

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

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

Radiosensibilidad y factores genéticos de riesgo en el cáncer de tiroides

TESIS DOCTORAL
Wilser Andrés García Quispes
2012

Radiosensibilidad y factores genéticos de riesgo en el cáncer de tiroides

Memoria presentada por Wilser Andrés García Quispes para optar el grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

**Wilser Andrés García Quispes
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)
2012**

**VºBº
Director de la Tesis**

Dr. Ricard Marcos Dauder

Si alguna vez has estado al revés
sabrás muy bien a que huelen tus pies

Rockdrigo González

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Ricard Marcos Dauder, Director de esta Tesis, así como a Antonia Velázquez Henar y a Susana Pastor Benito por la guía y supervisión en la realización de este trabajo.

Agradezco a todas las personas que decidieron participar en este estudio y a los miembros del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Vall d'Hebron y de la Unidad de Epidemiología del Hospital Josep Trueta por la obtención de las muestras, así como a las personas involucradas en el manejo de las muestras en el Grupo de Mutagénesis, Aida Baida, Eddy González-Flores, Esteban-Mariano Giménez, Abdel-Mounaim Akdi, Cristian Valiente, Berenice Sandoval, Anna Corral, Glòria Umbert y Lourdes Alarcón. También al Ministerio de Educación y Ciencia de España (proyecto SAF2007-6338) y a la Generalitat de Catalunya (CIRIT; 2009SGR-725) por las ayudas recibidas para realizar este proyecto y a la Universidad Autónoma de Barcelona por la concesión de la beca predoctoral (PIF) que me ha permitido la realizar esta Tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El cáncer.....	1
1.1.1. El cáncer de tiroides.....	2
1.1.1.1. Tipos de cáncer de tiroides diferenciado.....	2
1.1.2. El cáncer de tiroides en España.....	4
1.1.3. Causas del cáncer de tiroides diferenciado.....	5
1.2. La radiación ionizante (RI).....	6
1.2.1. Efectos de la RI.....	6
1.2.2. Sensibilidad frente a la radiación.....	7
1.2.3. Inestabilidad genómica y cromosómica.....	8
1.2.4. Radiosensibilidad individual.....	8
1.3. Susceptibilidad genética al cáncer de tiroides.....	9
1.3.1. Genes de reparación y su implicación en el cáncer de tiroides.....	12
1.3.2. El gen <i>WDR3</i> y su asociación con el cáncer de tiroides.....	14
1.4. El ensayo de micronúcleos.....	15
1.4.1. El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis y su uso en la determinación de la sensibilidad a la radiación ionizante.....	16
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Descripción de la población.....	21
3.2. Obtención de las muestras de sangre.....	22
3.3. Selección de SNPs.....	22
3.4. Extracción del DNA y genotipado.....	22
3.5. Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN).....	24
3.5.1. Cultivo de linfocitos y tratamiento con radiación ionizante.....	24
3.5.2. Obtención de los linfocitos cultivados y preparación de portas.....	24
3.5.2.1. Evaluación de la proliferación celular.....	25
3.5.3. Recuento de micronúcleos.....	25
3.6. Análisis estadístico.....	26
4. RESULTADOS	29
4.1. Asociación entre polimorfismos de los genes <i>OGG1</i> , <i>XRCC1</i> , <i>XRCC2</i> y <i>XRCC3</i> con el cáncer diferenciado de tiroides.....	30
4.1.1. Características generales de la población.....	30

4.1.2. Análisis de asociación.....	31
4.1.3. Asociación de haplotipos del gen <i>XRCC1</i>	32
4.1.4. Interacción entre SNPs.....	32
4.2. Sensibilidad a la radiación ionizante de los pacientes con cáncer de tiroides	35
4.2.1. Características generales de la población	35
4.2.2. Niveles de daño.....	35
4.3. Influencia de los polimorfismos en genes de reparación sobre el daño en el DNA, tanto basal como inducido por la radiación ionizante.....	39
4.3.1. Características generales de la población.....	39
4.3.2. Niveles de daño.....	39
4.3.3. Asociación de haplotipos del gen <i>XRCC1</i> y los niveles de daño...	43
4.3.4. Interacción entre SNPs y niveles de daño.....	44
4.4. Posible rol del gen <i>WDR3</i> en el mantenimiento de la estabilidad genómica en pacientes con cáncer de tiroides.....	45
4.4.1. Características generales de la población.....	45
4.4.2. Niveles de daño.....	45
4.4.3. Asociación de haplotipos del gen <i>WDR3</i> y los niveles de daño....	49
5. DISCUSIÓN.....	51
5.1. Asociación entre polimorfismos de los genes <i>OGG1</i> , <i>XRCC1</i> , <i>XRCC2</i> y <i>XRCC3</i> con el cáncer diferenciado de tiroides.....	51
5.2. Sensibilidad a la radiación ionizante de los pacientes con cáncer de tiroides	56
5.3. Influencia de polimorfismos en genes de reparación sobre los niveles de daño en el DNA, basal e inducido por la radiación ionizante.....	58
5.4. Posible papel del gen <i>WDR3</i> en el mantenimiento de la estabilidad genómica en pacientes con cáncer de tiroides.....	61
6. CONCLUSIONES.....	65
7. BIBLIOGRAFÍA	67
8. ANEXOS.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anomalías genéticas en cánceres de tiroides.....	11
Tabla 2. Variantes genéticas asociadas con el desarrollo del cáncer diferenciado de tiroides.....	12
Tabla 3. Descripción de los polimorfismos usados para los diferentes estudios....	22
Tabla 4. Características generales de los grupos control (n=479) y pacientes (n=402).....	30
Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs seleccionados y su asociación con el cáncer diferenciado de tiroides.....	31
Tabla 6. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs25489 (Arg280His) del gen <i>XRCC1</i> y su asociación con las variantes papilar y folicular de cáncer de tiroides	33
Tabla 7. Haplotipos predichos mediante el algoritmo de esperanza-maximización	33
Tabla 8. Análisis de asociación entre los haplotipos del gen <i>XRCC1</i>	33
Tabla 9. Odds ratios (OR) para la interacción entre <i>XRCC1</i> (rs25489, Arg280His) y <i>OGG1</i> (rs1052133, Ser326Cys).....	34
Tabla 10. Odds ratios (OR) para la interacción entre <i>XRCC2</i> (rs3218536, Arg188His) y <i>XRCC3</i> (rs1799796, IVS7-14A>G).....	34
Tabla 11. Características generales de controles (n=50) y pacientes con cáncer de tiroides (n=53).....	35
Tabla 12. Factores que afectan la frecuencia de BNMN.....	36
Tabla 13. Daño en el DNA entre grupos.....	36
Tabla 14. Daño en el DNA por género.....	37
Tabla 15. Daño en el DNA por tipo de diagnóstico.....	37
Tabla 16. Factores que afectan los niveles de daño.....	40
Tabla 17. Frecuencia de BNMN (basal, tras la irradiación e inducido) según género, edad y diagnóstico histopatológico.....	41
Tabla 18. Diferencias en el nivel de daño basal de los genotipos de los SNPs evaluados.....	42
Tabla 19. Diferencias en el nivel de daño tras la irradiación entre los genotipos de los SNPs evaluados.....	42
Tabla 20. Diferencias en el nivel de daño inducido (neto) entre los genotipos de los SNPs evaluados.....	43
Tabla 21. Diferencias entre el nivel de daño basal para los haplotipos del gen	

<i>XRCC1</i>	43
Tabla 22. Diferencias entre el nivel de daño tras la irradiación para los haplotipos del gen <i>XRCC1</i>	44
Tabla 23. Diferencias entre el nivel de daño neto para los haplotipos del gen <i>XRCC1</i>	44
Tabla 24. Frecuencia de daño basal y tras la irradiación según género y diagnóstico histopatológico.....	46
Tabla 25. Diferencias en el nivel de daño basal entre los genotipos de los SNPs del gen <i>WDR3</i>	46
Tabla 26. Diferencias en el nivel de daño tras la irradiación entre los genotipos de los SNPs del gen <i>WDR3</i>	47
Tabla 27. Diferencias en el nivel de daño tras la irradiación entre los genotipos de los SNPs del gen <i>WDR3</i> para diagnóstico de tipo papilar.....	48
Tabla 28. Diferencias en el nivel de daño tras la irradiación entre los genotipos de los SNPs del gen <i>WDR3</i> para diagnóstico de tipo folicular.....	48
Tabla 29. Diferencias entre los niveles de daño basal para los haplotipos del gen <i>WDR3</i>	49
Tabla 30. Diferencias entre el nivel de daño tras la irradiación para los haplotipos del gen <i>WDR3</i>	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencia de los diferentes subtipos de cáncer de tiroides.....	3
Figura 2. Incidencia bruta anual de cáncer de tiroides por género.....	5
Figura 3. Evolución de la tasa de incidencia de cáncer por tipo de cáncer.....	5
Figura 4. Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.....	17
Figura 5. Protocolo de extracción de DNA mediante el método cloroformo-etanol	23
Figura 6. Valores de daño basal, tras la irradiación e incremento de daño para los grupos de controles y pacientes.....	37
Figura 7. Correlación entre el nivel de daño basal y el tras la irradiación, en los grupos de controles y pacientes.....	38
Figura 8. Correlación entre los el nivel de daño basal y tras la irradiación en 114 pacientes.....	40

ABREVIATURAS

AC	Aberraciones cromosómicas
Arg	Arginina
BER	Reparación por escisión de bases
BNMN	Células binucleadas que presentan micronúcleos
CBMN	Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis
CBPI	Índice de proliferación celular
CI	Intervalo de confianza
CT	Cáncer de tiroides
CTD	Cáncer de tiroides diferenciado
CTF	Cáncer de tiroides folicular
CTP	Cáncer de tiroides papilar
Cys	Cisteína
DE	Desviación estándar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	Roturas de doble cadena
EE	Error estándar
Gln	Glutamina
His	Histidina
HR	Reparación por recombinación homóloga
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg
MAF	Frecuencia del alelo menos frecuente
Met	Metionina
MN	Micronúcleos
OR	Odds ratio
RI	Radiación ionizante
RNA	Ácido ribonucleico
Ser	Serina
SNP	Polimorfismo de un sólo nucleótido
SSB	Roturas de cadena única
Thr	Treonina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer

El cáncer se considera que es una enfermedad genética que se inicia como un clon de células que se expanden de manera no regulada, debido a la adquisición de mutaciones somáticas (Stratton et al., 2009). Estas mutaciones incluyen sustituciones, inserciones y deleciones de bases, así como reorganizaciones cromosómicas causadas por roturas que son incorrectamente reparadas, y cambios en el número de copias de segmentos de DNA o de cromosomas completos (aneuploidías) (Stratton, 2011). Sin embargo, no está claro el cómo y en qué orden aparecen estas mutaciones (Kolodner et al., 2011). También son importantes en el proceso tumoral los cambios epigenéticos, que se heredan a través de los ciclos de división mitótica, como son los patrones de metilación de los residuos de citosina (Laird, 2005), además de la remodelación de la estructura de la cromatina durante la transcripción (lo que permite un cambio de estado accesible a no accesible) que se considera que juega un papel importante en la prevención de la inestabilidad genómica y de la tumorigénesis (Elsässer et al., 2011).

Las mutaciones somáticas ocurren en los genomas de todas las células normales durante los ciclos de división celular, desde el desarrollo embrionario en el útero hasta el reemplazo celular de tejidos en la vida postnatal. La tasa de adquisición y el tipo de mutación somática se puede incrementar por la acción de agentes exógenos y endógenos que causan daño en el DNA, aunque esto se puede ver atenuado por los procesos de reparación del DNA. Sin embargo, cuando estos mecanismos fallan, la tasa de mutación somática puede incrementarse de manera significativa (Stratton, 2011).

Esta hipótesis, aunque no permite explicar todos los tipos de cáncer, ya que las tasas de mutación normales no son suficientes para conocer el número de pasos necesarios que dan lugar a un cáncer (Bodmer et al., 2008), tiene gran aceptación (Vincent, 2011). Así, aunque se incremente la tasa de mutación, en las células cancerígenas se pueden distinguir dos tipos de mutaciones. Así, un tipo de mutaciones somáticas que confieren propiedades oncogénicas tales como ventajas de crecimiento, invasión de tejidos y metástasis, angiogénesis y evasión del inicio de la apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2011), que son conocidas como mutaciones "conductoras" (*driver mutations*), mientras que el otro tipo de mutaciones no tiene consecuencias funcionales en la célula (ya que no confieren

ninguna ventaja), que son las conocidas como mutaciones "pasajeras" (*passenger mutations*) (Stratton et al., 2009; ICGC, 2010).

Por otro lado existe un vínculo crítico entre la capacidad individual de reparar el daño en el DNA y el desarrollo y progresión de cáncer, así como en la respuesta frente a la terapia (Jalal et al., 2011). De esta manera, mutaciones en los genes de reparación permiten la aparición de la denominada inestabilidad genómica, cuando la función o la interacción de la proteína se ve afectada. Es por esta razón que la identificación de este tipo de mutaciones en muchos tipos de cánceres, provee un fuerte aval para la hipótesis mutacional sobre el origen del cáncer al incrementar la tasa de mutación espontánea (Negrini et al., 2010).

1.1.1. El cáncer de tiroides

El Instituto Nacional del Cáncer (*National Cancer Institute*, NCI) define al cáncer de tiroides (CT) como el cáncer que se forma en la glándula tiroidea (un órgano ubicado en la base de la garganta que produce hormonas que ayudan a controlar la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la temperatura del cuerpo y el peso). Ésta es la neoplasia endocrina más común y representa el 1% del total de neoplasias (Al-Brahim y Asa, 2006). El NCI ha estimado que para el año 2012, en Estados Unidos habrá unos 56.460 casos nuevos y 1.780 muertes relacionadas con su evolución. El CT es de 2 a 4 veces más frecuente en mujeres que en hombres, aunque las primeras generalmente muestran un mejor pronóstico en comparación a los hombres, para quienes se ha encontrado una alta progresión de la malignidad (Giusti et al., 2010).

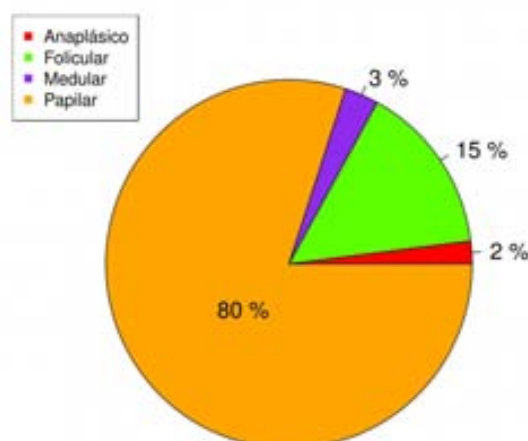
Hay que señalar que la incidencia de cáncer de tiroides se ha incrementado en los últimos años en todo el mundo. Este incremento puede ser debido, probablemente, a un perfeccionamiento en el escrutinio diagnóstico, aunque puede que ésta no sea la única explicación ya que diversos factores ambientales también podrían estar involucrados en este incremento (Chen et al., 2009).

1.1.1.1. Tipos de cáncer de tiroides diferenciado

Los cuatro tipos más importantes de cáncer de tiroides son el papilar, el folicular, el medular y el anaplásico, con frecuencias aproximadas del 80%, 15%, 3% y 2%, respectivamente (Figura 1). La determinación de estos tipos histológicos se realiza de acuerdo con el aspecto de las células bajo el microscopio (NCI, 2012). El cáncer de tiroides diferenciado (CTD), que incluye los subtipos papilar y

folicular, se corresponde con un 90% de las patologías malignas del tiroides (Brown y Cohen, 2008).

Figura 1. Frecuencia de los diferentes subtipos de cáncer de tiroides (Giusti et al., 2010)



a) Subtipo papilar

El cáncer de tiroides papilar (CTP) es un cáncer del epitelio folicular tiroideo, siendo el más diferenciado y el más frecuente (65 – 80% de los cáncer de tiroides) (Rosenbaum y McHenry, 2009); además, afecta más a las mujeres que a los varones (~2:1) (Wartofsky, 2005). Tumores de esta variante menores a 1 cm se encuentran con una alta frecuencia en autopsias de individuos no diagnosticados de cáncer de tiroides. A pesar de su elevada incidencia son tumores de un crecimiento lento y con poca capacidad de invasión, aunque cuando invade el tumor, éste se propaga comúnmente a lo largo del sistema linfático dentro y adyacente a la glándula tiroides, lo que justifica la naturaleza multifocal del tumor en la glándula tiroidea y su diseminación a los ganglios linfáticos regionales (Wong y Ahuja, 2005).

b) Subtipo folicular

El cáncer de tiroides folicular (CTF) se define como un tumor maligno epitelial que muestra diferenciación folicular y que pierde características del CTP (Sobrinho-Simoes et al., 2011), aunque no es posible diferenciar exactamente un tumor maligno de un benigno por lo que algunos profesionales clínicos prefieren usar el término lesión folicular (Wong y Ahuja, 2005). La variante folicular se caracteriza por la frecuente encapsulación del tumor, con una tasa relativamente baja de metástasis en comparación con la variante papilar (Zhu et al., 2003). Tiene

una prevalencia mayor en áreas deficientes en yodo y en muchos casos se desarrolla a partir de un adenoma preexistente. Cuando realiza metástasis hematógenas (por vía sanguínea) es propenso a realizarla en los pulmones, el hígado, los huesos y el cerebro, siendo la metástasis ganglionar en el cuello menos frecuente (Wong y Ahuja, 2005).

c) Subtipo medular

El cáncer medular (3 – 5%) deriva de las células C neuroendocrinas del tiroides. El 80% de los casos son esporádicos mientras que el 20% restante se origina en pacientes con síndromes como neoplasia endocrina múltiple tipo 2A (carcinoma medular del tiroides, tumores de la glándula paratiroidea y feocromocitoma unilateral o bilateral), tipo 2B (carcinoma medular del tiroides, feocromocitoma, neuromas de la mucosa y hábito marfanoide) y carcinoma medular familiar (Sherman, 2003). Los pacientes con este subtipo de cáncer tienen un tumor biológicamente más agresivo y puede desarrollar metástasis de manera más rápida. La recurrencia en el cuello y el mediastino (parte media del tórax) es común y se refleja bioquímicamente con un aumento de los niveles de calcitonina sérica (Wong y Ahuja, 2005).

d) Subtipo anaplásico

Este es un carcinoma poco diferenciado constituyendo la variante menos frecuente (~1%) (Sherman, 2003); sin embargo, es el más agresivo y presenta muy mal pronóstico. Es el responsable de un tercio de las muertes debido a cáncer de tiroides (Kojic et al., 2011) y su diagnóstico se sospecha clínicamente por el rápido crecimiento de los nódulos. Con frecuencia, los pacientes presentan signos y síntomas de compresión de las vías respiratorias (Wong y Ahuja, 2005).

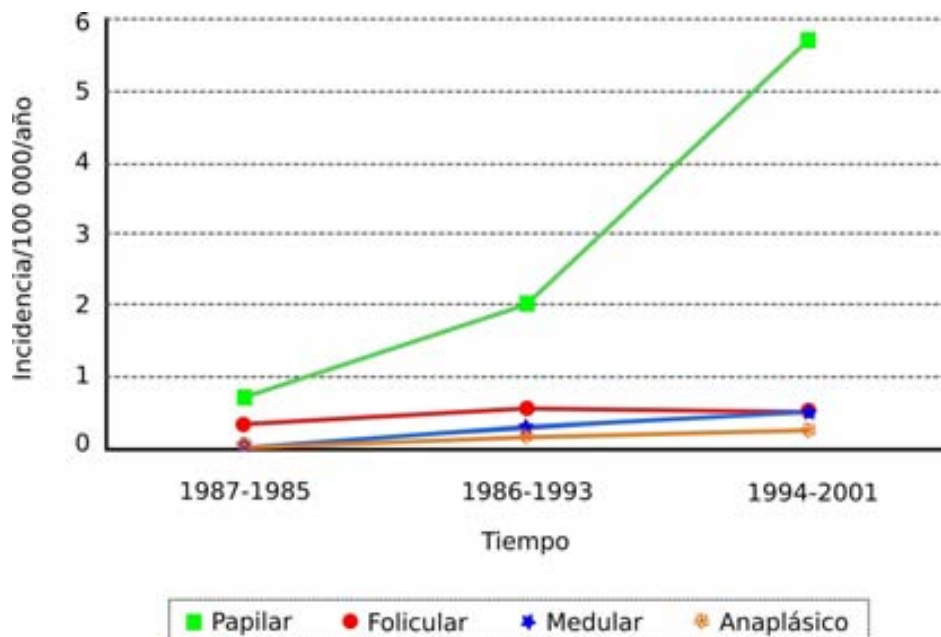
1.1.2. El cáncer de tiroides en España

El CT en España, presenta una incidencia baja pero creciente, muy probablemente debido al incremento de las mejoras metodológicas en el diagnóstico, además del hallazgo de tumores de tiroides de manera incidental (Rego-Iraeta et al., 2009). En la Figura 1 se muestra que la tasa de incidencia ha ido incrementando de manera considerable entre los años 1978 – 2001 siendo mayor en mujeres que en varones (Figura 2). El número de casos con tipo papilar también muestra un gran incremento en los periodos evaluados, en comparación con los tipos folicular, medular y anaplásico (Figura 3).

Figura 2. Incidencia bruta anual de cáncer de tiroides por género (Rego-Iraeta et al., 2009)



Figura 3. Evolución de la tasa de incidencia de cáncer por tipo de cáncer (Rego-Iraeta et al., 2009)



1.1.3. Causas del cáncer de tiroides diferenciado

El desarrollo del cáncer es la resultante de una interacción compleja entre factores ambientales, genéticos y epigenéticos (Sandoval y Esteller, 2012). En el caso del CTD existen factores ambientales, como una dieta deficiente en yodo (I),

que se han asociado con su incidencia (Dal Maso et al., 2009); sin embargo, la exposición a la radiación ionizante, particularmente durante la niñez y adolescencia, es uno de los factores de riesgo mejor establecido para el desarrollo de CTD (Dal Maso et al., 2009; Gatzidou et al., 2010), tal como se ha demostrado en estudios realizados tras la exposición a polvo radiactivo (el I^{131} es uno de sus componentes) consecuencia de desastres nucleares (Tronko et al., 2010), o bien tras una exposición médica (Mettler, 2012) o exposiciones producidas durante la actividad laboral (Mullenders et al., 2009). Adicionalmente, la exposición externa a la radiación ionizante también se ha asociado con otros efectos sobre el tiroides, que incluyen el hipotiroidismo, la estimulación de la autoinmunidad tiroidea y la inducción de nódulos tiroideos (Brent et al., 2007). Sin embargo, personas sin exposición previa a la radiación ionizante también pueden desarrollar cáncer de tiroides y el cáncer desarrollado en estas condiciones se describe como esporádico (Sarasin et al., 1999), lo que sugiere que otros factores de riesgo también podrían estar involucrados en la etiología de éste y otros tipos de cánceres esporádicos (Silva et al., 2005).

1.2. La radiación ionizante (RI)

Dado que la radiación ionizante es el factor ambiental más influyente en la aparición del cáncer de tiroides es bueno hacer referencia a algunas de sus características y efectos. La radiación ionizante (RI) consiste en un flujo de fotones o partículas cargadas que pueden interactuar con moléculas biológicas depositando energía por ionización y/o excitación (Prise et al., 2003). La interacción ocurre a nivel atómico y de manera aleatoria, siendo capaz de alterar la estructura molecular del DNA produciendo roturas ya sea de simple o de doble cadena. Este daño en el DNA se puede reparar de manera acertada o errónea (IARC, 2001).

