., Rivolta C., Moya C, Varela V. 2001. El gen y el el ARN mensajero de la tiroglobulina: avances en el diagnóstico molecular. http://www.saem.org.ar/_docs/raem/suplemento_xii_congreso_saem.doc
- Taylor R., Moore D., Whitehouse J., Johnson P., Caldecott K. 2000. A cell cycle-specific requirement for the XRCC1 BRCT II domain during mammalian DNA strand break repair. *Mol Cell Biol.* 20: 735-740.

- Taylor R., Thistlethwaite A., Caldecott K. 2002. Central role for the XRCC1 BRCT-I domain in mammalian DNA single-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* 22: 2556-2563.
- Tebbs R., Zhao Y., Tucker J., Scheerer J., Siciliano M., Hwang M., Liu N., Legerski R., Thompson L. 1995. Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 6354-6358.
- Thacker J., Zdzienicka M. 2003. The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair.* 2: 655-672
- Tomer Y., Greenberg D. 2004a. Analysis of HLA genes in families with autoimmune diabetes and thyroiditis. *Hum. Immunol.* 65: 640-647.
- Tomer Y., Greenberg D. 2004b. The thyroglobulin gene as the first thyroid-specific susceptibility gene for autoimmune thyroid disease. *Trends Mol. Med.* 10: 306-308.
- Tonacchera M., Pinchera A. 2000. Thyrotropin receptor polymorphisms and thyroid diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 2637-2639.
- Tranah G., Giovannucci E., Ma J., Fuchs C., Hankinson S., Hunter D. 2004. XRCC2 and XRCC3 polymorphisms are not associated with risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13:1090-1091.
- Trapasso F. 2000. Rat protein tyrosine phosphatase- η suppresses the neoplastic phenotype of retrovirally transformed thyroid cells through the stabilization of p27Kip1. *Mol. Cell. Biol.* 20: 9236–9246.
- Tsaryk R., Fabian K., Thacker J., Kaina B. 2005. Xrcc2 deficiency sensitizes cells to apoptosis by MNNG and the alkylating anticancer drugs temozolomide, fotemustine and mafosfamide. *Cancer* 16. en prensa
- Tsuchihashi Z., Dracopoli N. 2002. Progress in high throughput SNP genotyping methods. *Pharmacogenomics J.* 2: 103–110.
- Tuimala J., Szekely G., Gundy S., Hirvonen A., Norppa H. 2002. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. *Carcinogenesis.* 23: 1003-8.
- Tuimala J., Szekely G., Wikman H., Jarventaus H., Hirvonen A., Gundy S., Norppa H. 2004. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. *Mutat Res.* 554: 319-33. Erratum in: *Mutat Res.* 2005 570: 303.

- Ugozzoli L., Latorra D., Pucket R., Arar K., Hamby K. 2004. Real-time genotyping with oligonucleotide probes containing locked nucleic acids. *Anal. Biochem.* 324: 143–152.
- van de Graaf S., Ris-Stalpers C., Pauws E., Mendive F., Targovnik H., de Vijlder J. 2001. *Journal of Endocrinology.* 170: 307-321.
- van Gent D., Hoeijmakers J., Kanaar R. 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* 2: 196-206.
- van Gils C., Bostick R., Stern M., Taylor J. 2002. Differences in base excision repair capacity may modulate the effect of dietary antioxidant intake on prostate cancer risk: an example of polymorphisms in the XRCC1 gene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers.* 11: 1279-1284.
- van Puijenbroek M., Dierssen J., Stanssens P., van Eijk R., Cleton-Jansen A., van Wezel T., Morreau H. 2005. Mass spectrometry-based loss of heterozygosity analysis of single-nucleotide polymorphism loci in paraffin embedded tumors using the MassEXTEND assay: single-nucleotide polymorphism loss of heterozygosity analysis of the protein tyrosine phosphatase receptor type J in familial colorectal cancer. *J. Mol. Diagn.* 7: 623-30.
- Vassallo J., Barrios E. 2003. Actualización ponderada de los factores de riesgo del cáncer. Montevideo: Comisión honoraria de lucha contra el Cáncer.
- Venter J., Adams M., Myers E., Li P., Mural R., Sutton G. 2001. The sequence of the human genome. *Science.* 291: 1304–1351.
- Vester B., Lundberg L., Sørensen M., Babu B., Douthwaite S., Wengel J. 2004. Improved RNA cleavage by LNAzyme derivatives of DNAzymes. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 37–40.
- Vidal A., Boiteux S., Hickson I., Radicella J. 2001. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J.* 20: 6530-6539.
- Vodicka P., Kumar R., Stetina R., Sanyal S., Soucek P., Haufroid V., Dusinska M., Kuricova M., Zamecnikova M., Musak L., Buchancova J., Norppa H., Hirvonen A., Vodickova L., Naccarati A., Matousu Z., Hemminki K. 2004. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis.* 25: 757-763.

- Vogel U., Nexø B., Olsen A., Thomsen B., Jacobsen N., Wallin H., Overvad K., Tjønneland A. 2003. No association between OGG1 Ser326Cys polymorphism and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 170-171.
- Vogel U., Olsen A., Wallin H., Overvad K., Tjønneland A., Nexø B.A. 2004. No association between OGG1 Ser326Cys and risk of basal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13: 1680-1681.
- Volante M., Caballo G., Papotti M. 2004. Prognostic factors of clinical interest in poorly differentiated carcinomas of the thyroid. *Endocr. Pathol.* 15: 313-317.
- Voutilainen P., Multanen M., Leppäniemi A. 2001. Prognosis after lymph node recurrence in papillary thyroid carcinoma depends on age. *Thyroid* 11: 953-957.
- Wang D., Kreutzer D., Essigmann J. 1998. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat. Res.* 400: 99-115.
- Wang Y., Spitz M., Zhu Y., Dong Q., Shete S., Wu X. 2003. From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair.* 2: 901-908.
- Ward L., Brenta G., Medvedovic M., Fagin J. 1998. Studies of allelic loss in thyroid tumors reveal major differences in chromosomal instability between papillary and follicular carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 525-530.
- Waterfall C., Cobb B. 2002. SNP genotyping using single-tube fluorescent bidirectional PCR. *BioTechniques* 33: 80-90.
- Webb P., Hopper J., Newman B., Chen X., Kelemen L., Giles G., Southey M., Chenevix-Trench G., Spurdle A. 2005. Double-strand break repair gene polymorphisms and risk of breast or ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 319-323.
- Weiss J., Goode E., Ladiges W., Ulrich C. 2005. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol. Carcinog.* 42: 127-141.
- WHO (World Health Organization). 1993. Trends in Cancer Incidence and Mortality. Cap 25: Thyroid IARC Scientific Publications no. 121. Lyon: International Agency for Research on Cancer, Pp. 609-640.
- WHO, ICCIDD, UNICEF. 1999. Assessing country progress in universal salt iodization programs. Iodized salt program assessment tools (ISPAT). In: Houston R *et al.*, (eds.) Ottawa. Micronutrient Initiative Publications.