1.2.1. Efectos de la RI

La radiación, tanto en sus formas no ionizante e ionizante, causa daño tisular ejerciendo la RI un rango más amplio de efectos sobre la célula (Nambiar et al., 2011). Estos suponen cambios en el sistema biológico por acción directa sobre macromoléculas como el DNA, lípidos y proteínas, e indirecta mediante la generación de radicales libres (que posteriormente causan daño en el DNA) y la del efecto *bystander* (inducción de respuesta al daño en el DNA en células no expuestas a la radiación pero vecinas de células que si lo fueron) (Prise et al.,

2003; Mullenders et al., 2003). Por cualquiera de las dos vías de acción, directa o indirecta, el DNA sufre roturas de cadena simple (SSB) y/o roturas de doble cadena (DSB). Una deficiencia en la reparación de las roturas, especialmente de las DSB, supone una alta frecuencia anormal de aberraciones cromosómicas (AC) como deleciones y traslocaciones recíprocas (Xiong et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, las roturas en el DNA son las alteraciones más importantes causadas por la RI, y de ellas las DSB son las lesiones esenciales para la formación de aberraciones cromosómicas. Los tipos de aberraciones cromosómicas inducidas por las DSB dependen de la etapa del ciclo celular en las que ocurren estas roturas. Así, una DSB en la cromátida de un cromosoma en la etapa G₀/G₁ permitirá que, luego de la replicación, ambas cromátidas estén afectadas (AC de tipo cromosómico). Las DSB inducidas en la fase G₂ pueden alterar una sola cromátida de un cromosoma duplicado (AC de tipo cromatídico). En la fase S, las DSB dan lugar a aberraciones cromosómicas de ambos tipos, cromosómicos y cromatídicos, dependiendo de si el daño en el DNA ocurrió en regiones aun no replicadas o replicadas del cromosoma, respectivamente (Obe y Durante, 2010).

1.2.2. Sensibilidad frente a la radiación

No todas las células u organismos responden de la misma manera frente a una dosis equivalente de RI; así, un incremento en la susceptibilidad a sufrir daño celular por la exposición a la radiación se conoce como sensibilidad a la radiación. Esta sensibilidad se puede evaluar en cultivos celulares usando varios criterios de valoración que incluyen citotoxicidad (ensayos de supervivencia), respuestas clastogénicas (daño cromosómico), así como mutagenicidad y reparación del DNA (Hall y Angèle, 1999).

Un ejemplo de esta sensibilidad se puede observar en personas que sufren de anemia de Fanconi o de ataxia telangiectasia en quienes la capacidad de respuesta frente a los agentes que alteran la integridad del DNA, como la RI, es bastante baja. La existencia de personas con una sensibilidad incrementada a la RI también se ha demostrado en pacientes que desarrollaron cáncer, evaluando los niveles de daño cromosómico (Scott et al., 1999). Esto sugiere la existencia de defectos en la capacidad para reparar el daño en el DNA inducido por la RI, aunque éste no es necesariamente el único factor de predisposición al cáncer (Scott, 2004; Mullenders et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, la exposición a la RI se ha establecido

como el factor que incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de tiroides con una relación dosis-respuesta; sin embargo, aun no hay una explicación clara que permita entender el por qué algunas personas expuestas a la misma dosis de radiación desarrollan cáncer y otras no, ¿se trata de eventos aleatorios? ¿existe un componente genético o algún factor ambiental capaces de modular el riesgo? Algunos estudios, como los realizados por Detours et al. (2008) y Thomas et al. (2011) plantean estas preguntas sugiriendo que la propensión a desarrollar cáncer después de una exposición a la RI, varía entre los miembros de una población y que ésta puede ser medible teniendo en cuenta factores genéticos.

1.2.3. Inestabilidad genómica y cromosómica

Inestabilidad genómica (o inestabilidad genética) son términos usados para describir un fenómeno que resulta en la acumulación de múltiples cambios que hacen que el genoma estable de una célula normal se convierta en un genoma inestable característico de una célula tumoral (Bourguignon et al., 2005). Así, la inestabilidad genómica es una condición que predispone a la célula a acumular mutaciones estables y representa un paso temprano en el proceso de carcinogénesis (Bonassi et al., 2011).

En muchos tipos de cánceres, la inestabilidad se hace obvia como alteraciones en el número y estructura de los cromosomas, además de otros cambios en la estructura del DNA, como sustituciones de nucleótidos, inserciones y deleciones (Lord y Ashworth, 2012). Por tanto, la inestabilidad cromosómica no es más que una forma de expresión de la inestabilidad genómica y se define como una tasa alta y persistente de ganancia o pérdida de cromosomas enteros debido a una mala segregación de los mismos o bien roturas de cromosomas que conllevan a aberraciones cromosómicas estructurales (Thompson et al., 2010).

La inestabilidad genómica se hace evidente en una importante fracción de las células expuestas a la radiación; sin embargo, aún se discute si éste es un paso previo o posterior al desarrollo y progresión de un tumor. Esta expresión de inestabilidad puede venir influenciada por diferentes factores como el genotipo, el tipo celular, el tipo de radiación o por modificaciones epigenéticas (Kadhim et al., 2006; Aypar et al., 2011).

1.2.4. Radiosensibilidad individual

Como se ha comentado anteriormente, existen personas con una sensibilidad incrementada a la RI. El conocimiento de la sensibilidad a la RI en

tejidos sanos, normalmente en linfocitos, puede ayudar a identificar pacientes con alto riesgo de sufrir complicaciones si son sometidos a radiación por motivos diagnósticos o terapéuticos. De la misma manera se pueden identificar pacientes relativamente radioresistentes quienes probablemente pueden tolerar altas dosis sin complicaciones serias (Widel et al., 2003). Por tanto, el conocer el estatus de un paciente con respecto a su radiosensibilidad es básico a la hora de diseñar un protocolo radioterapéutico. Diferentes observaciones sugieren la existencia de factores genéticos e interacciones complejas de éstos con factores ambientales, lo que podría modular la sensibilidad individual a la RI, así como la susceptibilidad al desarrollo de CT (Takahashi et al., 2010).

Se han usado diversos biomarcadores para evaluar los efectos genotóxicos inducidos por la exposición a la radiación ionizante, entre los que podemos destacar el ensayo del cometa, los cromosomas dicéntricos, la formación de foci γ -H2AX y el ensayo de micronúcleos. Estos marcadores también se pueden usar para evaluar la sensibilidad individual a la RI, especialmente en la investigación clínica (Olive y Banáth, 2004; El-Zein et al., 2006; Volpato et al., 2008). Por ejemplo, Xiong et al. (2005) demostraron que el número de roturas cromatídicas por célula, tras exponerse a la radiación gamma, fue significativamente más elevado en los linfocitos de 57 pacientes con cáncer de tiroides papilar sin exposición documentada a la radiación, en comparación con los linfocitos de controles sanos (Detours et al., 2008). Los micronúcleos se han usado también para realizar estudios similares en pacientes con diferentes tipos de cáncer, así como en pacientes portadores de HIV como se comentará más adelante (Scott et al., 1998; Mozdarani et al., 2005; Baeyens et al., 2010).

1.3. Susceptibilidad genética al cáncer de tiroides

Sobre los factores moduladores de la incidencia de cáncer, la RI es el factor ambiental mejor asociado con el incremento del riesgo de CT; sin embargo, no todas las personas expuestas a RI desarrollan un tumor (Detours et al., 2008; Thomas et al., 2011). Además, no todas las personas que desarrollan cáncer lo hacen con el mismo ritmo de progresión (Pérez-Losada et al., 2011). Esto indica que el cáncer es una enfermedad compleja, en términos de tiempo de desarrollo así como en el las propiedades biológicas de cada tipo de tumor.

Algunas enfermedades hereditarias como la ataxia telangiectasia, el síndrome de Bloom o el síndrome de Nijmegen, se asocian con una elevada sensibilidad a la RI, así como con un incremento del riesgo de desarrollar cáncer.

Estas enfermedades están ligadas a la existencia de mutaciones en diversos genes involucrados en la reparación de las lesiones en el DNA (Hoeijmakers, 2001), y diferentes estudios sugieren que las variaciones en la capacidad de reparar el DNA pueden modular la susceptibilidad al cáncer (Chistiakov et al., 2008).

Teniendo en cuenta la teoría mutacional sobre el origen del cáncer, se ha propuesto que la tasa de mutación espontánea no es suficiente para dar lugar al elevado número de mutaciones que se encuentran en los cánceres humanos, por lo que deben existir células que presenten un fenotipo mutador (Loeb et al., 1974; Loeb et al., 2008). Este fenotipo puede aparecer por mutaciones en genes que tienen una función importante en el mantenimiento de la integridad del genoma, como son las mutaciones en las DNA polimerasas cuya función se ve afectada permitiendo errores durante la replicación; mutaciones en genes involucrados en la segregación cromosómica, y mutaciones en genes de la reparación, cuya función ineficiente permite la acumulación de mutaciones a lo largo del genoma (Wogan, et al., 2004). Estudios epidemiológicos en poblaciones humanas muestran evidencias relevantes de que defectos en la capacidad de reparar el DNA influyen en el desarrollo del cáncer (Berwick y Vineis, 2000; Decordier et al., 2010).

Otros genes también pueden influenciar el desarrollo del cáncer; así, en el 80% de los cánceres de tiroides de tipo papilar, se encuentran mutaciones activas en genes que codifican moléculas de señalización de la vía MAPK-ERK que transmite señales mitogénicas desde la membrana hacia el núcleo (Williams y Smallridge, 2004), por lo que se cree que dichos genes juegan un papel relevante en este tipo de cáncer (Schlumberger y Sherman, 2012).

En la Tabla 1 se muestran los principales genes y alteraciones encontradas en la mayoría de los cánceres de tiroides diferenciado. Mutaciones en el gen BRAF (quinasa serina-treonina) constituyen la alteración genética más común en el CT, encontrándose en casi la mitad de las variantes papilar en adultos sin historia de exposición a la RI. Mutaciones en el gen RET están presentes en cerca de un tercio de los casos y son particularmente comunes (50 – 90%) en carcinomas papilares pediátricos asociados con la exposición a la radiación ionizante. Existe una fuerte asociación entre las reordenaciones cromosómicas que involucran al gen RET (receptor tirosina quinasa) y la exposición a la RI, especialmente en carcinomas papilares de adolescentes (Kondo et al., 2006; Dal Maso et al., 2009). Por lo que respecta al gen supresor de tumores p53, su

inactivación es rara en pacientes con CT diferenciado pero común en los CT no diferenciados (anaplásicos, CTA); así, más de la mitad de los CTA presentan mutaciones o no expresión del gen p53 (Lamm et al., 2000; De Lellis et al., 2004).

Tabla 1. Anomalías genéticas en cánceres de tiroides (Modificado de Kouniavsky y Zeiger, 2010)

Región cromosómica	Gen	Función	Variante diagnóstica	Referencia
9q22.33 14q13.3	FOXE1 NKX2-1	Diferenciación del tiroides	CTP y CTF CTP	Gudmundsson et al., 2009; Takahashi et al., 2010
8q24	AK023948	RNA no codificante	CTP	He et al., 2009
5q33	<i>pre-miR-146a</i>	Regulación génica	CTF	Jazdzewski et al., 2009
2q12-14	VDR	Receptor de vitamina D	CTP y CTF	Penna-Martinez et al., 2009
12q24	P2X ₇ R	Receptor purinérgico	CTPVF	Dardano et al., 2009
19q13.2-13.3 14q32.3 1q41-42	XRCC1 XRCC3 PARP1 (ADRPT)	Reparación del DNA	CTP y CTF	Ho et al., 2009; Chiang et al., 2008; Akulevich et al., 2009; Bastos et al., 2009; Sturgis et al., 2005
1p12	WDR3	Señal de transducción, biogénesis del ribosoma	CTP y CTF, CCH	Baida et al., 2008; Akdi et al., 2010

CTP: Cáncer de tiroides papilar; CTF: Cáncer de tiroides folicular; CTPVF: Cáncer de tiroides papilar variante folicular; CCH: Carcinoma de células Hürthle.

En la Tabla 2 se indican múltiples loci asociados con el riesgo de desarrollar cáncer de tiroides, algunos de ellos corresponden a genes involucrados en la diferenciación del tiroides así como genes de reparación del daño en el DNA, aunque revisiones posteriores, incluidos meta-análisis, han obtenido resultados contradictorios en este último grupo (Hu et al., 2005; Landa y Robledo, 2011).

Tabla 2. Variantes genéticas asociadas con el desarrollo del cáncer diferenciado de tiroides (Schlumberger y Sherman, 2012)

Región cromosómica	Gen (Alteración genética)	Función	CTP	CTF	CTPD
10q11.2	RET (mut) RET (AC)	Receptor tirosina quinasa	--- 13 – 43%	--- ---	--- ---
7q34	BRAF (mut) RAS (mut)	Quinasa serina-treonina GTPasa	45% 0 – 21%	--- 45%	5% 25%
3q26.3	PIK3CA (amp/mut)	Quinasa	3 – 12%	6 – 28%	30%
2q13 / 3p25	PAX8 / PPARG (trans)		---	35%	---
17p13.1	TP53 (mut)		---	---	35%

mut: mutación; AC: aberración cromosómica; amp: amplificación; trans: translocación; CTP: Cáncer de tiroides papilar; CTF: Cáncer de tiroides folicular; CTPD: Cáncer de tiroides pobremente diferenciado.

1.3.1. Genes de reparación y su implicación en el cáncer de tiroides

Los genes de reparación tienen un papel fundamental en el mantenimiento del genoma (Hung et al., 2005). Así, mutaciones en estos genes pueden suponer una disminución de la eficiencia en la reparación del DNA e influir en la carcinogénesis (Hao et al., 2006). Por esta razón, polimorfismos en este tipo de genes se incluyen rutinariamente en los estudios de asociación, demostrándose que algunas de estas variantes actúan modulando el riesgo de desarrollar cáncer (Goode et al., 2002; Hu et al., 2002).

Algunos polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en genes que participan en la ruta de reparación por escisión de base (BER) como *OGG1* y *XRCC1* y en la ruta de reparación por recombinación homóloga (RH) como *XRCC2* y *XRCC3* se han evaluado en estudios de asociación para demostrar su papel en la susceptibilidad a desarrollar diferentes tipos de cáncer (Berwick y Vineis 2000; Goode et al., 2002; Manuguerra et al., 2006, Chiang et al., 2008; Michiels et al., 2009).

Dada la relación con nuestro trabajo, vamos a detallar algo la información que se tiene respecto a estos dos genes que participan en BER y los otros dos que participan en RH.

El gen *OGG1* codifica una proteína que corresponde a un homólogo funcional de la enzima formamidopirimidina-N-glicosilasa (Fpg) de *Escherichia coli* (MutM) que actúa de manera bifuncional con actividad DNA glicosilasa y una actividad liasa. Esta enzima inicia la reparación por BER y elimina de manera específica aductos del tipo 8-oxoguanina (8-oxoG) (Ide y Kotera, 2004). La región 3p25 donde se encuentra este gen, se encuentra involucrada en tumores de

pulmón e hígado, mostrando pérdida de heterocigosidad (Srivastava et al., 2009). Un estudio sobre los niveles de actividad de OGG1 muestra que un 40% de pacientes con cáncer de pulmón presentan baja actividad de esta enzima (Paz-Elizur et al., 2003). Existe un polimorfismo en este gen que supone el cambio del aminoácido en la posición 326 de Ser por Cys (Ser326Cys) que se ha asociado con varios tipos de cánceres (esófago, pulmón y próstata) aunque no hay estudios sobre su asociación con el cáncer de tiroides (Le Marchand et al., 2002; Xu et al., 2002; Goode et al., 2002; Okasaka et al., 2009). Aunque el significado funcional de este polimorfismo no está completamente dilucidado, se han encontrado valores elevados de daño en el DNA (medidos mediante el ensayo del cometa) de personas portadoras del alelo 326Cys expuestas a cobalto (Mateuca et al., 2005) y a pesticidas (Rohr et al., 2011). También se ha observado que la capacidad de reparación es más lenta en los trabajadores de una planta nuclear portadores de los genotipos Ser/Cys o Cys/Cys, con respecto a los portadores del genotipo Ser/Ser (Aka et al., 2004).

Por lo que hace al gen *XRCC1* (*X-ray repair cross complementing group 1*) (19q13.2), éste codifica una proteína de andamiaje (scaffold) que participa en la reparación de roturas de cadena simple a través de la ruta de reparación BER. La proteína *XRCC1* interactúa con otras proteínas como OGG1, DNA polimerasa β , DNA ligasa III, polimerasa poli ADP-ribosa (PARP), endonucleasa AP humana y el antígeno de proliferación celular (PCNA) (Hoeijmakers 2001; Marsin et al., 2003). Los polimorfismos Arg280His y Arg399Gln de este gen han sido objeto de numerosos estudios de asociación con relación al riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, hígado, endometrio, estómago y mama, entre otros. Los resultados indican que pueden modificar el riesgo bajo algunos modelos de herencia (Schneider et al., 2008; Li et al., 2009; Xue et al., 2011; Liu et al., 2011; Sobczuk et al., 2012). Con respecto a su asociación con el riesgo de sufrir cáncer de tiroides, los resultados son conflictivos encontrándose tanto resultados positivos como negativos (Chiang et al., 2008; Akulevich et al., 2009; Ho et al., 2009).

Los genes *XRCC2* y *XRCC3* (localizados en 7q36.1 y 14q32.3, respectivamente) codifican proteínas que son miembros de una familia relacionada con RecA/Rad51, que participan en la reparación de DSB mediante el mecanismo de reparación homóloga. La proteína *XRCC2* es un componente del core (núcleo), junto con *XRCC3* en esta vía de reparación, y forma un heterodímero con la proteína tipo RAD51 (Thacker, 2005). Fibroblastos embrionarios e inmortalizados de ratones knockout para *XRCC2* muestran elevados niveles de aneuploidía, de

aberraciones cromosómicas y de haploinsuficiencia (Li et al., 2006). El número de polimorfismos en estos genes que se han evaluado en diferentes estudios es mucho menor a los descritos para los polimorfismos en *OGG1* y *XRCC1*. Los polimorfismos Arg188His en *XRCC2* y Thr241Met en *XRCC3* son los más estudiados. Se ha indicado que la presencia del alelo 188His en *XRCC2* incrementa el riesgo de cáncer de páncreas en interacción con el consumo de tabaco (Jiao et al., 2008), así como de cáncer del tracto aerodigestivo (faringe) (Benhamou et al., 2004); contrariamente, este mismo alelo también se ha descrito como asociado a una reducción del riesgo de cáncer de vejiga (Figueroa et al., 2007).

Con respecto a la enzima *XRCC3*, se ha sugerido su participación en diferentes etapas de la ruta de reparación por recombinación homóloga (RH). Se ha demostrado que tiene un papel en el retardo de la replicación debido a daño inducido en el DNA, lo que ocurre en etapas tempranas del mecanismo de recombinación homóloga (Henry-Mowatt et al., 2003), así como un papel directo en la resolución de uniones tipo Holliday (Liu et al., 2004). También parece estar involucrado en el reclutamiento de Rad51 en los sitios con DSB (Forget et al., 2004). Dos estudios llevados a cabo en pacientes con cáncer de tiroides, muestran que la presencia del alelo 241Met en homocigosis incrementa el riesgo de desarrollar cáncer (Bastos et al., 2009; Sturgis et al., 2005).

De manera general, los resultados obtenidos en estudios de asociación (caso-control) con polimorfismos en los genes de reparación (como los citados arriba) son conflictivos o no concluyentes; probablemente debido al bajo poder estadístico resultado de un pequeño tamaño muestral, a diferencias entre grupos étnicos, o por falta de considerar la posible interacción con factores ambientales en los análisis estadísticos. Es por esto por lo que es necesario confirmar estas posibles asociaciones (Adjadj et al., 2009).

1.3.2. El gen *WDR3* y su asociación con el cáncer de tiroides

La región cercana al centrómero en el brazo corto del cromosoma 1 (1p12), se ha asociado con diferentes tipos de cánceres, incluyendo el CTD (Zhang et al., 1999; Baida et al., 2008) (ver Tabla 2). Estudios de nuestro Grupo han demostrado que el gen *WDR3* localizado en esta región muestra una asociación con el CTD sugiriendo su implicación en la etiología del CT (Akdi et al., 2010). Existe muy poca información sobre el papel del gen *WDR3* a nivel de función celular pero se ha descrito que forma parte de una familia de genes eucarióticos que llevan la

repetición WD, que son repeticiones de aproximadamente 40 aminoácidos que comienzan por el dipéptido Gly-His (extremo amino terminal) y finaliza con un dipéptido Trp-Asp (extremo carboxilo terminal) (Claudio et al., 1999). Estas repeticiones facilitan la formación de complejos multiprotéicos y las proteínas de esta familia, están involucradas en una variedad de procesos celulares que incluyen, progresión del ciclo celular, señales de transducción, apoptosis, y regulación génica (Smith, 2008). Ya que las repeticiones WD no existen en genomas procarióticos, se asume que probablemente debieron aparecer en precursores eucarióticos (Jin et al., 2004).

El gen *WDR3* codifica una proteína nuclear de 943 aminoácidos que lleva 10 repeticiones WD (Claudio et al., 1999). Aunque se desconoce el papel de esta proteína, se ha indicado su implicación en la progresión del ciclo celular y en la transducción de señales (Li y Roberts, 2001); y recientemente, en la biogénesis del ribosoma (McMahon et al., 2010).

1.4. El ensayo de micronúcleos

Los micronúcleos (MN) son masas de cromatina que tienen la forma de pequeños núcleos fácilmente observables con el microscopio, en células interfásicas, luego de una tinción con un colorante básico. El uso de técnicas moleculares (uso de sondas pan-centroméricas o anticuerpos para proteínas del cinetocoro) ha permitido conocer el contenido del micronúcleo. Así, éste puede estar formado por fragmentos acéntricos originados por la rotura del DNA, o por cromosomas enteros que pueden retrasarse durante la anafase/telofase (Fenech, 2006). También se pueden originar a partir de la rotura de puentes nucleoplásmicos y por la liberación de yemas nucleares (Saunders et al., 2000). Hay que resaltar que un estudio reciente sobre el origen de los MN llevado a cabo en células HeLa, haciendo uso de un sistema de captura de imágenes, ha permitido observar hasta siete mecanismos distintos que posibilitan la formación de los MN (Huang y Fenech, 2011).

Son múltiples los estudios que han observado que, en humanos, la formación de micronúcleos está influenciada por factores como la edad, el género, la dieta, el consumo de alcohol y/o de tabaco, así como por factores genéticos que modifican la susceptibilidad individual frente a un agente genotóxico (Norppa, 2004; Fenech y Bonassi, 2011), aunque esta influencia puede diferir de manera importante en poblaciones o grupos étnicos. Distintos estudios de asociación muestran que existe un componente genético capaz de modular la frecuencia

espontánea (basal) de micronúcleos mediante una interacción con los factores mencionados anteriormente, así como con la exposición ambiental a agentes genotóxicos o con patologías como, el cáncer o enfermedades cardiovasculares (Iarmarcovai et al., 2008).

La formación de micronúcleos se puede inducir por factores exógenos como la radiación, agentes químicos o biológicos, y por factores endógenos que incluyen defectos genéticos, cambios patológicos, deficiencias en los niveles de nutrientes esenciales (por ejemplo, ácido fólico) y lesiones inducidas por productos metabólicos (radicales libres) (Fenech, 2008). Así, la presencia de MN se puede interpretar como la ocurrencia de daño cromosómico, razón por la cual son cada vez más usados como biomarcadores de efectos genotóxicos y, por lo tanto, de inestabilidad cromosómica.