- WHO, UNICEF, ICCIDD. 1999. Progress towards elimination of iodine deficiency disorders. Geneva, World Health Organization, (unpublished document WHO/NHD/99.4; available on request from Department of Nutrition for Health and Development, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).
- Wikman H., Risch A., Klimek F., Schmezer P., Spiegelhalder B., Dienemann H., Kayser . K., Schulz V., Drings P., Bartsch H. 2000. hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population. *Int. J. Cancer.* 88: 932-937.
- Williams S., Smallridge R. 2004. Targeting the ERK Pathway: Novel Therapeutics for thyroid cancer. *Current Drug Targets-Immune, Endocr. Metabol. Disord.* 4: 199-220.
- Wingren G., Hallquist A., Hardell L. 1997. Diagnostic X-ray exposure and female papillary thyroid cancer: a pooled analysis of two Swedish studies. *Eur. J. Cancer Prev.* 6: 550-556.
- Winsey S., Haldar N., Marsh H., Bunce M., Marshall S., Harris A., Wojnarowska F., Welsh K. 2000. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res.* 60: 5612-5616.
- Wittwer C. 2001. Rapid cycle real-time PCR: methods and applications. In: *Rapid Cycle Real-time PCR: methods and applications.* Meuer S, Wittwer C, Nakagawara KI (Eds.). Springer-Verlag.
- Wittwer C., Hermann M., Moss A., Rasmussen R. 1997a. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* 22: 134-138.
- Wittwer C., Ririe K., Andrew R., David D., Gundry R., Balis U. 1997b. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* 22: 176-181.
- Wood M., Esteve A., Morningstar M., Kuziembo G., Essigmann J. 1992. Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia Coli*. *Nucleic Acids Res.* 20: 6023-6032.
- Wood R., Mitchell M., Sgouros J., Lindahl, T. 2001. Human DNA repair genes. *Science.* 291: 1284-1289.
- Wyszynski D. 1998. La epidemiología genética: disciplina científica en expansión. *Rev. Panam. Salud. Pública.* 3: 26-35.

- Xing D., Qi J., Miao, X., Lu W., Tan W., Lin D. 2002. Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XPD and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Int. J. Cancer*. 100: 600–605.
- Xu J., Zheng, S., Turner A., Isaacs S., Wiley K., Hawkins G., Chang B., Bleecker E., Walsh P., Meyers D., Isaacs W. 2002. Associations between *hOGG1* sequence variants and prostate cancer susceptibility. *Cancer Res*. 62: 2253–2257.
- Xu X., Quiros R., Gattuso P., Ain K., Prinz A. 2003. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res*. 63: 4561-4567.
- Yasuhara K., Koujitani T., Takegawa K., Nasu M., Onodera H., Takagi H., Mitsumori K. 2001. Promoting effects of xylazine on development of thyroid tumor rats initiated with N-bis-(2-hydroxypropyl) nitrosamine and the mechanism of action. *Carcinogenesis*. 22: 613-618.
- Ye S., Dhillon S., Ke X., Collins A., Day I. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*. 29: e88.
- Yeh C., Sung F., Tang R., Chang-Chieh Ch., Hsie L. 2005. Polymorphisms of the *XRCC1*, *XRCC3*, & *XPD* genes, and colorectal cancer risk: a case-control study in Taiwan. *BMC Cancer*. 5: 12.
- Yu M., Yang S., Pan I., Lin C., Liu C., Liaw Y., Lin S., Chen P., Lee S., Chen C. 2003. Polymorphisms in XRCC1 and glutathione S-transferase genes and hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer. Inst*. 95: 1485-1488.
- Zapata P., Colas B., López-Ruíz P., Ropero R., Martín R., Rodríguez F., González F., López J., Angulo J. 2004. Fosfotirosina fosfatasa SHP-1, somatostatina y cáncer de próstata. *Actas Urol. Esp*. 28: 269-285.
- Zhang L., Martelli M., Battaglia C., Trapasso F., Tramontano D., Viglietto G., Porcellini A., Santoro M., Fusco A. 1997. Thyroid cell transformation inhibits the expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase. *Exp. Cell. Res*. 235: 62-70.
- Zhang Z., Wan J., Jin X., Jin T., Shen H., Lu D., Xia Z. 2005. Genetic polymorphisms in XRCC1, APE1, ADPRT, XRCC2, and XRCC3 and risk of chronic benzene poisoning in a Chinese occupational population. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 14: 2614-2619.

- Zhu Q., Bian J., Shen Q., Jiang F., Tang H., Zhang H., Wu Y. 2004. Genetic polymorphisms in X-ray repair cross-complementing gene 1 and susceptibility to papillary thyroid carcinoma. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 25: 702-5.
- Zienolddiny S., Campa D., Lind H., Ryberg D., Skaug V., Stangeland L., Phillips D., Canzian F., Haugen A. 2006. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis.* 27: 560-567.
- Zitzelsberger H., Lehmann L., Hieber L., Weier H., Janish C., Fung J., Negele T., Spelsberg F., Legfelder E., Demidchik E., Salassidis K., Kellerer A., Werner M., Bauchinger M. 1999. Cytogenetic changes in radiation-induced tumors of the thyroid. *Cancer Res.* 59: 135-140.

Anexos



ANEXO 1

GENES DE SUSCEPTIBILIDAD EN EL CÁNCER DE TIROIDES

Este cuestionario se realiza para facilitar la selección de muestras en la investigación de los polimorfismos en la susceptibilidad al cáncer de tiroides. La muestra biológica será analizada, mediante distintas técnicas, para evaluar polimorfismos en diferentes genes posiblemente involucrados en la carcinogénesis del tiroides.

Este cuestionario tiene carácter confidencial y las muestras obtenidas serán utilizadas exclusivamente para este estudio.

HOJA DE CONSENTIMIENTO DEL DONANTE

1. DATOS PERSONALES

Nombre..... Sexo

Fecha de nacimiento Edad

Lugar de nacimiento D.N.I.

Dirección

Población Código postal

Teléfono

2. DATOS DE LA MUESTRA

Muestra recogida por

Fecha Hora

Sangre heparinizada mL (aprox.)

Células de mucosa bucal

Categoría del donante: Código del donante

Firma del donante

Firma del investigador

1. EXPOSICIÓN LABORAL																																																
<u>1.1. OCUPACIÓN ACTUAL</u>																																																
1.1.1. Describa la ocupación actual y tipo de empresa																																															
1.1.2. Su trabajo conlleva riesgos, indicar cuáles	-----																																															
1.1.3. Esta expuesto/a a alguno de los siguientes agentes?:	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="padding: 2px;">Sin exposición</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black; width: 20px;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black; width: 20px;">0</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Ruido</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">1</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Disolventes u otros productos químicos</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">2</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Metales</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">3</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Pinturas</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">4</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Tintes</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">5</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Asbesto</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">6</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Radiaciones (Rayos X, etc.)</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">7</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Polvo (.....)</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">8</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Pesticidas</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">9</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Derivados del carbón</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">1</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Derivados del petróleo</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">1</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">1</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Otros (.....)</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">1</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">2</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">NS/NC</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">9</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">9</td></tr> </table>	Sin exposición	0	0	Ruido	0	1	Disolventes u otros productos químicos	0	2	Metales	0	3	Pinturas	0	4	Tintes	0	5	Asbesto	0	6	Radiaciones (Rayos X, etc.)	0	7	Polvo (.....)	0	8	Pesticidas	0	9	Derivados del carbón	1	0	Derivados del petróleo	1	1	Otros (.....)	1	2	NS/NC	9	9	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td></tr> </table>				
Sin exposición	0	0																																														
Ruido	0	1																																														
Disolventes u otros productos químicos	0	2																																														
Metales	0	3																																														
Pinturas	0	4																																														
Tintes	0	5																																														
Asbesto	0	6																																														
Radiaciones (Rayos X, etc.)	0	7																																														
Polvo (.....)	0	8																																														
Pesticidas	0	9																																														
Derivados del carbón	1	0																																														
Derivados del petróleo	1	1																																														
Otros (.....)	1	2																																														
NS/NC	9	9																																														
1.1.4. Cuantos años lleva desempeñando la ocupación actual	-----	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td></tr> </table>																																														
<u>1.2. OCUPACIÓN PREVIA</u>																																																
1.2.1. Describa su/s trabajo/s previo/s y tipo/s de empresa																																															
	<u>Fecha</u>																																															
1.2.2. Alguno de los anteriores suponía exposición a:	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="padding: 2px;">Sin exposición</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black; width: 20px;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black; width: 20px;">0</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Ruido</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">1</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Disolventes u otros productos químicos</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">2</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Metales</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">3</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Pinturas</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">4</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Tintes</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">5</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Asbesto</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">6</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Radiaciones (Rayos X, etc.)</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">7</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Polvo (.....)</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">8</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Pesticidas</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">9</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Derivados del carbón</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">1</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">0</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Derivados del petróleo</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">1</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">1</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Otros (.....)</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">1</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">2</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">NS/NC</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">9</td><td style="text-align: center; border: 1px solid black;">9</td></tr> </table>	Sin exposición	0	0	Ruido	0	1	Disolventes u otros productos químicos	0	2	Metales	0	3	Pinturas	0	4	Tintes	0	5	Asbesto	0	6	Radiaciones (Rayos X, etc.)	0	7	Polvo (.....)	0	8	Pesticidas	0	9	Derivados del carbón	1	0	Derivados del petróleo	1	1	Otros (.....)	1	2	NS/NC	9	9	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td></tr> </table>				
Sin exposición	0	0																																														
Ruido	0	1																																														
Disolventes u otros productos químicos	0	2																																														
Metales	0	3																																														
Pinturas	0	4																																														
Tintes	0	5																																														
Asbesto	0	6																																														
Radiaciones (Rayos X, etc.)	0	7																																														
Polvo (.....)	0	8																																														
Pesticidas	0	9																																														
Derivados del carbón	1	0																																														
Derivados del petróleo	1	1																																														
Otros (.....)	1	2																																														
NS/NC	9	9																																														
1.2.3. Indicar el número de años de exposición	-----	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td></tr> </table>																																														