1.4.1. El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis y su uso en la determinación de la sensibilidad a la radiación ionizante

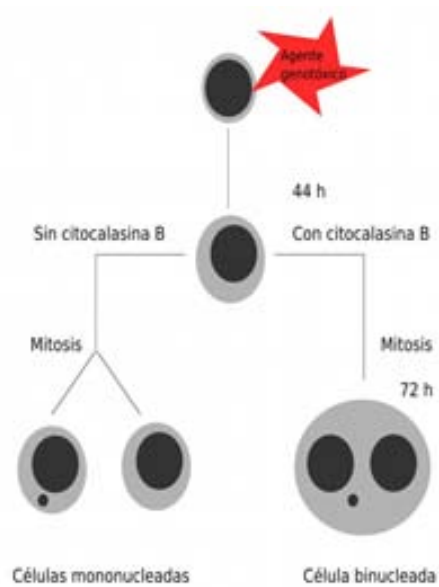
Teóricamente, los MN pueden estar ya formados *in vivo* durante la división celular en la médula ósea, en el bazo o en los nódulos linfáticos y persistir hasta que la muestra de sangre es obtenida. Sin embargo, la adición de citocalasina-B a los cultivos de linfocitos (a las 44 horas) inhibe la polimerización de la actina y la miosina necesarias para la progresión de la telofase, impidiendo la citocinesis. Esto permite la formación de células con dos o más núcleos, dependiendo del número de mitosis realizadas (Figura 4). El estudio de MN con bloqueo de la citocinesis pues, se limita a evaluar células binucleadas (células que han sufrido un proceso de división celular *in vitro*). Dado que los linfocitos se encuentran en el torrente sanguíneo en la fase G₀, se puede esperar que la mayoría de los MN visualizados se hayan formado durante este proceso de división celular *in vitro* a partir de lesiones previas existentes en el DNA en las fases G₀ o G₁ del ciclo celular (Kirsch-Volders y Fenech, 2001).

El ensayo de MN en linfocitos humanos es uno de los más usados para medir el daño en el DNA, debido a que son más fáciles de visualizar en comparación con las aberraciones cromosómicas (Fenech, 2002; Bonassi et al., 2011). Además, los niveles de MN en sangre periférica se consideran un "dosímetro biológico" en personas que han sufrido una exposición a la radiación de tipo laboral, médica o accidental (Vral et al., 2011).

Los MN también se consideran una herramienta muy útil para determinar la sensibilidad individual a la RI, como se ha demostrado en pacientes con cáncer

(mama, pulmón, esófago, tiroides), así como en personas portadoras del HIV (Scott et al., 1998; Mozdarani et al., 2005; Guler et al., 2005; El-Zein et al., 2006; Baeyens et al., 2010).

Figura 4. Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis



2. OBJETIVOS

El Grupo de Mutagénesis lleva tiempo estudiando distintos aspectos relacionados con el cáncer de tiroides, desde los factores que predisponen a su aparición hasta las consecuencias relativas asociadas con el uso terapéutico del yodo radiactivo. De hecho, la primera publicación en este campo data ya de 1996.

En este contexto, los objetivos que se plantea esta Tesis son tres, relacionados con los distintos artículos publicados o enviados para su publicación.

1) El primer objetivo es evaluar la posible asociación existente entre diversos polimorfismos en genes de reparación [rs1052133 (*OGG1*); rs25489, rs25487 (*XRCC1*); rs3218536 (*XRCC2*) y rs1799796 (*XRCC3*)] y el desarrollo de cáncer diferenciado de tiroides. A pesar de la clara asociación existente entre la exposición a la radiación ionizante en la etapa juvenil y la aparición de cáncer de tiroides, es mucha la información que se necesita para establecer si alteraciones en los genes encargados de reparar las lesiones inducidas por la radiación ionizante modulan la aparición de estos tumores.

2) El segundo objetivo es determinar si los pacientes con CT son especialmente sensibles a la radiación ionizante. En relación al punto anterior, es sorprendente que no se hayan llevado a cabo estudios específicos para rellenar esta falta de información. Así pues, esto es lo que pretende dilucidar este punto.

3) Finalmente, se trata de valorar la posible asociación de distintos polimorfismos con los niveles de daño en el DNA (tanto basal como inducido por la radiación ionizante). Además de los polimorfismos seleccionados en el punto 1 [rs1052133 (*OGG1*); rs25489, rs25487 (*XRCC1*); rs3218536 (*XRCC2*) y rs1799796 (*XRCC3*)], también se han evaluado los polimorfismos rs3754127, rs3765501 y rs4658973 del gen *WDR3*. En la búsqueda de nuevos genes con un papel relevante en el cáncer de tiroides, nuestro Grupo ha encontrado una fuerte asociación entre el gen *WDR3* y la incidencia de cáncer de tiroides. Por tanto, en este punto se pretende profundizar en el papel que juegan estos genes en la radiosensibilidad; aspecto ligado al objetivo anterior.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción de la población

La población objeto de estudio consistió de 998 personas de etnia caucásica española estructurada en 438 pacientes con diagnóstico de cáncer de tiroides diferenciado (CTD) y 560 personas voluntarias sin historial clínico de desarrollo de cáncer, escogidas como grupo control. De todas ellas se obtuvieron muestras de sangre durante el periodo 2004 – 2009 en el Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona) y en el Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta. La información clínica de los pacientes se obtuvo a partir de sus respectivas historias clínicas, además de un pequeño cuestionario a completar en el momento de la toma de muestra, indicando hábitos en el consumo de alcohol y tabaco así como una breve descripción del diagnóstico histopatológico. Desafortunadamente no fue posible obtener toda la información con respecto al estilo de vida para todas las personas participantes en el estudio. Los criterios de inclusión de los pacientes no fueron rigurosos y prácticamente todos los nuevos casos diagnosticados como CTD fueron incluidos en el estudio. El grupo control corresponde a residentes de las mismas provincias, con una media de edad y hábitos de consumo de alcohol y tabaco similares, que asistieron a los hospitales para una revisión médica de rutina, así como de personas que trabajan en la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Para el estudio de asociación entre los SNPs en genes de reparación y el cáncer de tiroides, el tamaño final de los grupos de pacientes y controles fue de 402 y 479 personas respectivamente, debido a que no todas las muestras amplificaron correctamente (Artículo/anexo 1). Los estudios de sensibilidad a la radiación ionizante se llevaron a cabo con un subgrupo de las poblaciones iniciales con un tamaño de 53 pacientes y 50 controles (Artículo/anexo 2). Para el estudio de asociación entre los valores de daño en el DNA y los SNPs en genes de reparación y en el gen *WDR3* el número de pacientes fue de 114 y 115, respectivamente (Artículos/anexos 3 y 4). Estas diferencias son debidas a que no todos los pacientes y controles registrados en la base de datos del Grupo de Mutagénesis presentan información sobre valores de daño y/o de genotipo. Las características generales para cada una de estas subpoblaciones se describen en los artículos mencionados arriba.

3.2. Obtención de las muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción y fueron remitidas al laboratorio en un tiempo máximo de 24 horas tras su extracción.

Por cada persona se obtuvieron dos muestras de 4 mL de sangre periférica usando tubos de extracción vacutainer con diferentes anticoagulantes, EDTA y heparina sódica. La muestra en el tubo con EDTA se destinó a la extracción del DNA, mientras que la muestra con heparina sódica se usó para realizar el ensayo de micronúcleos.

3.3. Selección de SNPs

Los SNP en los genes *OGG1*, *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3* y *WDR3* se identificaron mediante la búsqueda de literatura haciendo uso de la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La selección de todos los SNPs se realizó teniendo en cuenta que tuvieran una frecuencia mayor a 0,05 para el alelo menos frecuente (MAF > 0,05). Información sobre los genes seleccionados se muestra en la Tabla 3.

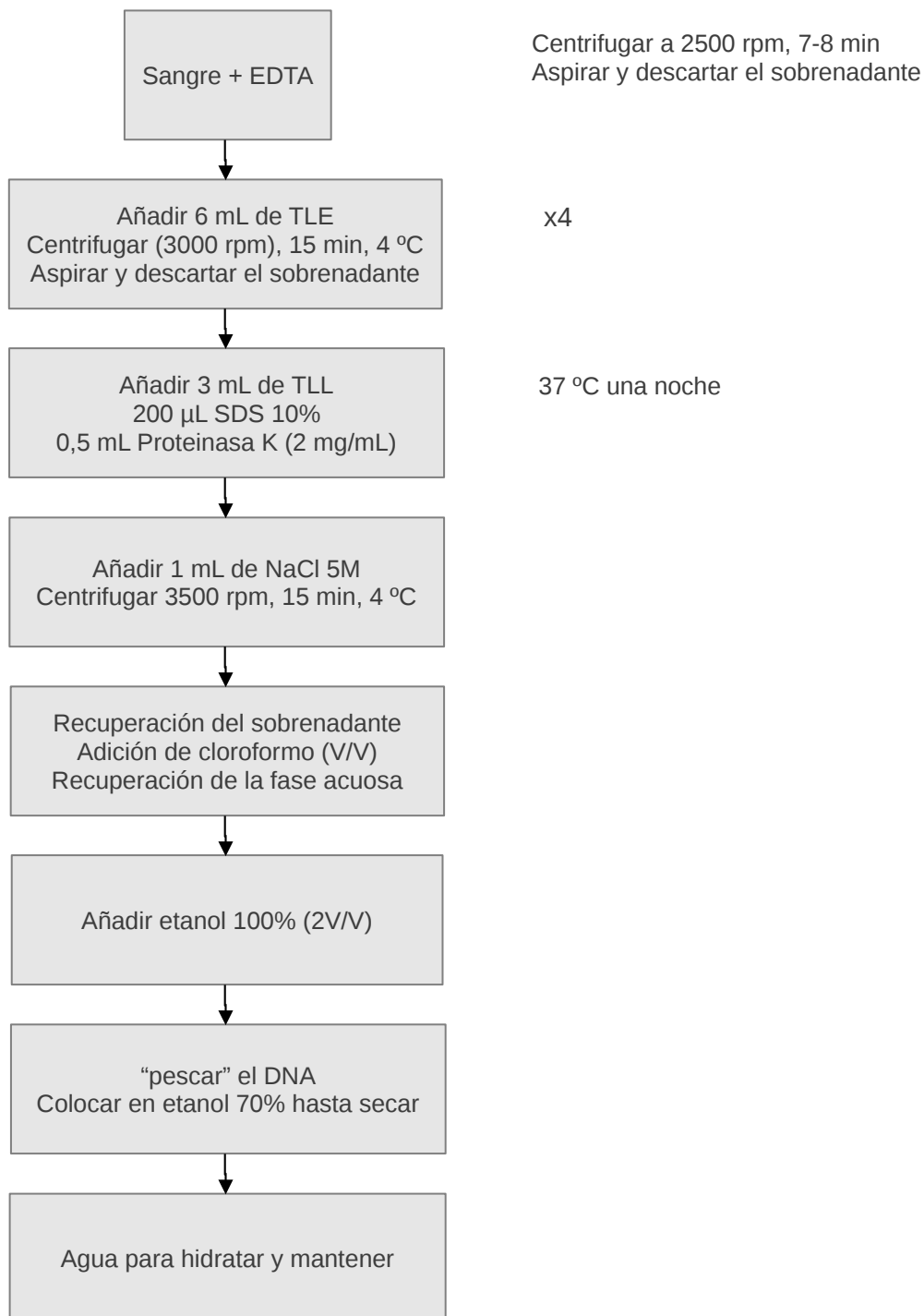
Tabla 3. Descripción de los polimorfismos usados para los diferentes estudios.

Gen	Referencia	Alelos	Cambio de aminoácido
<i>OGG1</i>	rs1052133	C/G	Ser326Cys
<i>XRCC1</i>	rs25489	G/A	Arg280His
	rs25487	G/A	Arg399Gln
<i>XRCC2</i>	rs3218536	G/A	Arg188His
<i>XRCC3</i>	rs1799796	A/G	Intrón
<i>WDR3</i>	rs3754127	C/T	Región 5' del promotor
	rs3765501	G/A	Intrón
	rs4658973	T/G	Intrón

Referencia: Identificador en la base de datos del NCBI

3.4. Extracción del DNA y genotipado

La obtención del DNA para el genotipado se realizó, fundamentalmente, a partir de linfocitos de sangre periférica usando el método de extracción con alcohol-cloroformo (Figura 5).

Figura 5. Protocolo de extracción de DNA mediante el método cloroformo-etanol

TLE: Tampón de lisis de eritrocitos; TLL: Tampón de lisis de leucocitos; SDS: dodecil sulfato de sodio.

También se extrajo DNA a partir de muestras de saliva usando el kit Oragene DNA Self-Collection kit (DNA Genotek, Canada), aunque sólo para algunas pocas muestras de los controles. El genotipado se llevó a cabo en el

Centro Nacional de Genotipado (CeGen) (<http://www.cegen.org>) usando la plataforma Sequenom MassARRAY iPLEX. El procedimiento consiste, básicamente, en la extensión de una sola base con nucleótidos de masa modificada que, posteriormente, se identifica mediante espectrometría de masas. El protocolo se describe en el trabajo de Gabriel et al. (2009).

3.5. Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN)

Como se comentó en la Introducción, el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis permite evaluar el daño que se haya producido en el proceso de división celular *in vitro* a partir de lesiones previas existentes (en este estudio el daño se ha inducido en la etapa G0 del ciclo celular).

3.5.1. Cultivo de linfocitos y tratamiento con radiación ionizante

El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) se llevó a cabo con la aplicación de citocalasina-B y siguiendo el procedimiento estándar (Kirsch-Volders et al., 2003).

Los cultivos de linfocitos se realizaron colocando 0,5 mL de sangre heparinizada en tubos conteniendo 4.5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) suplementado con 15% de suero bovino fetal (PAA Laboratories), 1% de antibióticos penicilina y estreptomina (PAA Laboratories) y 1% de l-glutamina (PAA Laboratories).

Por cada muestra de sangre se establecieron cuatro cultivos. Dos de ellos se trataron con radiación ionizante a una dosis de 0,5 Gy de radiación gamma usando un irradiador IBL437C, tipo H, N° 701 (SCHERING CIS Bio International, Gif sur Yvette, Francia) en la Unitat Tècnica de Protecció Radiològica de la Universitat Autònoma de Barcelona. Todos los cultivos (tratados y no tratados) se estimularon con fitohemaglutinina (PHA) (Gibco San Diego CA, USA) inmediatamente antes de colocarse en la cámara de cultivo a 37 °C y 5% de CO₂. A las 44 h de cultivo se adicionaron 10 µL (3 mg/mL) de citocalasina-B (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a cada cultivo para una concentración final de 6 µg/mL.

3.5.2. Obtención de los linfocitos cultivados y preparación de portas

Luego de 72 h de cultivo, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 800 rpm. El sobrenadante se descartó y se adicionaron 10 mL de solución hipotónica

(KCl 0,075 M a 4 °C) durante 10 min. Una nueva centrifugación y descarte del sobrenadante permitió obtener los linfocitos para ser fijados con 5 mL de carnoy (una mezcla metanol: ácido acético (3:1 v/v)) adicionado lentamente mientras el tubo se agitaba suavemente. Para finalizar, se agregaron tres gotas de formaldehído. Dos lavados adicionales con carnoy permitieron obtener los linfocitos limpios y suspendidos en un volumen menor a 1 mL.

De cada tubo de cultivo se prepararon 2 portas colocando dos gotas (de los linfocitos cosechados) en cada una de ellas. El secado fue casi inmediato; sin embargo, la tinción se realizó al día siguiente usando Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) al 10% en un tampón fosfato (pH 6,8) por 7 min.

3.5.2.1. Evaluación de la proliferación celular

Para evaluar la proliferación celular se contaron 500 células identificándose el número de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas (1, 2, 3 y 4 núcleos respectivamente), independientemente de la presencia o ausencia de micronúcleos. La proliferación celular se cuantificó usando el parámetro CBPI (cytokinesis-block proliferation index, índice de proliferación celular) para la técnica con bloqueo de citocinesis establecido según la fórmula de Surrallés y Natarajan (1997)

$$CBPI = (NI + 2NII + 3[NIII + NIV]) / 500$$

Siendo NI, NII, NIII y NIV las células con 1, 2, 3 y 4 núcleos, respectivamente.

Una disminución significativa en el valor del CBPI se consideró un indicador de efecto citotóxico.

3.5.3. Recuento de micronúcleos

Para detectar los niveles de daño en el DNA se contaron, por cada muestra y para todos los tipos de cultivo (no irradiados e irradiados), un total de 1000 células binucleadas que presentaban una buena preservación del citoplasma. Se calculó la proporción de estas células que presentaban micronúcleos (BNMN) teniendo en cuenta los criterios de análisis estándar establecidos (Fenech et al., 2003).

De este recuento se obtuvieron 3 medidas de daño genético por cada muestra.

- a) Frecuencia basal de BNMN (BNMN 0 Gy)
Que corresponde a la frecuencia de BNMN en los cultivos que no se han tratado con RI.

- b) Frecuencia de BNMN después del tratamiento (BNMN 0,5 Gy)
Que corresponde a la frecuencia de BNMN obtenida en los cultivos que se trataron con 0,5 Gy de RI.

- c) Incremento de BNMN inducidos por el tratamiento (daño neto)
(Frecuencia de BNMN después del tratamiento con RI) - (Frecuencia basal de BNMN)

3.6. Análisis estadístico

Todas las variables cuantitativas se describieron como la media \pm desviación estándar, sin embargo para la comparación entre grupos o subgrupos, se indica el error estándar. Las variables cualitativas se describieron como frecuencias relativas. La normalidad de la distribución de las variables cuantitativas se evaluó usando el test de Kolmogorov-Smirnov con corrección de Lilliefors. Así, la comparación de las variables por grupos se realizó usando los test estadísticos t-Student (para variables con distribución normal) o Mann-Whitney-Wilcoxon (para variables que no tienen una distribución normal). Adicionalmente, se empleó el test de Welch cuando las variables tuvieron una distribución normal pero no se tuvo en cuenta la varianza. Las variables cualitativas por grupos se compararon usando el test χ^2 de Pearson. Todos los análisis estadísticos, así como la elaboración de gráficos, se llevaron a cabo usando los programas SPSS 17.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) y R (R Development Core Team, <http://www.R-project.org>) en GNU/Linux. Los estudios de asociación SNPs-cáncer de tiroides y SNPs-daño en el DNA se llevaron a cabo con el uso de la herramienta web SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) cuyo funcionamiento y manejo se explica en el trabajo de Solé et al. (2006).

Las frecuencias alélicas se calcularon para cada locus en cada grupo. Posteriormente, se usó el test de χ^2 con un grado de libertad para conocer si las frecuencias genotípicas se encontraban o no en equilibrio de Hardy-Weinberg en la población control. El equilibrio Hardy-Weinberg se calculó usando las frecuencias genotípicas observadas y las frecuencias genotípicas esperadas (a

partir de las frecuencias alélicas).

La asociación de los polimorfismos con el cáncer de tiroides entre los grupos de pacientes y controles se llevó a cabo mediante una regresión logística teniendo en cuenta el género y la edad como covariables. La estimación de odds ratio (OR) para cada genotipo respecto al genotipo de referencia (el más frecuente) se usó como medida de asociación siguiendo cinco posibles modelos de herencia (codominante, dominante, sobredominante, recesiva y log-aditiva).

La asociación de los haplotipos también se llevó a cabo mediante la estimación de OR para los SNPs en los genes *XRCC1* y *WDR3*, previo cálculo del desequilibrio de ligamiento. La estimación de las frecuencias haplotípicas se realizó usando el algoritmo esperanza-maximización.

Para la interacción génica, se usó el modelo codominante para los genes *OGG1 – XRCC1* y *XRCC2 – XRCC3* debido a la participación en las rutas de reparación por escisión de base (BER) y recombinación homóloga (HR), respectivamente.

Para evaluar la asociación entre los polimorfismos y los valores de daño en el DNA, también se usó la herramienta web SNPStat, pero mediante una regresión lineal múltiple, teniendo en cuenta el género, la edad y el diagnóstico como covariables como se sugiere para la evaluación de micronúcleos (Dhillon et al., 2011). Como medida de asociación se usó la diferencia de la media de micronúcleos para cada genotipo, siendo la referencia el genotipo más frecuente.

4. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo de Tesis se han plasmado en cuatro artículos, dos de ellos ya publicados, mientras que de los dos restantes uno se encuentra en la fase de segunda revisión y el otro está a la espera de los comentarios de los revisores y del editor. Todo este material se adjunta en cuatro anexos correspondientes a los artículos mencionados anteriormente y cuyo orden está en función del desarrollo de la Tesis.

Anexo 1:

Association studies of *OGG1*, *XRCC1*, *XRCC2* and *XRCC3* polymorphisms with differentiated thyroid cancer.

García-Quispes WA, Pérez-Machado G, Akdi A, Pastor S, Galofré P, Biarnés F, Castell J, Velázquez A, Marcos R.

Mutat. Res. (2011) 709-710: 67-72.

Anexo 2:

Are thyroid cancer patients sensitive to ionising radiation?

García-Quispes WA, Pérez-Machado G, Sandoval B, Pastor S, Velázquez A, Galofré P, Biarnés J, Castell J, Marcos R.

Int. J. Radiat. Biol. (2011) 87: 932-935.

Anexo 3:

Influence of DNA repair gene variants on the micronucleus frequency in thyroid cancer patients.

García-Quispes W.A., Pastor S., Galofré P., Biarnés F., Castell J., Velázquez A., Marcos R.

Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis (enviado)

Anexo 4:

Possible role of the *WDR3* gene on genome stability in thyroid cancer patients

Wilser Andrés García-Quispes, Susana Pastor, Pere Galofré, Josefina Biarnés, Joan Castell, Antonia Velázquez, Ricard Marcos

PLoS ONE (segunda revisión)

Así, a lo largo del desarrollo de esta sección se irá haciendo referencia al contenido de los mencionados artículos.

4.1. Asociación entre polimorfismos de los genes *OGG1*, *XRCC1*, *XRCC2* y *XRCC3* con el cáncer diferenciado de tiroides

Dado que los genes de reparación desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la integridad del genoma, alteraciones en estos genes pueden ser críticas para el desarrollo y progresión del cáncer. Así, aquí evaluamos la posible influencia de cinco polimorfismos en cuatro genes de reparación (rs1052133 en *OGG1*; rs25487 y rs25489 en *XRCC1*; rs3218536 en *XRCC2* y rs1799796 en *XRCC3*) sobre el riesgo de desarrollar cáncer de tiroides.

4.1.1. Características generales de la población

La descripción de las características de las personas que participaron en este estudio (402 pacientes con cáncer de tiroides y 479 personas como grupo control) se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Características generales de los grupos control (n=479) y pacientes (n=402)

	Controles n (%)	Pacientes n (%) ^a	Papilar n (%)	Folicular n (%)
Total	479	402	339 (84,3)	59 (14,7)
Varones	196 (40,9)	90 (22,4)	75 (22)	14 (24)
Mujeres ^b	283 (59,1)	312 (77,6)	264 (78)	45 (76)
Edad ^c media ± DE	45,99 ± 17,26	47,06 ± 15,49	46,34 ± 15,08	50,66 ± 17,08
Varones	49,95 ± 18,06	47,44 ± 14,24	46,67 ± 14,01	51,86 ± 15,68
Mujeres	43,25 ± 16,15	46,94 ± 15,85	46,25 ± 15,39	50,29 ± 17,65
Edad al diagnóstico media ± DE	---	41,73 ± 15,20	40,88 ± 14,65	46,21 ± 16,82
Consumo de tabaco ^d				
Fumador	107 (22,3)	62 (15,4)		
No fumador	309 (64,5)	184 (45,8)		
Ex fumador	3 (0,6)	32 (8,0)		
Sin respuesta	60 (12,5)	124 (30,8)		

DE, Desviación estándar

^aCuatro pacientes (1%) referidos como CDT pero sin clasificación histopatológica.

^bDiferencias en la proporción entre controles y pacientes ($P < 0,0001$)

^cDiferencias entre grupo de controles y pacientes ($P = 0,089$)

^dDiferencias en la proporción entre controles y pacientes ($P = 0,8826$)

No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos con respecto a la edad (media de edad 45,99 y 47,06 en controles y pacientes, respectivamente); sin embargo, las mujeres están sobrerrepresentadas en el grupo

de pacientes (77,6%) frente al grupo control (59,1%). Esto es reflejo de la mayor incidencia del CT entre las mujeres.

4.1.2. Análisis de asociación

En nuestro estudio, la frecuencia de los alelos menos frecuentes (variantes) se presenta en un rango de 0,05 a 0,36 en controles. Para las variantes rs1052133 (326Cys), rs25487 (399Gln) y rs3218536 (188His) la frecuencia es similar a lo encontrado en la base de datos NCBI para la población europea (Single Nucleotide Polymorphism Database for European Populations), sin embargo, se observan ligeras diferencias en las variantes rs25489 (280His) y rs1799796 (IVS7-14G).