2. RESIDENCIA								
2.1. ¿Ha vivido cerca de una central nuclear?								
Distanciakm. (<10 km)	Tiempoaños	<table border="1"> <tr><td>No</td><td>0</td></tr> <tr><td>Sí</td><td>1</td></tr> <tr><td>NS/NC</td><td>9</td></tr> </table> <input type="checkbox"/>	No	0	Sí	1	NS/NC	9
No	0							
Sí	1							
NS/NC	9							
2.2. ¿Ha vivido cerca de un incinerador de productos químicos?								
Distanciakm. (<1 km)	Tiempoaños	<table border="1"> <tr><td>No</td><td>0</td></tr> <tr><td>Sí</td><td>1</td></tr> <tr><td>NS/NC</td><td>9</td></tr> </table> <input type="checkbox"/>	No	0	Sí	1	NS/NC	9
No	0							
Sí	1							
NS/NC	9							
2.3. ¿Ha vivido cerca de líneas de alta tensión?								
Distanciakm. (<200 m)	Tiempoaños	<table border="1"> <tr><td>No</td><td>0</td></tr> <tr><td>Sí</td><td>1</td></tr> <tr><td>NS/NC</td><td>9</td></tr> </table> <input type="checkbox"/>	No	0	Sí	1	NS/NC	9
No	0							
Sí	1							
NS/NC	9							
2.4. ¿Ha vivido más de 3 meses en una granja donde se utilizaran Pesticidas (< 1km)?								
	Tiempoaños	<table border="1"> <tr><td>No</td><td>0</td></tr> <tr><td>Sí</td><td>1</td></tr> <tr><td>NS/NC</td><td>9</td></tr> </table> <input type="checkbox"/>	No	0	Sí	1	NS/NC	9
No	0							
Sí	1							
NS/NC	9							
Comentarios:								
.....								
.....								
.....								

3. TIEMPO LIBRE			
3.1. En su tiempo libre ¿realiza alguna de las siguientes actividades?			
Ninguna	<table border="1"><tr><td>0</td></tr></table>	0	<input type="checkbox"/>
0			
Jardinería u horticultura	<table border="1"><tr><td>1</td></tr></table>	1	
1			
Bricolaje	<table border="1"><tr><td>2</td></tr></table>	2	
2			
Carpintería	<table border="1"><tr><td>3</td></tr></table>	3	
3			
Mecánica de automóviles /motos	<table border="1"><tr><td>4</td></tr></table>	4	
4			
Maquetas y modelismo	<table border="1"><tr><td>5</td></tr></table>	5	
5			
Otros (.....)	<table border="1"><tr><td>6</td></tr></table>	6	
6			
Combinaciones	<table border="1"><tr><td>7</td></tr></table>	7	
7			
En caso de respuesta afirmativa, dar detalles de posible exposición a disolventes, pinturas, colas u otras sustancias tóxicas			
.....			
.....			
.....			

4. HÁBITOS				
4.4. DIETAS				
4.4.1 ¿Sigue algún tipo de dieta habitualmente?				
No	<input type="text" value="0"/>			
Hiposódica	<input type="text" value="1"/>			
Hipocalórica	<input type="text" value="2"/>			
Hiperproteica	<input type="text" value="3"/>			
Vegetariana	<input type="text" value="4"/>			
Macrobiótica	<input type="text" value="5"/>			
Edulcorante	<input type="text" value="6"/>			
Diabética	<input type="text" value="7"/>			
Otras	<input type="text" value="9"/>	<input type="checkbox"/>		
4.4.2 ¿Cuántas veces a la semana suele comer los siguientes ingredientes?				
Carnes rojas	<input type="text"/>		
Carnes blancas	<input type="text"/>		
Pescado	<input type="text"/>		
Vegetales frescos	<input type="text"/>		
Vegetales cocinados	<input type="text"/>		
Piezas de fruta que come diariamente g/día	<input type="text"/>		
4.4.3 Indica la frecuencia semanal de consumo de los siguientes tipos de grasa y aceites:				
	<i>Poco</i>	<i>Medio</i>	<i>Mucho</i>	
Aceite de oliva	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>	<input type="text"/>
Aceite vegetal (girasol, semilla, ...)	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>	<input type="text"/>
Grasas vegetales / margarina	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>	<input type="text"/>
Grasas de animales / manteca	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>	<input type="text"/>

5. HISTORIA MÉDICA		
<u>5.1. ANTECEDENTES FAMILIARES</u>		
5.1.2. ¿Existe algún miembro de su familia con problemas de fertilidad, defectos de nacimiento, alteraciones genéticas o cáncer? Indicar alteración y parentesco. ----- -----		
<u>5.2. ANTECEDENTES PERSONALES</u>		
5.2.1. Tiene o ha tenido problemas en alguno de los procesos indicados:		
Procesos circulatorios	1	<input type="checkbox"/>
Procesos renales	2	
Procesos respiratorios	3	
Procesos neurológicos	4	
Procesos digestivos	5	
Procesos dérmicos	6	
Pr. Infecciosos (hepatitis, meningitis)	7	
Cáncer	8	
NS/NC	9	
Especificar enfermedades y edad de padecimiento ----- -----		
5.2.3. ¿Toma algún medicamento habitualmente?		
No	0 0	<input type="checkbox"/>
Insulina /Tratamiento diabetes	0 1	
Antibióticos	0 2	
Tranquilizantes /Psicofármacos	0 3	
Diuréticos	0 4	
Antiácidos	0 5	
Antihistamínicos	0 6	
Vitaminas /Minerales	0 7	
Antipiréticos /Analgésicos	0 8	
Otros (.....)	1 2	
NS/NC	9 9	
Indicar -----		
5.2.4. ¿Ha recibido alguna transfusión de sangre en el último año?		
No	0	Si
	1	NS/NC
	9	
		<input type="checkbox"/>
5.2.5. ¿Se ha sometido alguna vez a terapia de rayos X?		
No	0	Si
	1	NS/NC
	9	
		<input type="checkbox"/>

ANEXO 2

1. Soluciones utilizadas en la extracción de DNA a partir de sangre.

- **Suero fisiológico**

NaCl (Panreac Química SA, Barcelona, España)..... 0,9 gramos
 Agua destiladacsp.100 mL