La frecuencia alélica y genotípica para los cinco SNPs, así como los resultados de la asociación con el cáncer de tiroides se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs seleccionados y su asociación con el cáncer diferenciado de tiroides

Gen	SNP Cambio de aminoácido	MAF		Genotipo	Control n (%)	Pacientes n (%)	OR (95% CI) ^a	P
		C	P					
OGG1	rs1052133 Ser326Cys	0,21	0,21	C/C	294 (63)	253 (63,7)	1,00 (Referencia)	0,74
				C/G	154 (33)	125 (31,5)	0,97 (0,72-1,31)	
				G/G	19 (4,1)	19 (4,8)	1,28 (0,65-2,51)	
XRCC1	rs25489 Arg280His	0,05	0,08 ^b	G/G	426 (90,1)	337 (84,7)	1,00 (Referencia)	0,087 ^c
				G/A	44 (9,3)	58 (14,6)	1,61 (1,05-2,46)	
				A/A	3 (0,6)	3 (0,8)	1,22 (0,24-6,24)	
				G/A+A/A	47 (9,9)	61 (15,3)	1,58 (1,05-2,40)	0,029 ^d
XRCC1	rs25487 Arg399Gln	0,36	0,36	G/G	196 (41,4)	153 (39,6)	1,00 (Referencia)	0,47
				G/A	212 (44,7)	186 (48,2)	1,17 (0,87-1,57)	
				A/A	66 (13,9)	47 (12,2)	0,94 (0,61-1,46)	
XRCC2	rs3218536 Arg188His	0,1	0,11	G/G	383 (80,3)	314 (79,1)	1,00 (Referencia)	0,75
				G/A	90 (18,9)	79 (19,9)	1,12 (0,80-1,59)	
				A/A	4 (0,8)	4 (1)	1,36 (0,33-5,63)	
XRCC3	rs1799796 IVS7-14	0,25	0,23	A/A	267 (55,9)	236 (59,3)	1,00 (Referencia)	0,34
				A/G	179 (37,5)	145 (36,4)	0,94 (0,71-1,25)	
				G/G	32 (6,7)	17 (4,3)	0,63 (0,34-1,18)	

C, Controles; P, Pacientes; MAF, frecuencia del alelo menos frecuente.

^aOR, odds ratio ajustados por género y edad.

^b χ^2 : P= 0,0238 entre controles y pacientes para rs25489

^c: P para el modelo codominante y dominante, respectivamente

La asociación de los SNPs se calculó siguiendo un modelo de regresión logística teniendo en cuenta la edad y el género como covariables. El modelo codominante se muestra para los cinco SNPs, aunque adicionalmente se muestra el modelo dominante para el rs25489 (Arg280His) del gen *XRCC1*, debido a que se encontró una asociación significativa para esta variante en este modelo. Modelo codominante (OR = 1,61; 95% CI 1,05–2,46; $P= 0,087$), modelo dominante (OR = 1,58; 95% CI 1,05–2,46; $P= 0,027$). Los valores totales de este análisis se encuentran reflejados en los anexos 5 al 7.

Cuando el análisis se realizó con una estratificación por diagnóstico histopatológico, no se encontró asociación estadística para ninguno de los SNPs, ni tampoco para rs25489 (Tabla 6).

4.1.3. Asociación de haplotipos del gen *XRCC1*

Además del análisis de genotipos, se procedió a realizar el análisis de haplotipos para tratar de encontrar asociación con alguna combinación. De este análisis se predijeron tres haplotipos con una frecuencia mayor a 0,01 mediante el algoritmo de esperanza-maximización (Tabla 7). Los resultados de la asociación se muestran en la Tabla 8, donde el haplotipo 3 (GA) muestra un incremento de riesgo (OR = 1,53; 95% CI 1,03–2,28; $P= 0,034$); aunque, teniendo en cuenta el valor de significación global ($P= 0,1$) es probable que el efecto sea dado únicamente por la presencia del alelo A de rs25489 (Tabla 5).

4.1.4. Interacción entre SNPs

Teniendo en cuenta la participación en las rutas de reparación, se realizó un análisis de interacción entre los polimorfismos de los genes *OGG1/XRCC1* (que intervienen en la ruta de reparación por escisión de bases) y *XRCC2/XRCC3* (que lo hacen en la ruta de reparación por recombinación homóloga). Los resultados se muestran en las Tablas 9 y 10. Sólo la interacción entre *XRCC2* y *XRCC3* (rs3218536 y rs1799796, respectivamente) muestra un efecto en la disminución del riesgo (OR = 0,12; 95% CI 0,01–0,96; $P= 0,051$).

Tabla 6. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs25489 (Arg280His) del gen *XRCC1* y su asociación con las variantes papilar y folicular de cáncer de tiroides

Gen	SNP	Genotipo	Controles n (%)	Papilar n (%)	OR (95% CI) ^a	P	Folicular n (%)	OR (95% CI) ^a	P
<i>XRCC1</i>	rs25489 Arg280His	G/G	426 (90,1)	288 (85,5)	1,00 (Referencia)	0,17 ^b	48 (81,4)	1,00 (Referencia)	0,11 ^b
		G/A	44 (9,3)	46 (13,7)	1,52 (0,97-2,39)		11 (18,6)	2,07 (0,99-4,33)	
		A/A	3 (0,6)	3 (0,9)	1,46 (0,28-7,49)		0 (0)	0,00 (0,00-NA)	
		G/A+A/A	47 (9,9)	49 (14,5)	1,52 (0,98-2,35)	0,06 ^c	11 (18,6)	1,91 (0,92-3,97)	0,099 ^c

^aOR, odds ratio ajustado por género y edad.

^{b,c}P para los modelos dominante y codominante, respectivamente.

Tabla 7. Haplotipos predichos mediante el algoritmo de esperanza-maximización

Haplotipo	rs25487	rs25489	Frecuencia			
			Total	Controles	Pacientes	Acumulada
1	G	G	0,5722	0,584	0,5584	0,5722
2	A	G	0,3625	0,363	0,362	0,9348
3	G	A	0,0652	0,053	0,0796	1
4	A	A	0	0	0	1

Tabla 8. Análisis de asociación entre los haplotipos del gen *XRCC1*

Haplotipo	rs25487	rs25489	Frecuencia	OR (95% CI)	P
1	G	G	0,5719	1,00 (Referencia)	---
2	A	G	0,3627	1,07 (0,87 - 1,32)	0,52
3	G	A	0,0655	1,53 (1,03 - 2,28)	0,034

Asociación global (P= 0,1)

Tabla 9. Odds ratios (OR) para la interacción entre *XRCC1* (rs25489, Arg280His) y *OGG1* (rs1052133, Ser326Cys)

<i>XRCC1</i> rs25489 Arg280His	<i>OGG1</i> rs1052133 Ser326Cys	Controles n (%)	Pacientes n (%)	OR (95% CI)^a
GG	CC	265 (57,5)	213 (53,7)	1,00 (Referencia)
	CG	136 (29,5)	109 (27,5)	1,03 (0,75-1,41)
	GG	14 (3,0)	14 (3,5)	1,37 (0,63-2,99)
GA	CC	24 (5,2)	38 (9,6)	1,85 (1,06-3,21)
	CG	14 (3,0)	15 (3,8)	1,35 (0,63-2,91)
	GG	5 (1,1)	5 (1,3)	1,33 (0,37-4,81)
AA	CC	2 (0,4)	2 (0,5)	1,32 (0,18-9,89)
	CG	1 (0,2)	1 (0,3)	1,00 (0,06-16,18)
	GG	0 (0,0)	0 (0,0)	---

Interacción ($P= 0,81$)

^aOR, odds ratio ajustado por género y edad.

Tabla 10. Odds ratios (OR) para la interacción entre *XRCC2* (rs3218536, Arg188His) y *XRCC3* (rs1799796, IVS7-14A>G)

<i>XRCC2</i> Arg188His rs3218536	<i>XRCC3</i> IVS7-14A>G rs1799796	Controles n (%)	Pacientes n (%)	OR (95% CI)^a
GG	AA	217 (45,5)	188 (47,4)	1,00(Referencia)
	AG	143 (30)	111 (28,0)	0,92 (0,66-1,26)
	GG	23 (4,8)	15 (3,8)	0,82 (0,41-1,65)
GA	AA	47 (9,9)	45 (11,3)	1,16 (0,73-1,84)
	AG	34 (7,1)	33 (8,3)	1,25 (0,73-2,13)
	GG	9 (1,9)	1 (0,3)	0,12 (0,01-0,96)
AA	AA	3 (0,6)	3 (0,8)	1,27 (0,24-6,62)
	AG	1 (0,2)	0 (0)	0,00
	GG	0 (0)	1 (0,3)	---

Interacción ($P= 0,051$)

^aOR, odds ratio ajustado por género y edad

De los cinco polimorfismos en los genes de reparación evaluados, sólo la presencia del alelo 280His (rs25489) del gen *XRCC1* supone un incremento de riesgo para el desarrollo de cáncer de tiroides diferenciado bajo un modelo dominante. Además, la presencia del alelo 188His (rs3218536) del gen *XRCC2* y el alelo G (rs1799796) del gen *XRCC3* parecen tener un efecto combinado para disminuir el riesgo de desarrollar cáncer de tiroides cuando se realiza un análisis de interacción.

4.2. Sensibilidad a la radiación ionizante de los pacientes con cáncer de tiroides

Dada la asociación entre la exposición a la radiación ionizante y aparición del CT, se postuló que quizás los pacientes con CT representan un grupo con una especial sensibilidad a la radiación ionizante. Para desarrollar esta hipótesis se realizaron los trabajos indicados en el anexo 2.

4.2.1. Características generales de la población

Este estudio se llevó a cabo con 53 pacientes y con 50 controles. Las características generales de estos grupos se muestran en la Tabla 11. No se han encontrado diferencias significativas con respecto a la edad y género entre ambos grupos.

Tabla 11. Características generales de controles (n=50) y pacientes con cáncer de tiroides (n=53)

	Controles n (%)	Pacientes n (%)	P
Género			
Mujeres	23 (46,0)	26 (49,1)	0,756 ^a
Varones	27 (54,0)	27 (50,9)	
Edad			
media ± DE	51,60 ± 14,40	51,42 ± 14,52	0,948 ^b
Diagnóstico			
Papilar	---	46 (86,8)	
Folicular	---	7 (13,2)	

DE: Desviación estándar
^aχ² entre controles y pacientes
^btest de Student

4.2.2. Niveles de daño

El daño en el DNA se ha indicado como la frecuencia absoluta de células binucleadas con uno o más micronúcleos (BNMN) y los resultados obtenidos se indican en la Tabla 13 y en la Figura 6.

Como se observa, los niveles de daño tanto espontáneo como después de la irradiación fueron ligeramente superiores en el grupo de pacientes, aunque los valores de P no indican la existencia de diferencias significativas. También se observó que el daño inducido (incremento o daño neto) por la radiación ionizante

no muestra diferencias significativas entre ambos grupos.

En el grupo de controles, pero no en el de pacientes, se encontró una influencia del género ($P= 0,006$) y de la edad ($P= 0,001$) para la frecuencia basal de BNMN bajo un modelo lineal generalizado (Tabla 12). Las mujeres de los grupos controles y pacientes presentan una frecuencia alta de BNMN (basal y tras la irradiación (Tabla 14), aunque la diferencia sólo es estadísticamente significativa entre las mujeres y varones del grupo control para el nivel de daño basal.

Cuando el grupo de pacientes se estratificó según el diagnóstico histopatológico, los pacientes con tipo folicular mostraron mayores niveles de daño espontáneo con respecto a los pacientes con tipo papilar. Esto valores, junto con los obtenidos tras la irradiación así como el valor neto de daño, se muestran en la Tabla 15.

Tabla 12. Factores que afectan la frecuencia de BNMN

Grupo	Factor	F	P (>F)
Controles	Edad	11,927	0,001
	Género	8,231	0,006
Pacientes	Edad	0,4532	0,504
	Género	2,849	0,098

Tabla 13. Daño en el DNA entre grupos

Daño	Controles (media ± EE)	Pacientes (media ± EE)	P
BNMN	6,60 ± 0,623	7,55 ± 0,781	0,349 ^a
BNMN (0,5 Gy)	31,64 ± 2,024	32,94 ± 2,115	0,658 ^a
Incremento de BNMN (neto)	25,10 ± 1,916	25,43 ± 1,866	0,901 ^b

EE: Error estándar
^atest de Wilcoxon
^btest de Welch

Figura 6. Valores de daño basal, tras la irradiación e incremento de daño para los grupos de controles y pacientes

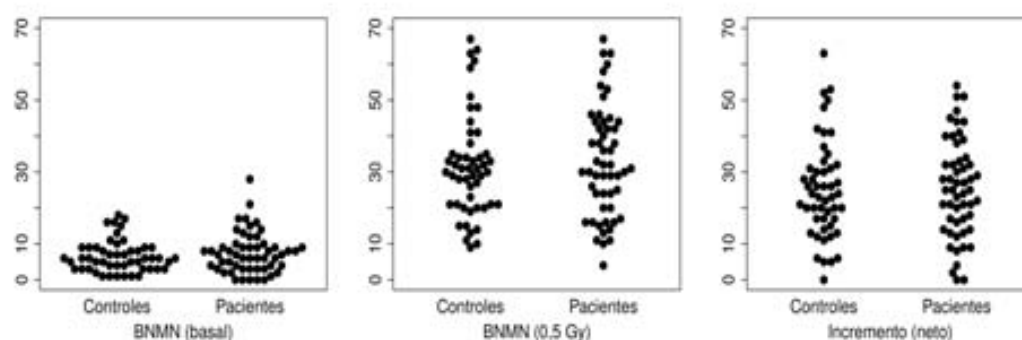


Tabla 14. Daño en el DNA por género

	Controles (media ± EE)	<i>P</i> ^a	Pacientes (media ± EE)	<i>P</i> ^a	<i>P</i> ^b
BNMN					
Mujeres	8,35 ± 0,934	0,008 ^c	8,88 ± 1,225	0,118 ^c	0,896 ^c
Varones	5,11 ± 0,734		6,26 ± 0,938		0,466 ^c
BNMN (0,5 Gy)					
Mujeres	34,61 ± 2,749	0,067 ^c	33,96 ± 3,265	0,642 ^d	0,880 ^d
Varones	29,11 ± 2,883		31,96 ± 2,760		0,303 ^c
Incremento de BNMN (neto)					
Mujeres	26,39 ± 2,869	0,540 ^d	25,15 ± 2,846	0,885 ^d	0,761 ^d
Varones	24,00 ± 2,603		25,70 ± 2,484		0,638 ^d

EE: Error estándar
^aMujeres vs Varones
^bControles vs Pacientes
^ctest de Wilcoxon
^dtest de Welch

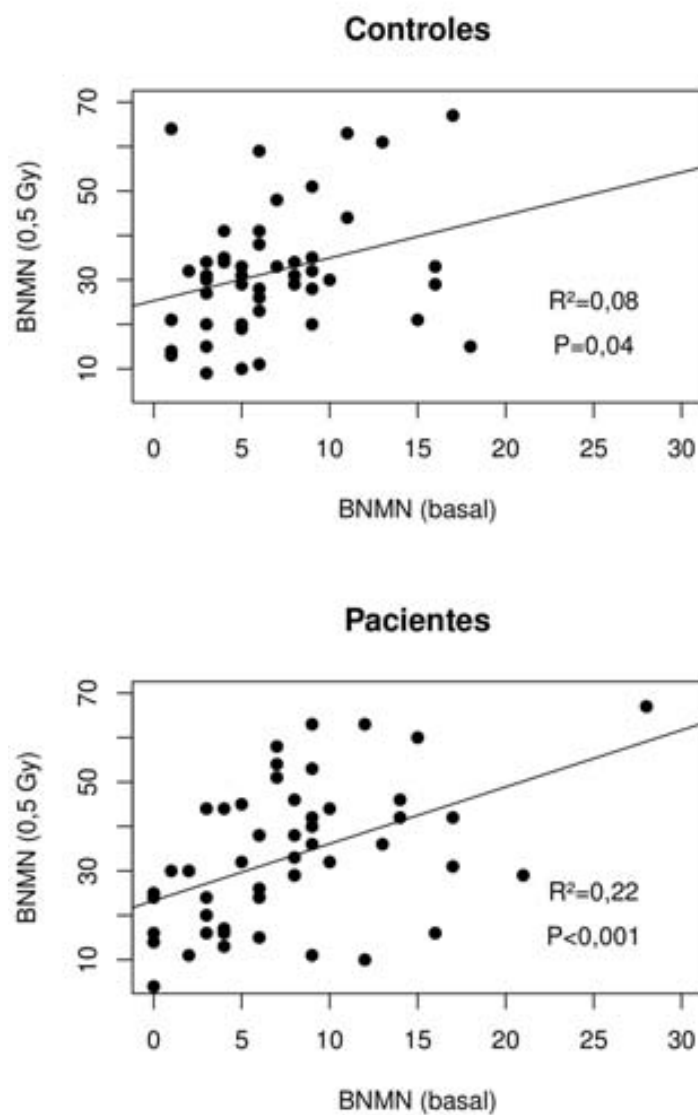
Tabla 15. Daño en el DNA por tipo de diagnóstico

Daño	Papilar (n=46) (media ± EE)	Folicular (n=7) (media ± EE)	<i>P</i>
BNMN	7,15 ± 0,823	10,14 ± 2,324	0,179 ^a
BNMN (0,5 Gy)	33,13 ± 2,326	31,71 ± 5,158	0,808 ^b
Incremento de BNMN (neto)	26,02 ± 2,010	21,57 ± 5,149	0,444 ^b

EE, Error estándar
^atest de Wilcoxon
^btest de Welch

A pesar de los resultados negativos encontrados, un análisis de correlación entre los valores de daño espontáneo y los obtenidos tras la irradiación muestra una relación directa entre ambas variables, tanto en el grupo de controles ($R^2=0,08$; $P=0,04$) como en el de pacientes ($R^2=0,22$; $P<0,001$) (Figura 7), lo que indicaría un cierto sustrato genético modulando la respuesta.

Figura 7. Correlación entre el nivel de daño basal y el tras la irradiación, en los grupos de controles y pacientes



El nivel de daño basal, medido como BNMN en cultivos de linfocitos, no es significativamente diferente entre el grupo de controles y pacientes. Tampoco se encuentran diferencias significativas para el daño tras una exposición a la radiación ionizante (0,5 Gy de radiación gamma, en la fase G0 del ciclo celular) entre el grupo de controles y de pacientes. Por otro lado, existe una correlación directa entre los niveles de daño basal y tras la irradiación, tanto en el grupo de controles como en el de pacientes, aunque esta tendencia es más acentuada en el grupo de pacientes.

4.3. Influencia de los polimorfismos en genes de reparación sobre el daño en el DNA, tanto basal como inducido por la radiación ionizante

Dado que los niveles de daño, tanto espontáneo como inducido, dependen de la eficacia de los mecanismos de reparación, en el siguiente artículo nos planteamos si alguna variante alélica en los genes inicialmente estudiados suponen alguna modificación en los niveles de daño genético.

4.3.1. Características generales de la población

Para este estudio se han utilizado muestras de 114 pacientes con cáncer de tiroides que corresponden a 92 mujeres (81%) y 22 varones (19%). La media de edad fue de $49,96 \pm 16,56$ años (media \pm DS). De acuerdo al diagnóstico histopatológico, 96 (86%) fueron diagnosticados como de tipo papilar mientras que 16 (14%) lo fueron como de tipo folicular.

4.3.2. Niveles de daño

Dado que factores como la edad y el género se han citado como factores con influencia sobre la frecuencia de BNMN, en este estudio analizamos el efecto de estas variables. El análisis de la influencia de covariables bajo un modelo lineal generalizado no encontró influencia del género ni del diagnóstico sobre los niveles de BNMN ($P= 0,216$; $P= 0,218$, respectivamente). Sólo la variable edad mostró una influencia significativa ($P < 0,001$). Las otras dos medidas de daño no se ven influenciadas por ninguno de los factores mencionados (Tabla 16). Sin embargo, siempre se tomaron en cuenta como factores de confusión cuando se realizó la comparativa entre genotipos.

Tabla 16. Factores que afectan los niveles de daño

Daño	Factor	F	P (>F)
BNMN	Edad	11,794	<0,001
	Género	1,545	0,216
	Diagnóstico	1,534	0,218
BNMN (0,5 Gy)	Edad	2,2886	0,1332
	Género	0,0238	0,8777
	Diagnóstico	0,3401	0,5610
Incremento (neto)	Edad	0,1192	0,7306
	Género	0,4559	0,5010
	Diagnóstico	1,3187	0,2533

Los niveles de daño obtenidos (basal, tras la irradiación, así como el incremento debido a la irradiación) total y estratificados por género y diagnóstico se muestran en la Tabla 17. Como se esperaba, los niveles de daño tras la irradiación se incrementaron con una media de 4,5 veces con respecto a los valores basales. Se encontró una relación directa entre los niveles de daño basal y tras la irradiación ($P < 0,001$; $R^2 = 0,28$) (Figura 8).

Figura 8. Correlación entre los el nivel de daño basal y tras la irradiación en 114 pacientes

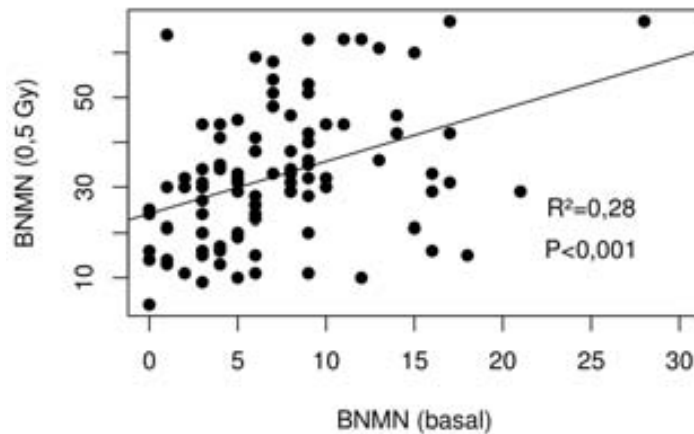


Tabla 17. Frecuencia de BNMN (basal, tras la irradiación e inducido) según género, edad y diagnóstico histopatológico

	n	BNMN basal (media±EE)	<i>P</i> ^a	BNMN 0,5 Gy (media ± EE)	<i>P</i> ^b	BNMN (neto) (media ± EE)	<i>P</i> ^b
Total	114	6,86 ± 0,56		31,33 ± 1,51		24,52 ± 1,29	
Género							
Mujeres	92	7,18 ± 0,65	0,350	31,17 ± 1,72	0,818	24,04 ± 1,45	0,436
Varones	22	5,50 ± 0,94		32,00 ± 3,11		26,50 ± 2,83	
Grupo de edad							
< 45	43	4,95 ± 0,63	0,003	29,00 ± 2,27	0,193	24,12 ± 2,10	0,712
≥ 45	70	7,93 ± 0,79		32,97 ± 2,00		25,07 ± 1,64	
Diagnóstico							
Papilar	98	6,62 ± 0,58	0,537	31,69 ± 1,52	0,659	25,09 ± 1,29	0,405
Folicular	16	8,31 ± 1,82		29,13 ± 5,53		21,01 ± 4,76	

^atest de Wilcoxon^btest t-Welch

Los niveles de daño para los genotipos de los diferentes SNPs evaluados se muestran en las Tablas 18, 19 y 20.

Las diferencias entre los niveles de daño se calcularon mediante un análisis de regresión lineal múltiple usando como referencia el genotipo homocigoto para el alelo más frecuente y, además, teniendo en cuenta la edad, el género y el diagnóstico como covariables.