- **TLE (tampón de lisis de eritrocitos)**

Tris 2M (pH 7,5) (Roche Diagnostics, Barcelona, España).....5 mL
 MgCl₂ · 6H₂O 1M (Panreac Química SA, Barcelona, España).....2,5 mM
 Agua miliQ.....csp.500 mL

- **TLL (tampón de lisis de linfocitos)**

NaCl 5M (Panreac Química SA, Barcelona, España)40 mL
 EDTA 0,25 M (pH 8,0) (USB Corporation, Cleveland, OH, USA).....4 mL
 Tris 2M (pH 7,5) (Roche Diagnostics, Barcelona, España).....2,5 mL
 Agua miliQ.....csp.500 mL

(El pH de la solución debe ajustarse a 8,2)

- **SDS 10%**

SDS (Panreac Química SA, Barcelona, España).....10 mg
 Agua miliQ..... csp.100 mL

(La solución no se debe autoclavar)

- **Solución de proteinasa K 2mg/mL**

Proteinasa K (Roche Diagnostics GMBH, Manhein, Alemania).....100 mg
 SDS 10%.....5 mL
 EDTA 0,25 M (pH 8,0) (USB Corporation, Cleveland, OH, USA).....400 µL
 Agua miliQ.....csp. 50 mL

(La solución de proteinasa K se debe conservar a -20 °C, y una vez descongelada se debe evitar reutilizar).

- **NaCl 5M**

NaCl (Panreac Química SA, Barcelona, España)..... 73 g
 Agua miliQ.....csp. 250 mL

- **Cloroformo** (Carlo Erba Reagenti, Milan, Italia)

- **Etanol Absoluto** (Carlo Erba Reagenti, Milan, Italia)

(La solución no se debe autoclavar)

- **Etanol 70%**

Etanol absoluto (Carlo Erba Reagenti, Milan, Italia)..... 70 mL
Agua miliQ.....csp. 100 mL

(La solución no se debe autoclavar)

- **TE (Tris 10 mM-EDTA 0,2 mM)**

Tris 2M (pH 7,5) (Roche Diagnostics, Barcelona, España).....250 µL
EDTA 0,25 M (pH 8,0) (USB Corporation, Cleveland, OH, USA).....40 µL
Agua miliQ.....csp. 50 mL

(El pH de la solución debe ajustarse a 7,5)

2. Soluciones utilizadas en la extracción de DNA a partir de células bucales.

- **Oraldine** (Warner Lambert Consumer Healthcare (Barcelona, España).

- **Solución de lisis**

TrisHCl 0,1 M (pH 8,5) (Panreac, Barcelona, España).....5 mL
EDTA 0,25 M (pH 8,0) (USB Corporation, Cleveland, OH, USA).....1 mL
SDS 10%.....1 mL
NaCl 5M (Panreac Química SA, Barcelona, España)2 mL
Agua miliQ.....csp. 50 mL

- **RNAasa**

RNAase, DNAase-free 500 µg/mL (Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Alemania).

- **Perclorato sódico (NaClO₄ ·H₂O) 4M**

NaClO₄ ·H₂O (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania)..... 140,46g
Agua miliQ.....csp. 250 mL

(No autoclavar la solución)

- **Fenol (pH 8,0)** (USB Corporation (Cleveland, OH, USA)).

- **Cloroformo-isoamilalcohol (24:1)**

Isoamiloalcohol (Panreac Química SA, Barcelona, España).....10 mL
Cloroformo (Carlo Erba Reagenti, Milan, Italia).....240 mL

(Preparar con pipeta de vidrio y no autoclavar).

- **Isopropanol** (Carlo Erba Reagenti (Milan, Italia)).

- **Solución de glicógeno** (Gentra Systems (Minneapolis, MN, USA))

ANEXO 3

Tabla 74: Interacciones de los genotipos con la edad de aparición del cáncer, estratificado por cuartiles.