Sólo la variante 326Cys en homocigocis (rs1052133) del gen *OGG1* muestra diferencias significativas para el nivel de daño basal ($P= 0,016$). Esta diferencia puede venir dada por el reducido tamaño muestral, dado que este grupo está formado por sólo tres pacientes homocigotos que, contrariamente, muestran una disminución del nivel de daño tras la irradiación así como en el incremento de daño (neto); aunque estas diferencias con respecto al genotipo de referencia no son estadísticamente significativas (Tablas 19 y 20). Información adicional con los modelos dominante, recesivo, sobredominante y log-aditivo se indican en los anexos 8 al 16 para las diferentes medidas de daño, así como su estratificación por diagnóstico.

Tabla 18. Diferencias en el nivel de daño basal de los genotipos de los SNPs evaluados

Gen	SNP Cambio de aminoácido	Genotipo	n	media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P
OGG1	rs1052133 Ser326Cys	C/C	75	6,15 ± 0,57	0 (Referencia)	0,016
		C/G	35	7,4 ± 1,16	1,05 (-1,18 - 3,27)	
		G/G	3	16 ± 6,93	9,49 (2,94 - 16,04)	
XRCC1	rs25489 Arg280His	G/G	98	7 ± 0,62	0 (Referencia)	0,44
		G/A	13	6,15 ± 1,1	-0,20 (-3,50 - 3,11)	
		A/A	2	1 ± 1	-5,21 (-13,21 - 2,79)	
XRCC1	rs25487 Arg399Gln	G/G	33	5,21 ± 0,76	0 (Referencia)	0,2
		G/A	63	7 ± 0,67	1,62 (-0,54 - 3,77)	
		A/A	13	7,85 ± 2,2	2,66 (-0,61 - 5,94)	
XRCC2	rs3218536 Arg188His	G/G	92	6,66 ± 0,61	0 (Referencia)	0,6
		G/A	19	7,11 ± 1,52	1,00 (-1,87 - 3,87)	
		A/A	2	10 ± 4	3,29 (-4,76 - 11,35)	
XRCC3	rs1799796 IVS7-14	A/A	72	7,44 ± 0,75	0 (Referencia)	0,38
		A/G	36	5,5 ± 0,84	-1,60 (-3,88 - 0,68)	
		G/G	5	6,8 ± 2,18	-0,00 (-5,16 - 5,15)	

EE, error estándar; ^aajustada por edad, género y diagnóstico

Tabla 19. Diferencias en el nivel de daño tras la irradiación entre los genotipos de los SNPs evaluados

Gen	SNP Cambio de aminoácido	Genotipo	n	media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P
OGG1	rs1052133 Ser326Cys	C/C	75	29,69 ± 1,69	0 (Referencia)	0,24
		C/G	35	35,51 ± 3,15	5,64 (-0,86 - 12,14)	
		G/G	3	28,33 ± 9,94	-0,75 (-19,89 - 18,40)	
XRCC1	rs25489 Arg280His	G/G	98	32,1 ± 1,63	0 (Referencia)	0,45
		G/A	13	28,46 ± 4,63	-2,96 (-12,38 - 6,46)	
		A/A	2	19,5 ± 8,5	-13,28 (-36,08 - 9,53)	
XRCC1	rs25487 Arg399Gln	G/G	33	28,39 ± 1,95	0 (Referencia)	0,47
		G/A	63	32,33 ± 2,29	3,77 (-2,93 - 10,46)	
		A/A	13	33,46 ± 3,49	5,00 (-5,20 - 15,19)	
XRCC2	rs3218536 Arg188His	G/G	92	31,34 ± 1,61	0 (Referencia)	0,97
		G/A	19	32,16 ± 4,53	0,35 (-7,87 - 8,57)	
		A/A	2	30,5 ± 15,5	-2,77 (-25,84 - 20,31)	
XRCC3	rs1799796 IVS7-14	A/A	72	31,6 ± 1,82	0 (Referencia)	0,71
		A/G	36	30,39 ± 2,97	-0,64 (-7,18 - 5,90)	
		G/G	5	37,2 ± 6,66	5,75 (-9,04 - 20,54)	

EE, error estándar; ^aajustada por edad, género y diagnóstico

Tabla 20. Diferencias en el nivel de daño inducido (neto) entre los genotipos de los SNPs evaluados

Gen	SNP Cambio de aminoácido	Genotipo	n	media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P
OGG1	rs1052133 Ser326Cys	C/C	75	23,61 ± 1,5	0 (Referencia)	0,11
		C/G	35	28,11 ± 2,48	4,53 (-0,98 - 10,04)	
		G/G	3	12,33 ± 6,23	-10,38 (-26,60 - 5,84)	
XRCC1	rs25489 Arg280His	G/G	98	25,13 ± 1,37	0 (Referencia)	0,6
		G/A	13	22,46 ± 4,42	-2,64 (-10,70 - 5,41)	
		A/A	2	18,5 ± 7,5	-8,05 (-27,57 - 11,46)	
XRCC1	rs25487 Arg399Gln	G/G	33	23,18 ± 1,63	0 (Referencia)	0,74
		G/A	63	25,41 ± 1,99	2,23 (-3,66 - 8,12)	
		A/A	13	25,62 ± 3,52	2,34 (-6,62 - 11,31)	
XRCC2	rs3218536 Arg188His	G/G	92	24,71 ± 1,4	0 (Referencia)	0,83
		G/A	19	25,16 ± 3,56	-0,54 (-7,55 - 6,46)	
		A/A	2	20,5 ± 11,5	-6,03 (-25,69 - 13,63)	
XRCC3	rs1799796 IVS7-14	A/A	72	24,18 ± 1,52	0 (Referencia)	0,66
		A/G	36	24,97 ± 2,58	1,01 (-4,56 - 6,59)	
		G/G	5	30,4 ± 6,02	5,74 (-6,87 - 18,35)	

EE, error estándar; ^aajustada por edad, género y diagnóstico

4.3.3. Asociación de haplotipos del gen XRCC1 y los niveles de daño

Dada la baja respuesta obtenida en el análisis de genotipos se pasó a analizar qué se obtenía si se tenían en cuenta a los haplotipos. Para ello, se realizó la asociación con los haplotipos correspondientes a los polimorfismos del gen XRCC1. Los resultados no muestran ninguna asociación entre las combinaciones haplotípicas y cualquiera de las medidas de daño (Tablas 21, 22 y 23).

Tabla 21. Diferencias entre el nivel de daño basal para los haplotipos del gen XRCC1

Haplotipo	rs25487	rs25489	Frecuencia	Diferencia (95% CI)	P
1	G	G	0,5144	0 (Referencia)	---
2	A	G	0,4104	1,76 (-0,14 - 3,65)	0,072
3	G	A	0,0752	-0,34 (-3,07 - 2,39)	0,81

Asociación haplotípica global (P= 0,81)

Tabla 22. Diferencias entre el nivel de daño tras la irradiación para los haplotipos del gen *XRCC1*

Haplotipo	rs25487	rs25489	Frecuencia	Diferencia (95% CI)	P
1	G	G	0,5165	0 (Referencia)	---
2	A	G	0,4082	2,53 (-2,64 - 7,71)	0,34
3	G	A	0,0752	-3,25 (-11,06 - 4,55)	0,42

Asociación haplotípica global ($P=0,42$)

Tabla 23. Diferencias entre el nivel de daño neto para los haplotipos del gen *XRCC1*

Haplotipo	rs25487	rs25489	Frecuencia	Diferencia (95% CI)	P
1	G	G	0,5172	0 (Referencia)	---
2	A	G	0,4076	1,07 (-3,24 - 5,38)	0,63
3	G	A	0,0752	-2,7 (-9,37 - 3,97)	0,43

Asociación haplotípica global ($P=0,43$)

4.3.4. Interacción entre SNPs y niveles de daño

De la misma manera en que se describió la utilidad de los estudios de interacción en el apartado 4.1.4., también en este estudio se procedió a realizar este análisis. Los resultados obtenidos se indican en los anexos 17 al 25 para cada medida de daño. Como se puede observar, no se ha encontrado ninguna interacción significativa entre las combinaciones en un modelo codominante con cualquiera de las medidas de daño.

No se encuentran diferencias significativas entre los niveles de daño basal y tras una exposición a radiación ionizante (0,5 Gy de radiación gamma, en la fase G0 del ciclo celular) y los genotipos de cuatro de los cinco polimorfismos evaluados. Así, sólo el genotipo homocigoto 326Cys/326Cys del polimorfismo rs1052133 del gen *OGG1* muestra diferencias significativas para el nivel basal de daño.

4.4. Posible rol del gen *WDR3* en el mantenimiento de la estabilidad genómica en pacientes con cáncer de tiroides

El interés de este estudio se basa en la fuerte asociación que hemos encontrado entre polimorfismos para este gen e incidencia de CT.

4.4.1. Características generales de la población

El último objetivo planteado en esta Tesis ha sido demostrar si el gen *WDR3* tiene algún papel en el mantenimiento de la inestabilidad genómica en los pacientes con CT. El origen de nuestro interés por el gen *WDR3* se basa en las evidencias encontradas previamente por Akdi et al. (2010) quienes encontraron una importante influencia de *WDR3* sobre el riesgo de padecer cáncer de tiroides papilar. Así, se decidió realizar un estudio sobre la posible influencia de tres polimorfismos de este gen (rs3754127, rs3765501, rs4658973) sobre los niveles de daño medidos como BNMN, siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 4.3. para los genes de reparación.

La muestra que se ha utilizado en este análisis estuvo compuesta por 115 pacientes de los cuales 93 (81%) fueron mujeres y 22 (19%) varones. La media de edad fue de $49,76 \pm 16,49$ (media \pm DE). Con respecto al diagnóstico histopatológico, 99 (86%) pacientes fueron clasificados como tipo papilar y 16 (4%) como tipo folicular.

4.4.2. Niveles de daño

En la Tabla 24 se muestran el nivel de daño basal y el obtenido tras la irradiación para los 115 pacientes; además, se muestran los valores estratificados por género y diagnóstico. Aunque la media de valores fue mayor en mujeres ($7,19 \pm 0,65$) que en varones ($5,51 \pm 0,94$), las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas ($P= 0,339$). Por otro lado, tampoco se encontraron diferencias significativas entre mujeres y varones para los valores obtenidos tras la irradiación ($31,19 \pm 1,70$ y $31,01 \pm 3,11$; respectivamente, $P= 0,833$). El nivel basal de daño en los pacientes con cáncer de tipo papilar muestra también un ligero incremento con respecto a los de tipo folicular ($6,64 \pm 0,57$ y $8,31 \pm 1,82$; respectivamente, $P= 0,559$). Tampoco se encuentran diferencias entre los niveles de daño obtenidos tras la irradiación entre ambos subgrupos ($31,71 \pm 1,50$ y $29,13 \pm 5,53$; respectivamente, $P= 0,553$).

Tabla 24. Frecuencia de daño basal y tras la irradiación según género y diagnóstico histopatológico

Pacientes (n)	BNMN (media ± EE)	P ^a	BNMN (0,5 Gy) (media ± EE)	P ^b
Total (115)	6,87 ± 0,55		31,35 ± 1,51	
Género				
Mujeres (93)	7,19 ± 0,65	0,339	31,19 ± 1,70	0,833
Varones (22)	5,51 ± 0,94		31,01 ± 3,11	
Diagnóstico				
Papilar (99)	6,64 ± 0,57	0,559	31,71 ± 1,50	0,553
Folicular (16)	8,31 ± 1,32		29,13 ± 5,53	

^atest de Wilcoxon; ^btest de Student

Los niveles de daño (basal y tras la irradiación), así como las diferencias entre genotipos se muestran en la Tablas 25 y 26, respectivamente. Se observa que los genotipos homocigotos y heterocigotos para todas las variantes muestran una ligera disminución con respecto a los genotipos homocigotos del alelo más frecuente. Aunque las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas en el nivel de daño basal, sí que lo son con respecto al nivel de daño tras la irradiación.

Tabla 25. Diferencias en el nivel de daño basal entre los genotipos de los SNPs del gen *WDR3*

SNP	Genotipo	n	BNMN (media ± EE)	Diferencia (95% CI) ^a	P
rs3754127	C/C	39	8,38 ± 1,25	0 (Referencia)	0,34 ^b
	C/T	55	6,07 ± 0,63	-1,77 (-4,13 - 0,59)	
	T/T	21	6,14 ± 0,97	-0,94 (-4,03 - 2,15)	
	C/T+T/T	76	6,09 ± 0,53	-1,55 (-3,78 - 0,68)	0,18 ^c
rs3765501	G/G	35	8,94 ± 1,36	0 (Referencia)	0,28 ^b
	G/A	43	6,42 ± 0,78	-1,84 (-4,47 - 0,78)	
	A/A	30	5,70 ± 0,72	-2,12 (-5,04 - 0,80)	
	G/A+A/A	73	6,12 ± 0,54	-1,95 (-4,35 - 0,44)	0,11 ^c
rs4658973	T/T	39	8,38 ± 1,25	0 (Referencia)	0,41 ^b
	T/G	53	6,13 ± 0,65	-1,65 (-4,06 - 0,76)	
	G/G	21	6,24 ± 0,95	-1,15 (-4,24 - 1,95)	
	T/G+G/G	74	6,16 ± 0,53	-1,51 (-3,78 - 0,75)	0,19 ^c

EE: error estándar; ^aajustada por edad, género y diagnóstico; ^{b,c}modelos codominante y dominante, respectivamente

Tabla 26. Diferencias en el nivel de daño tras la irradiación entre los genotipos de los SNPs del gen *WDR3*

SNP	Genotipo	N	BNMN (media ± EE)	Diferencia (95% CI) ^a	P
rs3754127	C/C	39	37,46 ± 2,91	0 (Referencia)	0,021b
	C/T	55	27,87 ± 1,77	-9,24 (-15,76 - -2,71)	
	T/T	21	29,1 ± 3,55	-7,77 (-16,31 - 0,77)	
	C/T+T/T	76	28,21 ± 1,6	-8,85 (-15,01 - -2,70)	0,0057 ^c
rs3765501	G/G	35	38,09 ± 3,17	0 (Referencia)	0,034 ^b
	G/A	43	29,14 ± 2,07	-8,77 (-16,03 - -1,51)	
	A/A	30	28,33 ± 2,73	-9,33 (-17,41 - -1,24)	
	G/A+A/A	73	28,81 ± 1,65	-8,98 (-15,61 - -2,36)	0,0091 ^c
rs4658973	T/T	39	37,46 ± 2,91	0 (Referencia)	0,025 ^b
	T/G	53	27,89 ± 1,82	-9,23 (-15,87 - -2,59)	
	G/G	21	29,71 ± 3,55	-7,30 (-15,84 - 1,23)	
	T/G+G/G	74	28,41 ± 1,64	-8,70 (-14,94 - -2,46)	0,0074 ^c

EE: error estándar; ^aajustada por edad, género y diagnóstico; ^{b,c}modelos codominante y dominante, respectivamente

Cuando se realizó el análisis estratificado de los pacientes, según el tipo de diagnóstico histopatológico, se encontró un patrón similar al de los distintos polimorfismos sobre el daño; así, las diferencias son significativas para el nivel de daño tras la irradiación, pero no para el nivel basal en ambos tipos de diagnósticos (Tablas 27 y 28). Información adicional con los modelos, recesivo, sobredominante y log-aditivo se indican en los anexos 26 al 34 para las diferentes medidas de daño, así como su estratificación por diagnóstico.

Tabla 27. Diferencias en el nivel de daño tras la irradiación entre los genotipos de los SNPs del gen *WDR3* para diagnóstico de tipo papilar

SNP	Genotipo	N	BNMN (media ± EE)	Diferencia (95% CI) ^a	P
rs3754127	C/C	32	37,84 ± 3,02	0 (Referencia)	0,024 ^b
	C/T	48	28,27 ± 1,64	-9,06 (-15,49 - -2,64)	
	T/T	19	30,05 ± 3,79	-6,58 (-14,85 - 1,68)	
	C/T+T/T	67	28,78 ± 1,58	-8,39 (-14,45 - -2,33)	0,0079 ^c
rs3765501	G/G	28	38,68 ± 3,36	0 (Referencia)	0,03 ^b
	G/A	38	28,63 ± 2	-9,68 (-16,87 - -2,50)	
	A/A	27	29,96 ± 2,75	-7,55 (-15,45 - 0,34)	
	G/A+A/A	65	29,18 ± 1,63	-8,83 (-15,37 - -2,29)	0,0096 ^c
rs4658973	T/T	32	37,84 ± 3,02	0 (Referencia)	0,024 ^b
	T/G	47	28,11 ± 1,67	-9,22 (-15,70 - -2,74)	
	G/G	19	30,74 ± 3,78	-6,18 (-14,41 - 2,05)	
	T/G+G/G	66	28,86 ± 1,6	-8,36 (-14,46 - -2,27)	0,0085 ^c

EE: error estándar; ^aajustada por edad, género y diagnóstico; ^{b,c}modelos codominante y dominante, respectivamente

Tabla 28. Diferencias en el nivel de daño tras la irradiación entre los genotipos de los SNPs del gen *WDR3* para diagnóstico de tipo folicular

SNP	Genotipo	N	BNMN (media ± EE)	Diferencia (95% CI) ^a	P
rs3754127	C/C	7	35,71 ± 9,04	0 (Referencia)	0,22 ^b
	C/T	7	25,14 ± 8,63	-27,74 (-58,54 - 3,05)	
	T/T	2	20 ± 10	-27,88 (-68,04 - 12,29)	
	C/T+T/T	9	24 ± 6,84	-27,78 (-55,54 - -0,02)	0,074 ^c
rs3765501	G/G	7	35,71 ± 9,04	0 (Referencia)	0,2 ^b
	G/A	5	33 ± 10,02	-21,63 (-57,96 - 14,70)	
	A/A	3	13,67 ± 8,57	-38,92 (-77,97 - 0,13)	
	G/A+A/A	8	25,75 ± 7,5	-28,67 (-62,46 - 5,12)	0,12 ^c
rs4658973	T/T	7	35,71 ± 9,04	0 (Referencia)	0,26 ^b
	T/G	6	26,17 ± 10,14	-29,32 (-64,57 - 5,93)	
	G/G	2	20 ± 10	-28,66 (-71,29 - 13,97)	
	T/G+G/G	8	24,62 ± 7,73	-29,10 (-60,26 - 2,06)	0,094 ^c

EE: error estándar; ^aajustada por edad, género y diagnóstico; ^{b,c}Modelos codominante y dominante, respectivamente

4.4.3. Asociación de haplotipos del gen *WDR3* y los niveles de daño

El análisis de haplotipos se realizó de la manera ya descrita para los polimorfismos de los genes de reparación en el punto 4.3.3, y los resultados se muestran en las tablas 29 y 30.

Tabla 29. Diferencias entre los niveles de daño basal para los haplotipos del gen *WDR3*

	rs3754127	rs3765501	rs4658973	Frecuencia	Diferencia (95% CI)	P
1	C	G	T	0,5226	0 (Referencia)	---
2	T	A	G	0,4217	-0,74 (-2,26 - 0,78)	0,34
3	C	A	T	0,0513	-1,96 (-5,15 - 1,23)	0,23
raros	*	*	*	0,0043	-5,79 (-16,98 - 5,39)	0,31

Asociación haplotípica global ($P=0,31$)

Tabla 30. Diferencias entre el nivel de daño tras la irradiación para los haplotipos del gen *WDR3*

	rs3754127	rs3765501	rs4658973	Frecuencia	Diferencia (95% CI)	P
1	C	G	T	0,5227	0 (Referencia)	---
2	T	A	G	0,4217	-4,9 (-9,16 - -0,63)	0,026
3	C	A	T	0,0512	-3,74 (-12,73 - 5,26)	0,42
raros	*	*	*	0,0043	4,21 (-27,15 - 35,58)	0,79

Asociación haplotípica global ($P=0,79$)

Los resultados indican que la presencia de los alelos variantes (en homocigocis o heterocigocis, así como en combinación haplotípica) de cualquiera de los polimorfismos evaluados (rs3754127, rs3765501, rs4658973) del gen *WDR3*, está asociada con los niveles bajos de daño en el DNA (BNMN) tras una exposición a radiación ionizante (0,5 Gy de radiación gamma), pero no con los niveles basales de daño.

5. DISCUSIÓN

Es importante conocer el papel que pueden suponer los factores ambientales o genéticos sobre el desarrollo del cáncer, a la hora de hacer predicciones de riesgo. En este contexto, nuestro Grupo viene trabajando en la búsqueda de factores genéticos que puedan suponer un riesgo para el desarrollo de cáncer de tiroides.

Aunque el cáncer es una patología compleja con respecto a su génesis, los mecanismos de reparación tienen una gran influencia sobre su desarrollo debido a su implicación en el mantenimiento de la integridad del genoma. Alteraciones en estos mecanismos generan inestabilidad genómica, que es una característica de muchos tipos de cánceres. Es por este motivo que parte de este estudio se ha dedicado a la evaluación de variantes en los genes de reparación y su posible papel sobre la modulación del riesgo de cáncer. También, nuestro grupo ha descrito la asociación entre el gen *WDR3* y el desarrollo de cáncer de tiroides (Akdi et al., 2010), motivo por el cual en este estudio se ha tenido en cuenta dicho gen para su evaluación con respecto a los niveles de daño en el DNA y su papel en la inestabilidad genómica.

La exposición a la radiación ionizante es el único factor ambiental que supone un riesgo importante en el desarrollo de cáncer de tiroides; sin embargo, no se han llevado a cabo estudios que permitan conocer si las personas que desarrollaron este tipo de cáncer presentan una sensibilidad especial a la radiación ionizante o si los niveles de daño, producidos por la exposición a la radiación ionizante, se ven influenciados por variantes genéticas.

5.1. Asociación entre polimorfismos de los genes *OGG1*, *XRCC1*, *XRCC2* y *XRCC3* con el cáncer diferenciado de tiroides

Aunque la utilización de genes de reparación en los estudios de asociación es algo frecuente, pocos estudios de tipo caso-control se han realizado para conocer el posible papel de los genes de reparación como moduladores del riesgo de CTD. Además, los pocos estudios llevados a cabo adolecen de tamaños muestrales pequeños, lo que repercute en la relevancia de los resultados encontrados. Así, algunos de los estudios publicados han trabajado con muestras inferiores a 50, por lo que no es de extrañar que los resultados sean contradictorios o no concluyentes con respecto a la implicación de estos genes en la modulación del riesgo de cáncer. En este contexto se tiene que resaltar el elevado número de nuestra muestra que, fuera de lo publicado por algunos

consorcios, resulta ser el tamaño mayor de todos los publicados. El número elevado de personas para cada uno de los grupos (479 controles y 402 pacientes) da a nuestros resultados una especial relevancia.

Respecto a los polimorfismos seleccionados habría que señalar que algunos polimorfismos utilizados en este estudio, como puede ser el caso de rs1052133 (Ser326Cys, *OGG1*) han sido ya utilizados en pacientes con cáncer de vesícula biliar, de pulmón, nasofaríngeo y de próstata por citar algunos ejemplos (Trzeciak et al., 2004; Weiss et al., 2005; Hung et al., 2005; Srivastava et al., 2009; Yuan et al., 2010) con resultados contradictorios para los diferentes tipos de cáncer, con respecto a su influencia en el riesgo de cáncer, así como respecto a su influencia sobre la reparación de lesiones (8-oxoguanina); pero no hay ningún estudio en pacientes con cáncer de tiroides.

Según la hipótesis mutacional sobre el origen del cáncer, es necesaria la presencia de un fenotipo mutador por lo que se puede pensar que alteraciones en el funcionamiento de las proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del DNA serían moduladores de este riesgo. Los efectos genotóxicos en el DNA, si no son reparados correctamente, incrementan la probabilidad de aparición de nuevas mutaciones que a su vez influirían en el desarrollo del cáncer.