Genotipos	Edad	OR(95%IC)	p
Arg/Arg399	Grupo 1 < 34	Ref.	
	Grupo 2 ≥34 < 41	1,00(0,29-3,38)	1,00
	Grupo 3 ≥ 41< 51	1,09(0,33-3,55)	0,88
	Grupo 4 ≥ 51	0,72(0,22-2,33)	0,58
Arg/His280	Grupo 1 < 34	Ref.	
	Grupo 2 ≥34 < 41	0,78(0,29-2,07)	0,62
	Grupo 3 ≥ 41< 51	0,54(0,20-1,41)	0,21
	Grupo 4 ≥ 51	1,33(0,55-3,18)	0,52
Arg/Arg194	Grupo 1 < 34	Ref.	
	Grupo 2 ≥34 < 41	0,32(0,03-3,18)	0,33
	Grupo 3 ≥ 41< 51	0,69(0,06-7,90)	0,77
	Grupo 4 ≥ 51	0,38(0,03-3,80)	0,41
Cys/Cys326	Grupo 1 < 34	Ref.	
	Grupo 2 ≥34 < 41	1,52(0,31-7,28)	0,59
	Grupo 3 ≥ 41< 51	0,97(0,20-4,57)	0,96
	Grupo 4 ≥ 51	1,95(0,45-8,34)	0,36
Met/Met241	Grupo 1 < 34	Ref.	
	Grupo 2 ≥34 < 41	0,71(0,20-2,55)	0,61
	Grupo 3 ≥ 41< 51	1,49(0,53-4,18)	0,44
	Grupo 4 ≥ 51	0,95(0,30-2,98)	0,94
A/A-IVS5	Grupo 1 < 34	Ref.	
	Grupo 2 ≥34 < 41	0,41(0,03-4,86)	0,48
	Grupo 3 ≥ 41< 51	0,83(0,07-9,58)	0,88
	Grupo 4 ≥ 51	0,38(0,03-3,93)	0,42
Ala/Ala 734	Grupo 1 < 34	Ref.	
	Grupo 2 ≥34 < 41	1,11(0,38-3,19)	0,84
	Grupo 3 ≥ 41< 51	0,80(0,31-2,04)	0,65
	Grupo 4 ≥ 51	0,58(0,20-1,67)	0,31
CCPro	Grupo 1 < 34	Ref.	
	Grupo 2 ≥34 < 41	0,80(0,27-2,35)	0,68
	Grupo 3 ≥ 41< 51	1,12(0,40-3,06)	0,82
	Grupo 4 ≥ 51	0,73(0,24-2,23)	0,58
Val/Val1027	Grupo 1 < 34	Ref.	
	Grupo 2 ≥34 < 41	1,67(0,57-4,88)	0,34
	Grupo 3 ≥ 41< 51	1,15(0,43-3,06)	0,77
	Grupo 4 ≥ 51	0,61(0,20-1,83)	0,37
Trp/Trp 1980	Grupo 1 < 34	Ref.	
	Grupo 2 ≥34 < 41	1,31(0,38-4,57)	0,66
	Grupo 3 ≥ 41< 51	0,55(0,18-1,65)	0,29
	Grupo 4 ≥ 51	0,68(0,19-2,41)	0,55
Thr/Thr52	Grupo 1 < 34	Ref.	
	Grupo 2 ≥34 < 41	1,13(0,06-18,59)	0,93
	Grupo 3 ≥ 41< 51	1,55(0,13-17,59)	0,72
	Grupo 4 ≥ 51	1,92(0,16-21,88)	0,59
Asp/Asp872	Grupo 1 < 34	Ref.	
	Grupo 2 ≥34 < 41	2,35(0,63-8,72)	0,20
	Grupo 3 ≥ 41< 51	1,00(0,32-3,16)	0,99
	Grupo 4 ≥ 51	1,90(0,58-6,15)	0,28