En este escenario, sobre el papel de los genes en la etiología del cáncer, cobran especial relevancia los estudios de asociación que permiten relacionar un determinado genotipo con un incremento o disminución del riesgo de cáncer. Así, estos estudios nos pueden informar sobre el posible papel de un polimorfismo en la función de la proteína. Sin embargo, se requieren conseguir evidencias sobre la capacidad funcional (o de interacción con otras proteínas) del producto de un determinado alelo para poder probar esta hipótesis. Por ejemplo, con respecto al polimorfismo rs1052133 (*OGG1*), se ha visto que el daño en el DNA evaluado con el ensayo del cometa en personas expuestas a 2 Gy de radiación gamma muestran un daño residual bajo en las personas homocigotas para el alelo Ser326 en comparación con los heterocigotos u homocigotos para el alelo 326Cys (Aka et al., 2004). Este estudio se complementa con aquellos que muestran una baja actividad glicosilasa en personas homocigotas para el alelo 326Cys, lo que podría explicar el incremento de mutaciones bajo condiciones de estrés oxidativo (Bravard et al., 2009). Con respecto a nuestros resultados vemos que, a pesar de las evidencias sobre los cambios de funcionalidad en la proteína debido al cambio de aminoácido, los resultados obtenidos para este polimorfismo no muestran ningún tipo de asociación estadística por lo que hace a modulación del riesgo de

cáncer de tiroides (Tabla 5).

El gen *XRCC1* también participa en la reparación por la vía BER, como ocurre con *OGG1*. Los polimorfismos en este gen (incluyendo rs25487, rs25489) también se han evaluado en diversos estudios de asociación, lo que ha permitido realizar estudios de tipo meta-análisis para incrementar nuestro conocimiento acerca de su papel en el riesgo de padecer cáncer. Sin embargo, a pesar de todos los estudios realizados aun no se ha podido establecer de manera concluyente si se pueden considerar de riesgo las variantes estudiadas de este gen (Hu et al., 2005; Hung et al., 2005)

Por lo que hace al polimorfismo rs25487 (Arg399Gln), éste se ha descrito como un factor de disminución del riesgo de cáncer de tiroides a partir de un estudio con 250 pacientes de las ciudades de Chernobyl y Texas (Akulevich et al., 2009; Ho et al., 2009). Sin embargo, en otro estudio llevado a cabo en una población Taiwanesa de 283 pacientes de cáncer de tiroides no se encontró ninguna asociación (Chiang et al., 2008) lo que concordaría con nuestro estudio donde tampoco hemos encontrado asociación para este polimorfismo. En el estudio llevado a cabo en las poblaciones de Taiwan y Bielorrusia (citado arriba) tampoco se encontró asociación para otro polimorfismo como es el caso del rs25489 (Arg280His) del gen *XRCC1*; sin embargo, esto contrasta con los resultados de nuestro estudio (Tabla 5) donde se atribuye un riesgo incrementado de cáncer de tiroides a los portadores del alelo 280His bajo un modelo dominante (OR = 1,58; 95% CI 1,05–2,46; $P = 0,029$). Estos resultados contradictorios pueden estar en función de los diferentes grupos étnicos evaluados, así como de la existencia de factores ambientales como el consumo de alcohol y tabaco, así como el tipo de dieta u otros factores correspondientes al estilo de vida. Es posible que si se tuvieran en cuenta estos factores, en los análisis de asociación se podría dar otros resultados.

Como se ha comentado al inicio de este apartado, aunque los estudios de asociación no evalúan la función de la proteína, sí que permiten suponerla. Por esto, según nuestro estudio es probable que la presencia del alelo variante disminuya la eficacia de la actividad de la proteína resultante. Se han llevado a cabo estudios funcionales usando linfocitos que sugieren que la variante 280His disminuye la estabilidad genómica (Pastorelli et al., 2002; Kiuru et al., 2005); al tiempo que se ha observado que individuos heterocigotos para esta variante, presentan altos niveles de daño en el DNA luego de una exposición a cobalto y/o metales pesados (Mateuca et al., 2005). Asimismo, se ha visto que los portadores

de este alelo presentan un incremento en el número de intercambios entre cromátidas hermanas inducidas por bleomicina (Tuimala et al., 2002). Por lo que respecta a otros estudios de asociación, se ha visto que la presencia de este polimorfismo se encuentra asociada con un incremento en el riesgo de cáncer de mama (Loizidou et al., 2008) y de carcinoma bronquial (Schneider et al., 2008).

Un meta-análisis realizado por Hu et al. (2005) para distintos polimorfismos en el gen *XRCC1* con un total de 11.957 pacientes de cáncer y 14.174 individuos controles, llevado a cabo a partir de 38 estudios caso control, sugiere que el polimorfismo Arg280His debe considerarse como un biomarcador de susceptibilidad (Hu et al., 2005). Por lo tanto, teniendo en cuenta toda esta información que apoya la asociación encontrada en nuestro estudio, podemos decir que este polimorfismo actúa como modulador del riesgo de cáncer de tiroides.

Aparte del papel individual de los genes, la interacción entre genes puede incrementar el efecto de modulación del riesgo. Por ejemplo, la interacción de *XRCC1* con el gen *ADPRT* muestra un incremento del riesgo de cáncer de pulmón (Zhang et al., 2005), así como de estómago (Miao et al., 2006) y de tiroides (Chiang et al., 2008). Por tanto, para determinar si existía esta interacción entre nuestros genes, también hemos realizado estudios de interacción entre los genes que participan en la misma vía de reparación. Así, el análisis de interacción entre los genes *OGG1* y *XRCC1* se llevó a cabo para el modelo codominante y, aunque se encontró un efecto (para una combinación) éste es atribuible a la presencia del polimorfismo rs25489 (*XRCC1*) que ya daba positivo en el análisis individual, y no a la interacción con *OGG1* (Tabla 9; $P= 0,81$). Un evento similar se observó al evaluar la asociación con los haplotipos del gen *XRCC1* (Tabla 8, $P= 0,1$).

Por lo que respecta a los genes que intervienen en la vía de reparación HR, el gen *XRCC2* participa en la reparación de roturas de doble cadena por esta vía. El polimorfismo rs3218536 de este gen produce un cambio de aminoácido (Arg188His) lo que permite plantear la hipótesis de que este cambio puede afectar la función de la proteína, alterando la sensibilidad celular al daño en el DNA (Rafii et al., 2002). Para demostrar esta hipótesis se han llevado a cabo experimentos *in vitro* con células de pollo DT40 mutantes para *xrcc2* (*xrcc2*^{-/-}), viéndose que estas células son más tolerantes al daño causado por cisplatino cuando se transfectan con un cDNA portador de la variante (188His), en comparación con las transfectadas con un cDNA portador de Arg188 (Danoy et al., 2007). Otros estudios han mostrado una reducción significativa del riesgo de desarrollar cáncer

de ovario en las mujeres portadoras del alelo 188His (Auranen et al., 2005), aunque esto no se cumple para el riesgo de cáncer colorectal (Curtin et al., 2009) o de mama, según revela un reciente meta-análisis (Yu et al., 2010). Por lo que se refiere a su asociación con el cáncer de tiroides, un estudio llevado a cabo en una población portuguesa de 109 pacientes con cáncer de tiroides, no ha conseguido encontrar una asociación significativa (Bastos et al., 2009), lo que concordaría con los resultados encontrados por nosotros para este polimorfismo (Tabla 5).

El gen *XRCC3* también está involucrado en la reparación de roturas de doble cadena por recombinación homóloga. El polimorfismo rs1799796 se encuentra localizado en una región intrónica (IVS7-14) sin que ningún trabajo haya esclarecido su significado funcional, al menos hasta el momento. Sin embargo, aunque el polimorfismo se encuentra en una región no codificante, es posible que pueda afectar a los patrones de procesamiento del RNA mensajero. De hecho, hay enfermedades (o modificaciones en la severidad de las mismas) causadas por alteraciones en el patrón de procesado del RNA, como puede ser la fibrosis quística, el desorden bipolar, la diabetes tipo I y el asma, entre otras (Wang y Cooper, 2007). Para este polimorfismo se ha encontrado una asociación significativa entre el alelo variante y una reacción secundaria tardía al tratamiento con radiación en pacientes con tumores ginecológicos (De Ruyck et al., 2005). También, y como ocurre con muchos otros estudios de tipo caso-control, se encuentran resultados conflictivos para este polimorfismo; así, esta variante se ha citado como un factor que permite una disminución significativa del riesgo de desarrollar cáncer de mama en un estudio llevado a cabo con pacientes en el Reino Unido (Kuschel et al., 2002), aunque en un estudio similar con pacientes de cáncer de mama en Estados Unidos (Han et al., 2004) no se consiguió replicar este resultado. Finalmente, los resultados obtenidos en un meta-análisis, realizado con dos poblaciones, estadounidense y polaca, sugieren una asociación positiva, aunque débil, para el riesgo de cáncer de mama de este polimorfismo (García-Closas et al., 2006).

Otro polimorfismo estudiado del gen *XRCC3* es el Thr241Met el cual se ha descrito como un factor de riesgo de cáncer de tiroides en individuos homocigotos (Sturgis et al., 2005; Bastos et al., 2009). Este polimorfismo presenta un fuerte desequilibrio de ligamiento con el IVS7-14A>G (Jiao et al., 2008). A pesar de estos resultados nuestro estudio no muestra ningún tipo de asociación con el cáncer de tiroides (Tabla 5), y esta falta de asociación concordaría con lo encontrado al

realizar estudios con pacientes de cáncer de mama en estudios llevados a cabo con números de pacientes elevados (5.363, 1.109 y 37.369) (García-Closas et al., 2006; Loizidou et al., 2008 y Yu et al., 2010, respectivamente).

De igual manera que se planteó con los genes *OGG1* y *XRCC1*, también se ha llevado a cabo un análisis de interacción entre *XRCC2* y *XRCC3*. Este análisis se llevó a cabo dado que participan en la misma vía de reparación (Tabla 10). En este estudio se ha observado que cuando los alelos menos frecuentes (variantes) de ambos genes están presentes en las combinaciones se da un efecto en la disminución del riesgo (OR = 0,12; 95% CI 0,01–0,96; $P= 0,051$), aunque es probable que este efecto no sea relevante, debido al bajo número de individuos con esta combinación, obtenidos en nuestra población.

Como se ha comentado con los polimorfismos evaluados, las diferencias o conflictos encontrados para los resultados de los estudios de asociación (incluidos los resultados de este trabajo) se pueden explicar por diversos motivos que incluyen el grupo étnico evaluado, el uso de factores de confusión (covariables) como edad, género, consumo de alcohol y tabaco, dieta, etc en los análisis y el tamaño muestral, así como un adecuado establecimiento del grupo control. También se debe tener en cuenta que la evaluación de pocos polimorfismos puede no ser suficiente para atribuir una responsabilidad de los mismos sobre la modulación del riesgo de desarrollar cáncer ya que esto se produce a partir de una serie de diferentes eventos en un periodo amplio de tiempo.

En resumen, de los resultados de este estudio se desprende que el polimorfismo Arg280His del gen *XRCC1* se asocia con un riesgo de sufrir cáncer de tiroides.

5.2. Sensibilidad a la radiación ionizante en los pacientes con cáncer de tiroides

El vínculo entre desarrollo de cáncer y radiosensibilidad sugiere que la determinación de la radiosensibilidad cromosómica nos puede ayudar a conocer la propensión de un determinado individuo a desarrollar cáncer (Poggioli et al., 2010). Cada persona reacciona de manera diferente frente a un estímulo externo, iniciando una serie de respuestas biológicas que incluyen la activación de la maquinaria necesaria para la reparación del DNA (Sterpone et al., 2010). Se han usado distintos biomarcadores para evaluar los efectos genotóxicos ocasionados por la exposición a las radiaciones, ya sea de manera accidental o como resultado de la exposición terapéutica. Entre ellos destacan los cromosomas dicéntricos, la

formación de foci H2AX y los micronúcleos (Olive y Banath 2004; El-Zein et al., 2006; Volpato et al., 2008; Lassmann et al., 2010).

En nuestro estudio hemos usado el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (con el uso de citocalasina-B) debido a que es una técnica citogenética muy bien establecida y que los micronúcleos son un buen marcador de daño en el DNA (Znaor et al., 2003, El-Zein et al., 2006, Murgia et al., 2008). Adicionalmente, el ensayo de micronúcleos se considera un método muy sensible para la evaluación del daño producido por las radiaciones, tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro* (Ballardin et al., 2002; Hernández et al., 2006; Vral et al., 2011).

Son bastantes los estudios sobre inestabilidad genómica que se han realizado con grupos de pacientes con cáncer haciendo uso de los micronúcleos como marcadores de esta inestabilidad. Así, se ha demostrado que los pacientes con cáncer presentan una sensibilidad mayor frente a la exposición con radiación ionizante, en comparación con un grupo control (Scott et al., 1998, Scott, 2004; Mozdarani et al. 2005). Dado que la exposición a la radiación ionizante es el factor mejor establecido ligado al desarrollo de cáncer de tiroides, es sorprendente la falta de información que existe sobre la inestabilidad genómica de estos pacientes frente a la radiación. Esta limitada información es lo que nos motivó a llevar a cabo este estudio.

Lo primero que se observa es que existe una gran variación entre las personas tanto en lo que se refiere al daño (BNMN) basal, como en el resultado de la irradiación. Esto se observó tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes. Es posible que esta heterogeneidad pueda venir influenciada por el sustrato genético de cada persona, en el que se encontrarían genes involucrados en la reparación del DNA. Nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre ambos grupos para cualquiera de las medidas de daño usadas. Sin embargo, es importante notar que en este estudio el tratamiento con radiación se ha llevado a cabo cuando los linfocitos se encontraban en la etapa G0 del ciclo celular. Se ha citado que la sensibilidad a la radiación ionizante no es igual a lo largo del ciclo celular y que no hay una correlación significativa entre la sensibilidad en G0 y G2, debido a que es poco probable la ocurrencia de defectos en varias etapas del ciclo celular (Scott, 2004; Howe et al. 2005). Por lo tanto, los resultados mostrados aquí no permiten rechazar la hipótesis de una sensibilidad a la radiación ionizante diferente entre los pacientes con cáncer de tiroides ya que este evento podría ser evidente cuando la exposición ocurre en etapas del ciclo

celular diferentes a G0.

Dado que el nivel de daño en el DNA (basal o inducido) está modulado por la acción de proteínas implicadas en los mecanismos de reparación, polimorfismos en genes que las codifican pueden jugar un papel relevante en la sensibilidad individual (Iarmarcovai et al., 2008; Dhillon et al., 2011), aunque son muchos los estudios que no observan esta asociación (Curwen et al., 2011). Es posible que la sensibilidad a sufrir mayor o menor daño pueda depender de muchas variantes genéticas en combinación con los diversos eventos ambientales o metabólicos celulares.

La correlación positiva observada entre los valores basales de daño y los obtenidos tras la irradiación, tanto en el grupo de controles como en el grupo de pacientes, nos indica que existe una base genética que regula tanto los niveles de daño basal como la respuesta frente a la agresión sufrida por el DNA. Esta observación es importante ya que una evaluación previa *in vitro* puede dar información importante para la predicción del desarrollo de efectos secundarios cuando los pacientes siguen un tratamiento con radiación ionizante ya sea interna o externa.

5.3. Influencia de polimorfismos en genes de reparación sobre los niveles de daño en el DNA, basal e inducido por la radiación ionizante

Aunque en el estudio anterior no se encontró una sensibilidad especial a la radiación ionizante en los pacientes con cáncer de tiroides, sí que se observó una gran variabilidad en los niveles de daño, tanto basal como tras a una exposición a radiación ionizante. Nuestra hipótesis es que esta variación interindividual pueda ser el reflejo de una influencia genética diferencial y esta es la razón por la que se realizó un estudio comparativo entre los genotipos de los cinco polimorfismos de genes de reparación descritos anteriormente con respecto a las medidas de daño.

Nuestros resultados muestran que, de los cinco polimorfismos evaluados, sólo se encuentran diferencias significativas para los valores basales de daño genético entre los genotipos del polimorfismo rs1052133 (Ser326Cys) del gen *OGG1*. Este y otros polimorfismos se han evaluado en otros estudios de tipo caso-control encontrándose que la presencia del alelo 326Cys tiene un influencia en la modificación del riesgo de algunos tipos de cáncer, como puede ser el cáncer de pulmón asociado al hábito de fumar, el de vesícula biliar y la leucemia linfoblástica (Hung et al., 2005; Srivastava et al., 2009; Li et al., 2011). Sin embargo, no existe unanimidad entre los distintos estudios y, los resultados de un meta-análisis que

incluye un total de 4.963 pacientes con cáncer de mama y 4.777 controles, sugiere que este alelo juega un papel importante en la disminución del riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres europeas (Yuan et al., 2010). Hay que recordar que nuestro estudio previo (Anexo 1) no mostró asociación entre este alelo y el riesgo de desarrollar cáncer de tiroides.

Para explicar el posible papel de este polimorfismo en la modulación del riesgo de cáncer o su influencia sobre la capacidad funcional de la proteína se requieren estudios funcionales. Aunque no existen estudios *in vitro* para determinar la funcionalidad de la enzima OGG1, estudios llevados a cabo con células de trabajadores expuestos a dosis de radiación ionizante muestran que la reparación es más lenta en las células de los individuos portadores del alelo 326Cys (Aka et al., 2004). Además, en personas expuestas a pesticidas el daño en el DNA evaluado mediante el ensayo del cometa es mayor en personas heterocigotas u homocigotas para el alelo 326Cys que en las portadoras del alelo salvaje en homocigosis (Rohr et al., 2011). Lo mismo se ha encontrado en personas expuestas a cobalto (Mateuca et al., 2005). Estos estudios apoyan la hipótesis de que este polimorfismo modifica la eficiencia del mecanismo de reparación BER, ya sea de manera directa sobre la actividad de la proteína o sobre su interacción con otras proteínas involucradas en la misma ruta de reparación, como proponen algunos autores (Aka et al., 2004; Mateuca et al., 2005; Rohr et al., 2011). Así, estos estudios apoyan nuestros resultados en los que las personas homocigotas para el alelo 326Cys presentan valores de daño basal mayores que los mostrados por los otros genotipos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que este valor promedio corresponde a sólo tres personas, lo que podría suponer que la significación encontrada fuera resultado de este bajo tamaño muestral. Por otro lado, aunque tras la irradiación los tres individuos homocigotos continúan mostrando niveles más altos, estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas. Todo esto indica que para que nuestros resultados fueran concluyentes se requeriría obtener más individuos con el genotipo homocigoto recesivo y replicar los experimentos.

El cáncer es una patología compleja y es posible que distintas características de los pacientes como pueden ser el desarrollo de cánceres secundarios, información sobre la dieta y otros hábitos puedan actuar modulando el efecto de los genotipos en lo que se refiere a los valores de daño observado. Lamentablemente, la información obtenida de pacientes y controles respecto a estas posibles variables no existe.

Para explicar la falta de significación tras la irradiación podemos suponer que la frecuencia de micronúcleos observada tras la irradiación no representen el nivel real de daño ya que un excesivo daño en el DNA lleva a la célula a activar mecanismos de apoptosis (Aziz et al., 2012) de tal manera que las células más dañadas tras la irradiación, habrían sido eliminadas por apoptosis, dando valores de daño menores que los realmente inducidos. Para demostrar esto se deberían valorar los niveles de apoptosis al tiempo que trabajar con distintas dosis de radiación.

La evaluación de la interacción realizada también entre los genes *OGG1* y *XRCC1* no ha detectado diferencias significativas para las medidas de daño. De nuevo, es posible que el bajo número de personas para las diferentes combinaciones (en función de la baja frecuencia alélica de los polimorfismos evaluados) sea el responsable de la falta de asociación. Por lo que hace al gen *XRCC1*, se ha indicado que las personas portadoras del alelo 399Gln expuestas a la radiación ionizante presentan mayores valores de micronúcleos que las portadoras para el alelo salvaje (Angelini et al., 2005), aunque esto no coincide con lo encontrado en nuestro trabajo. En este contexto, hay que señalar que una revisión reciente incide en la aparente poca relevancia de los polimorfismos del gen *XRCC1* sobre la función proteica (Wilson et al., 2011). A pesar de esto, la mayoría de los estudios de asociación evidencia una cierta influencia del polimorfismo rs25489 (Arg280His) en la modulación del riesgo de cáncer, por lo que algunos autores lo han propuesto como un biomarcador de susceptibilidad (Hu et al., 2005).

Por lo que hace a *XRCC2* y *XRCC3*, éstas son proteínas involucradas en la reparación de roturas de doble cadena por el mecanismo de recombinación homóloga (HR) aunque su función específica no es del todo conocida. A pesar de nuestros resultados negativos, se han encontrado asociaciones positivas de los polimorfismos evaluados por nosotros (rs3218536 y rs1799796, de *XRCC2* y *XRCC3*, respectivamente) con una disminución en la supervivencia de pacientes con cáncer de páncreas (Li et al., 2006). Asimismo, otro polimorfismo en *XRCC3* (rs861539, Thr241Met) que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con rs1799796 también se ha asociado con el riesgo de desarrollo de leucemia mieloide aguda (Liu et al., 2008). Desafortunadamente, existe poca información sobre la función de estos genes así como de la influencia de los polimorfismos en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga. Aunque se ha descrito que el polimorfismo rs3218536 (*XRCC2*) parece ser una variante importante en la

resistencia frente al daño por cisplatino (Danoy et al., 2007), nuestros resultados no han evidenciado alguna asociación con el nivel de daño (basal o tras la irradiación).

Aunque el polimorfismo rs1799796 (ISV7-14A>G) del gen *XRCC3* no supone un cambio funcional aparente en la proteína, es posible que pueda tener influencia sobre el procesado alternativo (Wang et al., 2008). Este alelo se ha asociado con el riesgo de desarrollar reacciones tardías a la radioterapia en pacientes con tumores ginecológicos, indicando así su implicación en la respuesta celular frente a la radiación (De Ruyck et al., 2005). Aunque nuestros resultados no han mostrado efectos significativos para este polimorfismo sí que se observa que los niveles de daño tras la irradiación son mayores en los individuos con el genotipo GG (n=5), lo que podría indicar algún tipo de función en la modulación del daño tras la irradiación.

El daño en el DNA que permanece sin reparar a lo largo del ciclo celular, incrementa la probabilidad de bloquear la replicación del DNA, incrementando el riesgo de errores en la replicación, la apoptosis y la formación de roturas de doble cadena (Aziz et al., 2012). Estas roturas podrían generar la formación de micronúcleos si no son correctamente reparadas. Es por esta razón que se evaluó la posible influencia de los genes *XRCC2* y *XRCC3* que participan en la reparación de roturas de doble cadena por recombinación homóloga (fases S y G2), a pesar que el daño se haya inducido en G0/G1. Dado que los micronúcleos se generan durante la mitosis, es claro que parte importante del daño inducido por la radiación no se ha reparado antes de la mitosis, lo que si se observa es que la eficacia de la reparación no parece venir modulada de manera muy significativa por los distintos alelos utilizados en nuestro estudio.

A pesar de que los resultados obtenidos no parecen indicar un papel importante de los genes seleccionados, la buena correlación entre el nivel de daño basal y tras la irradiación, indica que debe existir una base genética que modula los niveles de micronúcleo, lo que indica que se debe continuar tratando de encontrar genes que muestren un papel relevante en la modulación del daño tras la irradiación.

5.4. Posible papel del gen *WDR3* en el mantenimiento de la estabilidad genómica en pacientes con cáncer de tiroides

Estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio (Baida et al., 2008; Akdi et al., 2010) han permitido establecer una asociación entre el gen

WDR3 y el desarrollo de cáncer de tiroides. Así, es posible que este gen pueda estar involucrado de manera directa o indirecta en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Es por esta razón que se decidió evaluar la influencia de tres polimorfismos de este gen (rs3754127, rs3765501, rs4658973) sobre los niveles de daño basal y tras la irradiación (0,5 Gy de radiación gamma).

Sorprendentemente, hemos encontrado muy poca información sobre este gen, y ninguna sobre su papel modulador del cáncer o sobre el daño genético. De la información existente se desprende su participación en los procesos de transducción de señales, el procesado del RNA, la respuesta inmunológica, la regulación de la progresión del ciclo celular, la separación de las cromátidas durante la división celular y la diferenciación celular/tisular, entre otras (Jin et al., 2004; Smith, 2008).

Nuestro Grupo ha encontrado una mayor expresión de este gen en diferentes líneas celulares de cáncer de tiroides respecto a líneas no tumorales (Akdi et al., 2010), lo que coincidiría con lo observado en pacientes con cáncer de colon (Victor Moreno, comunicación personal). Un trabajo reciente realizado por McMahon et al. (2010) señala que la supresión de *WDR3* en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama reduce la proliferación celular, disminuye el tamaño celular y reduce la formación de foci, indicando que la expresión de *WDR3* confiere una ventaja para el crecimiento y proliferación de células cancerígenas, además de verse implicado en la biogénesis del ribosoma (McMahon et al., 2010).

Aunque nuestros resultados muestran que no existen diferencias entre los genotipos de cualquiera de los tres polimorfismos evaluados para el nivel de daño basal sí que se encuentran diferencias cuando se evalúa el daño tras la irradiación. En todos los casos, las diferencias observadas siempre indican que las personas portadoras de los alelos variantes (menos frecuentes) para cualquiera de los tres polimorfismos presentan niveles de daño menores, lo que sugeriría que la presencia de estos alelos les confiere una mayor capacidad de respuesta frente a la radiación.

Aunque los SNPs evaluados no producen cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína, no es infrecuente que los polimorfismos en regiones no codificantes puedan alterar la expresión del gen, así como la expresión de la proteína (Hudson, 2003; Wang y Cooper, 2007). Modificaciones en secuencias del promotor o cercanas al mismo (rs3754127) pueden interrumpir la interacción correcta con los factores de transcripción cambiando o influenciando el nivel de expresión (Guo y Jamison, 2005); esto permite suponer que la transcripción de

WDR3 puede depender de las variantes genéticas que se puedan dar en la región promotora. Además, aunque el procesado del RNA se pueda ver alterado debido a la presencia de SNPs (Kwan et al., 2008; Wang et al., 2008), se ha observado que la exposición a la radiación ionizante también puede inducir transcritos alternativos (Sprung et al., 2011). Así, los polimorfismos rs3765501 y/o rs4658973 pueden influenciar el procesado del RNA no sólo debido a su presencia sino también debido a una respuesta diferencial frente a la exposición con la radiación ionizante.

Nuestros resultados evidencian una importante asociación entre los alelos variantes del gen *WDR3* con los niveles de daño observados tras la exposición a la radiación ionizante. Esto estaría de acuerdo con lo observado tras la exposición a la luz ultravioleta y la radiación ionizante donde se observan cambios de disgregación del nucleolo y alteraciones en los niveles de proteínas involucradas en la vía de reparación NHEJ (Moore et al., 2011). Así, de manera general se sugiere la participación del gen *WDR3* (directa o indirecta) sobre la modulación de la inestabilidad genómica; aunque, como ocurre con los resultados obtenidos para los genes de reparación, se necesitan estudios adicionales tanto funcionales como de expresión.

6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos propuestos y el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1. De los cinco polimorfismos evaluados, en los cuatro genes de reparación estudiados, sólo la presencia del alelo 280His (rs25489) del gen *XRCC1* se asocia con un incremento de riesgo en el desarrollo de cáncer de tiroides diferenciado.
2. La presencia del alelo 188His (rs3218536) del gen *XRCC2* y el alelo G (rs1799796) del gen *XRCC3* parecen tener un efecto combinado, disminuyendo el riesgo de desarrollar cáncer de tiroides diferenciado.
3. Las personas que desarrollaron cáncer de tiroides diferenciado no muestran valores de daño basal (medido como frecuencia de BNMN) diferentes de los observados en la población control.
4. No se ha encontrado evidencias de una sensibilidad diferencial a la radiación ionizante entre los pacientes con cáncer de tiroides, respecto a los controles, cuando sus linfocitos de sangre periférica se tratan *in vitro* con radiación ionizante (0,5 Gy de radiación gamma en la etapa G0 del ciclo celular) y el daño en el DNA se mide como la frecuencia de BNMN.
5. La determinación del nivel de daño basal en el DNA (medido como frecuencia de BNMN) se puede considerar un buen biomarcador para pronosticar los niveles de daño genético que una exposición terapéutica a la radiación ionizante pueda suponer en el paciente.
6. La presencia de los alelos variantes (en homocigosis o heterocigosis, así como en combinación haplotípica) de los polimorfismos rs3754127, rs3765501 y rs4658973 del gen *WDR3* se asocia significativamente con valores de daño más bajos (tras el tratamiento con una dosis de 0,5 Gy de radiación gamma) en comparación con los genotipos o haplotipos que no los lleven.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adjadj E, Schlumberger M, de Vathaire F. (2009) Germ-line DNA polymorphisms and susceptibility to differentiated thyroid cancer. *Lancet Oncol.*, 10: 181-190.
- Aka P, Mateuca R, Buchet JP, Thierens H, Kirsch-Volders M. (2004) Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutat. Res.*, 556: 169-181.
- Akdi A, Giménez EM, García-Quispes W, Pastor S, Castell J, Biarnés J, Marcos R, Velázquez A. (2010) WDR3 gene haplotype is associated with thyroid cancer risk in a Spanish population. *Thyroid*, 20: 803-809.
- Akulevich NM, Saenko VA, Rogounovitch TI, Drozd VM, Lushnikov EF, Ivanov VK, Mitsutake N, Kominami R, Yamashita S. (2009) Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer*, 16: 491-503.
- Al-Brahim N, Asa SL. (2006) Papillary thyroid carcinoma: an overview. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 130: 1057-1062.
- Angelini S, Kumar R, Carbone F, Maffei F, Forti GC, Violante FS, Lodi V, Curti S, Hemminki K, Hrelia P. (2005) Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. *Mutat. Res.*, 570: 105-117.
- Auranen A, Song H, Waterfall C, Dicioccio RA, Kuschel B, Kjaer SK, Hogdall E, Hogdall C, Stratton J, Whittemore AS, Easton DF, Ponder BA, et al. (2005) Polymorphisms in DNA repair genes and epithelial ovarian cancer risk. *Int. J. Cancer*, 117: 611-618.
- Aypar U, Morgan WF, Baulch JE. (2011) Radiation-induced genomic instability: are epigenetic mechanisms the missing link? *Int. J. Radiat. Biol.*, 87: 179-191.
- Aziz K, Nowsheen S, Pantelias G, Iliakis G, Gorgoulis VG, Georgakilas AG. (2012) Targeting DNA damage and repair: embracing the pharmacological era for successful cancer therapy. *Pharmacol. Ther.*, 133: 334-350.
- Baeyens A, Slabbert JP, Willem P, Jozela S, Van Der Merwe D, Vral A. (2010) Chromosomal radiosensitivity of HIV positive individuals. *Int. J. Radiat. Biol.*, 86: 584-592.
- Baida A, Akdi M, González-Flores E, Galofré P, Marcos R, Velázquez A. (2008) Strong association of chromosome 1p12 loci with thyroid cancer

- susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 17: 1499-1504.
- Ballardin M, Gemignani F, Bodei L, Mariani G, Ferdeghini M, Rossi AM, Migliore L, Barale R. (2002) Formation of micronuclei and of clastogenic factor(s) in patients receiving therapeutic doses of iodine-131. *Mutat. Res.*, 514: 77-85.
- Bastos HN, Antão MR, Silva SN, Azevedo AP, Manita I, Teixeira V, Pina JE, Gil OM, Ferreira TC, Limbert E, Rueff J, Gaspar JF. (2009) Association of polymorphisms in genes of the homologous recombination DNA repair pathway and thyroid cancer risk. *Thyroid*, 19: 1067-1075.
- Benhamou S, Tuimala J, Bouchardy C, Dayer P, Sarasin A, Hirvonen A. (2004) DNA repair gene XRCC2 and XRCC3 polymorphisms and susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. *Int. J. Cancer*, 112: 901-904.
- 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.
- Bodmer W, Bielas JH, Beckman RA. (2008) Genetic instability is not a requirement for tumor development. *Cancer Res.*, 68: 3558-3560; discussion 3560-3561.
- Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C, Fenech M. (2011) Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26: 93-100.
- Bourguignon MH, Gisone PA, Perez MR, Michelin S, Dubner D, Giorgio MD, Carosella ED. (2005) Genetic and epigenetic features in radiation sensitivity Part I: cell signalling in radiation response. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 32: 229-246.
- Bravard A, Vacher M, Moritz E, Vaslin L, Hall J, Epe B, Radicella JP. (2009) Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. *Cancer Res.*, 69: 3642-3649.
- Brenneman MA, Weiss AE, Nickoloff JA, Chen DJ. (2000) XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. *Mutat. Res.*, 459: 89-97.
- Brent GA, Braverman LE, Zoeller RT. (2007) Thyroid health and the environment. *Thyroid*, 17: 807-809.
- Brown RL, Cohen EEW. (2008) Novel approaches in the treatment of thyroid cancer. *Update Cancer Ther.*, 3: 1-11
- Chen AY, Jemal A, Ward EM. (2009) Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005. *Cancer*, 115: 3801-3807.
- Chiang FY, Wu CW, Hsiao PJ, Kuo WR, Lee KW, Lin JC, Liao YC, Juo SH. (2008)

- Association between polymorphisms in DNA base excision repair genes XRCC1, APE1, and ADPRT and differentiated thyroid carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 14: 5919-5924.
- Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA. (2008) Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncol.*, 47: 809-824.
- Claudio JO, Liew CC, Ma J, Heng HH, Stewart AK, Hawley RG. (1999) Cloning and expression analysis of a novel WD repeat gene, WDR3, mapping to 1p12-p13. *Genomics*, 59: 85-89.
- Curtin K, Lin WY, George R, Katory M, Shorto J, Cannon-Albright LA, Smith G, Bishop DT, Cox A, Camp NJ; Colorectal Cancer Study Group. (2009) Genetic variants in XRCC2: new insights into colorectal cancer tumorigenesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 18: 2476-2484.
- Curwen GB, Murphy S, Tawn EJ, Winther JF, Boice JD Jr. (2011) A study of DNA damage recognition and repair gene polymorphisms in relation to cancer predisposition and G2 chromosomal radiosensitivity. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52: 72-76.
- Dal Maso L, Bosetti C, La Vecchia C, Franceschi S. (2009) Risk factors for thyroid cancer: an epidemiological review focused on nutritional factors. *Cancer Causes Control*, 20: 75-86.
- Danoy P, Sonoda E, Lathrop M, Takeda S, Matsuda F. (2007) A naturally occurring genetic variant of human XRCC2 (R188H) confers increased resistance to cisplatin-induced DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 352: 763-768.
- Dardano A, Falzoni S, Caraccio N, Polini A, Tognini S, Solini A, Berti P, Di Virgilio F, Monzani F. (2009) 1513A>C polymorphism in the P2X7 receptor gene in patients with papillary thyroid cancer: correlation with histological variants and clinical parameters. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 94: 695-698.
- Dayal D, Martin SM, Limoli CL, Spitz DR. (2008) Hydrogen peroxide mediates the radiation-induced mutator phenotype in mammalian cells. *Biochem. J.*, 413: 185-191.
- Deans B, Griffin CS, O'Regan P, Jasin M, Thacker J. (2003) Homologous recombination deficiency leads to profound genetic instability in cells derived from Xrcc2-knockout mice. *Cancer Res.*, 63: 8181-8187.
- Decordier I, Looock KV, Kirsch-Volders M. (2010) Phenotyping for DNA repair capacity. *Mutat. Res.*, 705: 107-129.

- De Lellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. (2004) World Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. IARC Press, Lyon, France.
- 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.
- Detours V, Versteyhe S, Dumont JE, Maenhaut C. (2008) Gene expression profiles of post-Chernobyl thyroid cancers. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes., Obes.* 15: 440-445.
- Dhillon VS, Thomas P, Iarmarcovai G, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Fenech M. (2011) Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26: 33-42.
- Elsässer SJ, Allis CD, Lewis PW. (2011) Cancer. New epigenetic drivers of cancers. *Science*, 331: 1145-1146.
- El-Zein RA, Schabath MB, Etzel CJ, Lopez MS, Franklin JD, Spitz MR. (2006) Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk. *Cancer Res.*, 66: 6449-6456.
- Fenech M. (2002) Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug. Discov. Today*, 7: 1128-1137.
- Fenech M. (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.*, 600: 58-66.
- Fenech M. (2008) Genome health nutrigenomics and nutrigenetics-diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 1365-1370.
- Fenech M, Bonassi S. (2011) The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26: 43-49.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E; HUMAN Micronucleus project. (2003) HUMAN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, 534: 65-75.

- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26: 125-132.
- Figuerola JD, Malats N, Rothman N, Real FX, Silverman D, Kogevinas M, Chanock S, Yeager M, Welch R, Dosemeci M, Tardón A, Serra C, et al. (2007) Evaluation of genetic variation in the double-strand break repair pathway and bladder cancer risk. *Carcinogenesis*, 28: 1788-1793.
- Forget AL, Bennett BT, Knight KL. (2004) Xrcc3 is recruited to DNA double strand breaks early and independent of Rad51. *J. Cell. Biochem.*, 93: 429-436.
- Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. (2009) SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, Chapter 2: Unit 2.12.
- García-Closas M, Egan KM, Newcomb PA, Brinton LA, Titus-Ernstoff L, Chanock S, Welch R, Lissowska J, Peplonska B, Szeszenia-Dabrowska N, Zatonski W, Bardin-Mikolajczak A, Struwing JP. (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.*, 119: 376-388.
- Gatzidou E, Michailidi C, Tseleni-Balafouta S, Theocharis S. An epitome of DNA repair related genes and mechanisms in thyroid carcinoma. *Cancer Lett.*, 290: 139-147.
- Giusti F, Falchetti A, Franceschelli F, Marini F, Tanini A, Brandi ML. (2010) Thyroid cancer: current molecular perspectives. *J. Oncol.*, ID 351679.
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. (2002) Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 11: 1513-1530.
- Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A, Bergthorsson JT, He H, Blondal T, Geller F, Jakobsdottir M, Magnusdottir DN, Matthiasdottir S, et al. (2009) Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nature Genet.*, 41: 460-464.
- Güler E, Orta T, Günebakan S, Utkusavaş A, Kolusayin Ozar MO. (2005) Can micronucleus technique predict the risk of lung cancer in smokers? *Tuberk. Toraks.*, 53: 225-230.
- Guo Y, Jamison DC. (2005) The distribution of SNPs in human gene regulatory

- regions. *BMC Genomics*, 6: 140.
- Hall J, Angèle S. (1999) Radiation, DNA damage and cancer. *Mol. Med. Today*, 5: 157-164.
- Han J, Hankinson SE, Ranu H, De Vivo I, Hunter DJ. (2004) Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *Carcinogenesis*, 25: 189-195.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.
- Hao B, Miao X, Li Y, Zhang X, Sun T, Liang G, Zhao Y, Zhou Y, Wang H, Chen X, Zhang L, Tan W, et al. (2006) A novel T-77C polymorphism in DNA repair gene XRCC1 contributes to diminished promoter activity and increased risk of non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 25: 3613-3620.
- Harper JV, Anderson JA, O'Neill P. (2010) Radiation induced DNA DSBs: Contribution from stalled replication forks? *DNA Repair (Amst)*, 9: 907-913.
- He H, Nagy R, Liyanarachchi S, Jiao H, Li W, Suster S, Kere J, de la Chapelle A. (2009) A susceptibility locus for papillary thyroid carcinoma on chromosome 8q24. *Cancer Res.*, 69: 625-631.
- Henry-Mowatt J, Jackson D, Masson JY, Johnson PA, Clements PM, Benson FE, Thompson LH, Takeda S, West SC, Caldecott KW. (2003) XRCC3 and Rad51 modulate replication fork progression on damaged vertebrate chromosomes. *Mol. Cell.*, 11: 1109-1117.
- Hernández A, Xamena N, Gutiérrez S, Velázquez A, Creus A, Surrallés J, Galofré P, Marcos R. (2006) Basal and induced micronucleus frequencies in human lymphocytes with different GST and NAT2 genetic backgrounds. *Mutat. Res.*, 606: 12-20.
- Hoeijmakers JH. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411: 366-374.
- Ho T, Li G, Lu J, Zhao C, Wei Q, Sturgis EM. (2009) Association of XRCC1 polymorphisms and risk of differentiated thyroid carcinoma: a case-control analysis. *Thyroid*, 19: 129-135.
- Howe OL, Daly PA, Seymour C, Ormiston W, Nolan C, Mothersill C. (2005) Elevated G2 chromosomal radiosensitivity in Irish breast cancer patients: a comparison with other studies. *Int. J. Radiat. Biol.*, 81: 373-378.
- Hu JJ, Mohrenweiser HW, Bell DA, Leadon SA, Miller MS. (2002) Symposium overview: genetic polymorphisms in DNA repair and cancer risk. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 185: 64-73.

- Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q, Shen H. (2005) XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14: 1810-1818.
- Huang Y, Fenech M, Shi Q. (2011) Micronucleus formation detected by live-cell imaging. *Mutagenesis*, 26: 133-138.
- Hudson TJ. (2003) Wanted: regulatory SNPs. *Nature Genet.*, 33: 439-440.
- Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. (2005) Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.*, 162: 925-942.
- IARC, (2001) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ionizing Radiation, Part 2: Some Internally Deposited Radionuclides. Volume 78.
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsière T. (2008) Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat. Res.*, 658: 215-233.
- ICGC, (2010) International Cancer Genome Consortium. International network of cancer genome projects. *Nature*, 464:993-998.
- Ide H, Kotera M. (2004) Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol. Pharm. Bull.*, 27: 480-485.
- Jalal S, Earley JN, Turchi JJ. (2011) DNA repair: from genome maintenance to biomarker and therapeutic target. *Clin. Cancer Res.*, 17: 6973-6984.
- Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B, de la Chapelle A. (2009) Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106: 1502-1505.
- Jiao L, Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Evans DB, Abbruzzese JL, Li D. (2008) XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism and risk of pancreatic cancer. *Am. J. Gastroenterol.*, 103: 360-367.
- Jin F, Dai J, Ji C, Gu S, Wu M, Qian J, Xie Y, Mao Y. (2004) A novel human gene (WDR25) encoding a 7-WD40-containing protein maps on 14q32. *Biochem. Genet.*, 42: 419-427.
- Johnson RD, Liu N, Jasin M. (1999) Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature*, 401: 397-399.
- Kadhim MA, Hill MA, Moore SR. (2006) Genomic instability and the role of radiation quality. *Radiat. Prot. Dosimetry.*, 122: 221-227.

- Khanna KK, Jackson SP. (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genet.*, 27: 247-254.
- Kirsch-Volders M, Fenech M. (2001) Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, 16: 51-58.
- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M Jr, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surrallés J, et al. (2003) Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutat. Res.*, 540: 153-163.
- Kiuru A, Lindholm C, Heilimo I, Ceppi M, Koivistoinen A, Ilus T, Hirvonen A, Norppa H, Salomaa S. (2005) Influence of DNA repair gene polymorphisms on the yield of chromosomal aberrations. *Environ. Mol. Mutagen.*, 46: 198-205.
- Kojic SL, Strugnell SS, Wiseman SM. (2011) Anaplastic thyroid cancer: a comprehensive review of novel therapy. *Expert. Rev. Anticancer. Ther.*, 11: 387-402.
- Kolodner RD, Cleveland DW, Putnam CD. (2011) Cancer. Aneuploidy drives a mutator phenotype in cancer. *Science*, 333: 942-943.
- Kondo T, Ezzat S, Asa SL. (2006) Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature Rev. Cancer*, 6: 292-306.
- Kouniavsky G, Zeiger MA. (2010) Thyroid tumorigenesis and molecular markers in thyroid cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, 22: 23-29.
- Kuschel B, Auranen A, McBride S, Novik KL, Antoniou A, Lipscombe JM, Day NE, Easton DF, Ponder BA, Pharoah PD, Dunning A. (2002) Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum. Mol. Genet.*, 11: 1399-1407.
- Kwan T, Benovoy D, Dias C, Gurd S, Provencher C, Beaulieu P, Hudson TJ, Sladek R, Majewski J. (2008) Genome-wide analysis of transcript isoform variation in humans. *Nature Genet.*, 40: 225-231.
- Laird PW. (2005) Cancer epigenetics. *Hum. Mol. Genet.*, 14 Spec. No 1: R65-R76.
- Lam KY, Lo CY, Chan KW, Wan KY. (2000) Insular and anaplastic carcinoma of the thyroid: a 45-year comparative study at a single institution and a review of the significance of p53 and p21. *Ann. Surg.*, 231: 329-338.
- Landa I, Robledo M. (2011) Association studies in thyroid cancer susceptibility: are we on the right track? *J. Mol. Endocrinol.*, 47: R43-R58.
- Lassmann M, Hänscheid H, Gassen D, Biko J, Meineke V, Reiners C, Scherthan

- H. (2010) *in vivo* formation of gamma-H2AX and 53BP1 DNA repair foci in blood cells after radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *J. Nucl. Med.*, 51: 1318-1325.
- Le Marchand L, Donlon T, Lum-Jones A, Seifried A, Wilkens LR. (2002) Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 11: 409-412.
- Li D, Liu H, Jiao L, Chang DZ, Beinart G, Wolff RA, Evans DB, Hassan MM, Abbruzzese JL. (2006) Significant effect of homologous recombination DNA repair gene polymorphisms on pancreatic cancer survival. *Cancer Res.*, 66: 3323-3330.
- Li D, Roberts R. (2001) WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58: 2085-2097.
- Li H, Ha TC, Tai BC. (2009) XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk in different populations: a meta-analysis. *Breast*, 18: 183-191.
- Li Q, Huang L, Rong L, Xue Y, Lu Q, Rui Y, Li J, Tong N, Wang M, Zhang Z, Fang Y. (2011) hOGG1 Ser326Cys polymorphism and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. *Cancer Sci.*, 102: 1123-1127.
- Liu F, Li B, Wei Y, Yan L, Wen T, Zhao J, Xu M. (2011) XRCC1 genetic polymorphism Arg399Gln and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Liver Int.*, 31: 802-809.
- Liu L, Yang L, Zhang Y, Xu ZF, Yu MH, Wang JX, Xiao ZJ. (2008) Polymorphisms of RAD51(G135C) and XRCC3(C241T) genes and correlations thereof with prognosis and clinical outcomes of acute myeloid leukemia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.*, 88: 378-382.
- Liu Y, Masson JY, Shah R, O'Regan P, West SC. (2004) RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science*, 303: 243-246.
- Loeb LA. (2001) A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.*, 61: 3230-3239.
- Loeb LA, Springgate CF, Battula N. (1974) Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer Res.*, 34: 2311-2321.
- Loeb LA, Bielas JH, Beckman RA. (2008) Cancers exhibit a mutator phenotype: clinical implications. *Cancer Res.*, 68: 3551-3557; discussion 3557.
- Loizidou MA, Michael T, Neuhausen SL, Newbold RF, Marcou Y, Kakouri E, Daniel M, Papadopoulos P, Malas S, Kyriacou K, Hadjisavvas A. (2008) Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and

- risk of breast cancer in Cyprus. *Breast Cancer Res. Treat.*, 112: 575-579.
- Lord CJ, Ashworth A. (2012) The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481: 287-294.
- Manuguerra M, Saletta F, Karagas MR, Berwick M, Veglia F, Vineis P, Matullo G. (2006) XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.*, 164: 297-302.
- Marsin S, Vidal AE, Sossou M, Ménissier-de Murcia J, Le Page F, Boiteux S, de Murcia G, Radicella JP. (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.
- Mateuca R, Aka PV, 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.
- McMahon M, Ayllón V, Panov KI, O'Connor R. (2010) Ribosomal 18 S RNA processing by the IGF-I-responsive WDR3 protein is integrated with p53 function in cancer cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 285: 18309-18318.
- Mettler FA. (2012) Medical effects and risks of exposure to ionising radiation. *J. Radiol. Prot.*, 32: N9-N13.
- Miao X, Zhang X, Zhang L, Guo Y, Hao B, Tan W, He F, Lin D. (2006) Adenosine diphosphate ribosyl transferase and X-ray repair cross-complementing 1 polymorphisms in gastric cardia cancer. *Gastroenterology*, 131: 420-427.
- Michiels S, Laplanche A, Boulet T, Dessen P, Guillonnet B, Méjean A, Desgrandchamps F, Lathrop M, Sarasin A, Benhamou S. (2009) Genetic polymorphisms in 85 DNA repair genes and bladder cancer risk. *Carcinogenesis*, 30: 763-768.
- Moore HM, Bai B, Boisvert FM, Latonen L, Rantanen V, Simpson JC, Pepperkok R, Lamond AI, Laiho M. (2011) Quantitative proteomics and dynamic imaging of the nucleolus reveal distinct responses to UV and ionizing radiation. *Mol. Cell. Proteomics*, 10: M111.009241.
- Mozdarani H, Mansouri Z, Haeri SA. (2005) Cytogenetic radiosensitivity of g0-lymphocytes of breast and esophageal cancer patients as determined by micronucleus assay. *J. Radiat. Res.*, 46: 111-116.
- Mullenders L, Atkinson M, Paretzke H, Sabatier L, Bouffler S. (2009) Assessing cancer risks of low-dose radiation. *Nature Rev. Cancer*, 9: 596-604.
- Murgia E, Ballardini M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. (2008) Validation of

- micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutat. Res.*, 639: 27-34.
- Nambiar D, Rajamani P, Singh RP. (2011) Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy. *Mutat. Res.*, 728: 139-157.
- NCI, National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/tiroides>. Acceso: 07 de Marzo del 2012.
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. (2010) Genomic instability-an evolving hallmark of cancer. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, 11: 220-228.
- Norppa H. (2004) Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol. Lett.*, 149: 309-334.
- Obe G, (2010) Durante M. DNA double strand breaks and chromosomal aberrations. *Cytogenet. Genome Res.*, 128: 8-16.
- Okasaka T, Matsuo K, Suzuki T, Ito H, Hosono S, Kawase T, Watanabe M, Yatabe Y, Hida T, Mitsudomi T, Tanaka H, Yokoi K, Tajima K. (2009) hOGG1 Ser326Cys polymorphism and risk of lung cancer by histological type. *J. Hum. Genet.*, 54: 739-745.
- Olive PL, Banáth JP. (2004) Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 58: 331-335.
- Pastorelli R, Cerri A, Mezzetti M, Consonni E, Airoidi L. (2002) Effect of DNA repair gene polymorphisms on BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Int. J. Cancer.*, 100: 9-13.
- Paz-Elizur T, Krupsky M, Blumenstein S, Elinger D, Schechtman E, Livneh Z. (2003) DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 95: 1312-1319.
- Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, Hinsch N, Hansmann ML, Selkinski I, Grünwald F, Vorländer C, Wahl RA, Bechstein WO, Zeuzem S, Holzer K, Badenhop K. (2009) Vitamin D receptor polymorphisms in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid*, 19: 623-628.
- Pérez-Losada J, Castellanos-Martín A, Mao JH. (2011) Cancer evolution and individual susceptibility. *Integr. Biol. (Camb)*, 3: 316-328.
- Poggioli T, Sterpone S, Palma S, Cozzi R, Testa A. (2010) G0 and G2 chromosomal assays in the evaluation of radiosensitivity in a cohort of Italian breast cancer patients. *J. Radiat. Res.*, 51: 615-619.
- Price EA, Bourne SL, Radbourne R, Lawton PA, Lamerdin J, Thompson LH, Arrand JE. (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.
- Prise KM, Folkard M, Michael BD. (2003) A review of the bystander effect and its implications for low-dose exposure. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 104: 347-355.
- 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.*, 11: 1433-1438.
- Rego-Iraeta A, Pérez-Méndez LF, Mantinan B, Garcia-Mayor RV. (2009) Time trends for thyroid cancer in northwestern Spain: true rise in the incidence of micro and larger forms of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*, 19: 333-340.
- Rohr P, da Silva J, Erdtmann B, Saffi J, Guecheva TN, Antônio Pêgas Henriques J, Kvitko K. (2011) BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52: 20-27.
- Rosenbaum MA, McHenry CR. (2009) Contemporary management of papillary carcinoma of the thyroid gland. *Expert. Rev. Anticancer. Ther.*, 9: 317-329.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Kang TH, Reardon JT, Lee JH, Ozturk N. (2010) Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. *FEBS Lett.*, 584: 2618-2625.
- Sandoval J, Esteller M. (2012) Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, [Epub ahead of print]
- Sarasin A, Bounacer A, Lepage F, Schlumberger M, Suarez HG. (1999) Mechanisms of mutagenesis in mammalian cells. Application to human thyroid tumours. *C. R. Acad. Sci. III.*, 322: 143-149.
- Saunders WS, Shuster M, Huang X, Gharaibeh B, Enyenihi AH, Petersen I, Gollin SM. (2000) Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97: 303-308.
- Schlumberger M, Sherman SI. (2012) Approach to the patient with advanced differentiated thyroid cancer. *Eur. J. Endocrinol.*, 166: 5-11.
- Schneider J, Classen V, Helmig S. (2008) XRCC1 polymorphism and lung cancer risk. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 8: 761-780.
- Scott D. (2004) Chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer. *Cytogenet. Genome. Res.*, 104: 365-370.
- Scott D, Barber JB, Levine EL, Burrill W, Roberts SA. (1998) Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of

- radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? *Br. J. Cancer*, 77: 614-620.
- Scott D, Barber JB, Spreadborough AR, Burrill W, Roberts SA. (1999) Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 75: 1-10.
- Sherman SI. (2003) Thyroid carcinoma. *Lancet*, 361: 501-511.
- Silva SN, Gil OM, Oliveira VC, Cabral MN, Azevedo AP, Faber A, Manita I, Ferreira TC, Limbert E, Pina JE, Rueff J, Gaspar J. (2005) Association of polymorphisms in ERCC2 gene with non-familial thyroid cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 14: 2407-2412.
- Smith TF. (2008) Diversity of WD-repeat proteins. *Subcell. Biochem.*, 48: 20-30.
- Sobczuk A, Poplawski T, Blasiak J. (2012) Polymorphisms of DNA Repair Genes in Endometrial Cancer. *Pathol. Oncol. Res.*, [Epub ahead of print]
- Sobrinho-Simões M, Eloy C, Magalhães J, Lobo C, Amaro T. (2011) Follicular thyroid carcinoma. *Mod. Pathol.*, 24: S10-S18.
- Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 22: 1928-1929.
- Sprung CN, Li J, Hovan D, McKay MJ, Forrester HB. (2011) Alternative transcript initiation and splicing as a response to DNA damage. *PLoS One.*, 6: e25758.
- Srivastava A, Srivastava K, Pandey SN, Choudhuri G, Mittal B. (2009) Single-nucleotide polymorphisms of DNA repair genes OGG1 and XRCC1: association with gallbladder cancer in North Indian population. *Ann. Surg. Oncol.*, 16: 1695-1703.
- Sterpone S, Cornetta T, Padua L, Mastellone V, Giammarino D, Testa A, Tirindelli D, Cozzi R, Donato V. (2010) DNA repair capacity and acute radiotherapy adverse effects in Italian breast cancer patients. *Mutat. Res.*, 684: 43-48.
- Stratton MR. (2011) Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science*, 331: 1553-1558.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. (2009) The cancer genome. *Nature*, 2009 458: 719-724.
- Sturgis EM, Zhao C, Zheng R, Wei Q. (2005) Radiation response genotype and risk of differentiated thyroid cancer: a case-control analysis. *Laryngoscope*, 115: 938-945.
- Surrallés J, Natarajan AT. (1997) Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat. Res.*, 392: 165-174.

- Takahashi M, Saenko VA, Rogounovitch TI, Kawaguchi T, Drozd VM, Takigawa-Imamura H, Akulevich NM, Ratanajaraya C, Mitsutake N, Takamura N, Danilova LI, et al. (2010) The FOXE1 locus is a major genetic determinant for radiation-related thyroid carcinoma in Chernobyl. *Hum. Mol. Genet.*, 19: 2516-2523.
- Thacker J. (2005) The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett.*, 219: 125-135.
- Thomas GA. (2012) The Chernobyl Tissue Bank: integrating research on radiation-induced thyroid cancer. *J. Radiol. Prot.*, 32: N77-N80.
- Thomas GA, Tronko MD, Tsyb AF, Tuttle RM. (2011) What have we learnt from Chernobyl? What have we still to learn? *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*, 23: 229-233.
- Thompson SL, Bakhoun SF, Compton DA. (2010) Mechanisms of chromosomal instability. *Curr. Biol.*, 20: R285-R295.
- Tronko M, Bogdanova T, Voskoboinyk L, Zurnadzhy L, Shpak V, Gulak L. (2010) Radiation induced thyroid cancer: fundamental and applied aspects. *Exp. Oncol.*, 32: 200-204.
- Trzeciak AR, Nyaga SG, Jaruga P, Lohani A, Dizdaroglu M, Evans MK. (2004) Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145. *Carcinogenesis*, 25: 1359-1370.
- 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: 1003-1008.
- Vincent MD. (2011) Cancer: beyond speciation. *Adv. Cancer. Res.*, 112: 283-350.
- Volpato CB, Martínez-Alfaro M, Corvi R, Gabus C, Sauvaigo S, Ferrari P, Bonora E, De Grandi A, Romeo G. (2008) Enhanced sensitivity of the RET proto-oncogene to ionizing radiation *in vitro*. *Cancer Res.*, 68: 8986-8992.
- Vral A, Fenech M, Thierens H. (2011) The micronucleus assay as a biological dosimeter of *in vivo* ionising radiation exposure. *Mutagenesis*, 26: 11-17.
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 456: 470-476.
- Wang GS, Cooper TA. (2007) Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature Rev. Genet.*, 8: 749-761.
- Wartofsky L. (2005) Papillary Carcinoma. *Clinical Aspects*, en: Biersack HJ,

- Grünwald F. Thyroid cancer. 2da edición. Berlín: Springer Science & Business Media.
- Weiss JM, Goode EL, Ladiges WC, Ulrich CM. (2005) Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol. Carcinog.*, 42: 127-141.
- Widel M, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka K, Swierniak A. (2003) Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with cervical carcinoma undergoing radiotherapy. *Radiat. Res.*, 159: 713-721.
- Williams SF, Smallridge RC. (2004) Targeting the ERK pathway: novel therapeutics for thyroid cancer. *Curr. Drug. Targets. Immune Endocr. Metabol. Disord.*, 4: 199-220.
- Wilson DM 3rd, Kim D, Berquist BR, Sigurdson AJ. (2011) Variation in base excision repair capacity. *Mutat. Res.*, 711: 100-112.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer. Biol.*, 14: 473-486.
- Wong KT, Ahuja AT. (2005) Ultrasound of thyroid cancer. *Cancer Imaging.*, 5: 157-166.
- Xiong P, Zheng R, Wang LE, Bondy ML, Shen H, Borer MM, Wei Q, Sturgis EM. (2005) A pilot case-control study of gamma-radiation sensitivity and risk of papillary thyroid cancer. *Thyroid*, 15: 94-99.
- Xu J, Zheng SL, Turner A, Isaacs SD, Wiley KE, Hawkins GA, Chang BL, Bleecker ER, Walsh PC, Meyers DA, Isaacs WB. (2002) Associations between hOGG1 sequence variants and prostate cancer susceptibility. *Cancer Res.*, 62: 2253-2257
- Xue H, Ni P, Lin B, Xu H, Huang G. (2011) X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) genetic polymorphisms and gastric cancer risk: A HuGE review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.*, 173: 363-375.
- Yu KD, Chen AX, Qiu LX, Fan L, Yang C, Shao ZM. (2010) XRCC2 Arg188His polymorphism is not directly associated with breast cancer risk: evidence from 37,369 subjects. *Breast Cancer Res. Treat.*, 123: 219-225.
- Yuan W, Xu L, Feng Y, Yang Y, Chen W, Wang J, Pang D, Li D. (2010) The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.*, 122: 835-842.
- Zhang J, Glatfelter AA, Taetle R, Trent JM. (1999) Frequent alterations of evolutionarily conserved regions of chromosome 1 in human malignant

- melanoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 111: 119-123.
- 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 Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. (2003) Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am. J. Clin. Pathol.*, 120: 71-77.
- Znaor A, Fucić A, Strnad M, Barković D, Skara M, Hozo I. (2003) Micronuclei in peripheral blood lymphocytes as a possible cancer risk biomarker: a cohort study of occupationally exposed workers in Croatia. *Croat. Med. J.*, 44: 441-446.

8. ANEXOS



Association studies of *OGG1*, *XRCC1*, *XRCC2* and *XRCC3* polymorphisms with differentiated thyroid cancer

Wilser-Andrés García-Quispes^a, Giselle Pérez-Machado^{a,1}, Abdelmounaim Akdi^a, Susana Pastor^{a,b}, Pere Galofré^{c,2}, Fina Biarnés^d, Joan Castell^c, Antonia Velázquez^{a,b}, Ricard Marcos^{a,b,*}

^a Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

^b CIBER Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Salud Carlos III, Spain

^c Servei de Medicina Nuclear, Hospitals Universitaris Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

^d Unitat d'Endocrinologia, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2010

Received in revised form 28 February 2011

Accepted 2 March 2011

Available online 15 March 2011

Keywords:

Thyroid cancer

Genetic polymorphisms

OGG1

XRCC1

XRCC2

XRCC3

ABSTRACT

The role of the DNA repair genes *OGG1*, *XRCC1*, *XRCC2* and *XRCC3* on differentiated thyroid cancer (DTC) susceptibility was examined in 881 individuals (402 DTC and 479 controls). DNA repair genes were proposed as candidate genes, since the current data indicate that exposure to ionizing radiation is the only established factor in the development of thyroid cancer, especially when it occurs in early stages of life.

We have genotyped DNA repair genes involved in base excision repair (BER) (*OGG1*, Ser326Cys; *XRCC1*, Arg280His and Arg399Gln), and homologous recombination repair (HRR) (*XRCC2*, Arg188His and *XRCC3*, ISV-14G). Genotyping was carried out using the iPLEX (Sequenom) technique. Multivariate logistic regression analyses were performed in a case-control study design. From all the studied polymorphism, only a positive association (OR = 1.58, 95% CI 1.05–2.46, $P = 0.027$) was obtained for *XRCC1* (Arg280His). No associations were observed for the other polymorphisms. No effects of the histopathological type of tumor were found when the DTC patients were stratified according to the type of tumor.

It must be emphasized that this study include the greater patients group, among the few studies carried out until now determining the role of DNA repair genes in thyroid cancer susceptibility.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Despite its low incidence (about 1% among all tumors) and favorable prognosis, thyroid cancer is of special concern in the practice of endocrinology because it accounts for more than 90% of all endocrine cancers, and it contributes to more than 50% of deaths from endocrine cancer [1–3]. So far, the only well established risk factor is exposure to ionizing radiation. Thus, exposure to ionizing radiation has been established as an important factor in the development of thyroid cancer, especially when it occurs in early stages of life, during childhood or as a young adult [4,5]. There is also high evidence that some of the thyroid cancer has a familiar origin, indicating

that susceptibility high penetrance genes play an important role [3,6].

Ionizing radiation produces DNA lesions and DNA repair genes have a critical role in maintaining genome integrity [7]. Mutations in such genes may reduce DNA repair capacity and influence cancer development and, for this reason, they are increasingly included in genetic studies on cancer risk association. Some genetic variants of these genes have shown to be cancer susceptibility factors in humans, and there are well documented examples associating defective DNA repair processes with increased cancer risk [8]. Among others, polymorphisms in the base excision repair (BER) genes (*OGG1*, *XRCC1*) and in homologous recombination (HRR) genes (*XRCC2*, *XRCC3*) have been evaluated to determine their role as risk or protection factors for cancer development [9–11].

The *OGG1* gene encodes for a protein that initiates the BER pathway, and it is involved in the elimination of 8-oxoguanine (8-oxoG) adducts [12]. Although the Ser326Cys polymorphism has been associated with several cancers [13–15], no association studies exist for *OGG1* and thyroid cancer.

Another gene of the BER pathway is the X-ray repair cross complementing group 1 (*XRCC1*) gene. It encodes a scaffold protein involved in the efficient repair of DNA single-strand break (SSB)

* Corresponding author at: Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain.

E-mail address: ricard.marcos@uab.es (R. Marcos).

¹ Present address: Molecular Simulation and Drug Design (CBQ), Central University of Las Villas, Santa Clara, Cuba.

² Present address: Servei de Medicina Nuclear, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain.

Table 1
General characteristics for controls (N=479) and thyroid cancer (N=402) groups.

	Control N (%)	Cases N (%) ^a	Papillary N (%)	Follicular N (%)
Total	479	402	339 (84.3)	59 (14.7)
Male	196 (40.9)	90 (22.4)	75 (22)	14 (24)
Female ^b	283 (59.1)	312 (77.6)	264 (78)	45 (76)
Age ^c mean ± S.D.	45.99 ± 17.26	47.06 ± 15.49	46.34 ± 15.08	50.66 ± 17.08
Male	49.95 ± 18.06	47.44 ± 14.24	46.67 ± 14.01	51.86 ± 15.68
Female	43.25 ± 16.15	46.94 ± 15.85	46.25 ± 15.39	50.29 ± 17.65
Age at diagnosis mean ± S.D. ^d	–	41.73 ± 15.20	40.88 ± 14.65	46.21 ± 16.82
Smoking status ^e				
Smoker	107 (22.3)	62 (15.4)		
Non-smoker	309 (64.5)	184 (45.8)		
Ex smoker	3 (0.6)	32 (8.0)		
No answer	60 (12.5)	124 (30.8)		
Alcohol consumption				
No	165 (34.4)	207 (51.5)		
Yes	169 (35.3)	71 (17.7)		
No answer	145 (30.3)	124 (30.8)		
Familiar oncologic history				
No	106 (22.1)	56 (13.9)		
Yes	115 (24)	136 (33.8)		
No answer	258 (53.9)	210 (52.2)		

Abbreviation: S.D., Standard deviation.

^a Four patients (1%) were non-classifiable as papillary or follicular thyroid cancer.

^b Significant differences between control and cases for gender ($P < 0.0001$) using Chi-square test.

^c No significant differences between control and cases for age ($P = 0.089$) using Mann–Whitney test.

^d Significant differences for age at diagnosis between papillary and follicular thyroid cancer subgroups.

^e No significant differences when smoker and non-smoker groups was compared between control and cases ($P = 0.8826$).

formed by exposure to ionizing radiation and alkylating agents. XRCC1 exert its role interacting with other repair proteins such as OGG1, DNA polymerase β , DNA ligase III, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), polynucleotide kinase, human AP endonuclease, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) [6,8,13,16]. Among its polymorphisms, Arg280His and Arg399Gln have been widely studied and these polymorphisms are associated with a loss of protein function [17–20].

In thyroid cancer patients, three studies have been conducted with this gene, but the reported data are quite conflictive [21–23].

The XRCC2 and XRCC3 genes are involved in the HRR pathway [24,25] and encode for RAD51-like proteins. Only a recent study has been carried out to determine the role of XRCC2 in thyroid cancer patients, but no phenotype-genotype association was found [26]. On the contrary, the XRCC3 has shown to be involved in thyroid cancer risk in the two studies carried out until now [26,27].

In addition, OGG1, XRCC1, XRCC2 and XRCC3 genes have also been included in different case-control studies for different types of tumors [21,20,28]; however, most of these case-control studies have frequently used small sample sizes and focused on the role of single genes and no relevant answers have been obtained.

By considering the high thyroid cancer incidence and the relationship with ionizing radiation, we decided to study some BER and HRR genes, involved in ionizing damage repair, to know if any association exists between thyroid cancer and those genes. The aim of the study was to evaluate the risk association between polymorphisms in the OGG1, XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and differentiated thyroid cancer (DTC) in a large Spanish population. It must be emphasized that, until now, this is the largest group of thyroid cancer patients in an association study with repair genes.

2. Materials and methods

2.1. Study subjects

The study population consists in 881 subjects, including 402 patients with DTC and 479 healthy volunteer individuals from the same geographic area. General characteristics of patients and controls are indicated in Table 1. Case patients were recruited between 2004 and 2008 at the Hospital Universitari Vall d'Hebron in

Barcelona and at the Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta (Spain) and all cases were incident. No specific exclusion criteria were lowed and practically all new cases agreed to participate in the study. Clinical information of patients was obtained from medical records and thyroid cancer patients were diagnosed as bearing papillary (84.3%) or follicular (14.7%) tumors. Four patients (1%) were classified as others for doubts in the histopathological records, but they were not medullary thyroid patients. Control individuals were recruited mainly from university workers and healthy people attending the hospital for routinely health controls (30%).

Informed consent from all participants and clearance from the Ethical Committees of the participating Institutions were obtained.

Regarding the ethnicity of the populations, both control and cases were mainly Caucasian (96% and 98%, respectively). Concerning the occupational activity of patients, we have available only the 11% of cases; the principal activities were distributed between housemakers, administrative, salespersons, cleaners and medical care. None related to ionizing radiation related jobs.

From the 59% of cases, 96% presented thyroid nodules. Due to radiotherapy with ¹³¹I, the mean accumulated dose on those patients was of 150.37 mCi \pm 87.53 (mean \pm S.D.), with a minimum accumulated dose of 30 mCi and a maximum of 890 mCi. Information corresponding to the administered doses of radioiodine only was available for the 60% of cases.

2.2. DNA extraction

DNA for both cases and controls was isolated preferentially from peripheral blood samples, using the standard phenol–chloroform method. For some controls, DNA was obtained from saliva samples using the Oragen DNA Self-Collection kit (DNA Genotek, Canada).

2.3. SNPs selection

SNPs at the OGG1, XRCC1, XRCC2 and XRCC3 genes were initially identified through literature searches and the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The selection criteria were based on the minor allele frequency (>0.05). The five SNPs selected for genotyping were: Ser326Cys [C9798773G, rs1052133] for OGG1; Arg280His (G44056412A, rs25489) and Arg399Gln (G44055726A, rs25487) for XRCC1; Arg188His (G152346007A, rs3218536) for XRCC2 and (A104165927G, rs1799796) for XRCC3.

2.4. SNP genotyping

The SNP genotyping was performed at the Genotype National Centre of Spain (CeGen) using the iPLEX (Sequenom, Inc.) technique. To assure the genotyping reliability, 10% of the samples were randomly selected and double genotyped by replicates in multiple 96 well plates. In addition, two HapMap reference trios were

Table 2
Allele and genotype frequencies of the selected SNPs and their associations with differentiated thyroid cancer.

Gene	SNP amino acid change	MAF			Genotype	Control n (%)	Cases n (%)	Adjusted OR (95% CI) ^a	P-value ^{b,c}
		Control	Cases	P					
OGG1	rs1052133 Ser326Cys	0.21	0.21	0.99	C/C	294 (63)	253 (63.7)	1.00	0.74
					C/G	154 (33)	125 (31.5)	0.97 (0.72–1.31)	
					G/G	19 (4.1)	19 (4.8)	1.28 (0.65–2.51)	
XRCC1	rs25489 Arg280His	0.05	0.08 ^b	0.99	G/G	426 (90.1)	337 (84.7)	1.00	0.087
					G/A	44 (9.3)	58 (14.6)	1.61 (1.05–2.46)	
					A/A	3 (0.6)	3 (0.8)	1.22 (0.24–6.24)	
					G/G vs G/A+A/A	47 (9.9)	61 (15.3)	1.58 (1.05–2.40)	
						196 (41.4)	153 (39.6)	1.00	
XRCC1	rs25487 Arg399Gln	0.36	0.36	0.02	G/A	212 (44.7)	186 (48.2)	1.17 (0.87–1.57)	0.47
					A/A	66 (13.9)	47 (12.2)	0.94 (0.61–1.46)	
						383 (80.3)	314 (79.1)	1.00	
XRCC2	rs3218536 Arg188His	0.1	0.11	0.58	G/G	90 (18.9)	79 (19.9)	1.12 (0.80–1.59)	0.75
					G/A	4 (0.8)	4 (1)	1.36 (0.33–5.63)	
					A/A	267 (55.9)	236 (59.3)	1.00	
XRCC3	rs1799796 IVS7-14	0.25	0.23	0.17	A/G	179 (37.5)	145 (36.4)	0.94 (0.71–1.25)	0.34
					G/G	32 (6.7)	17 (4.3)	0.63 (0.34–1.18)	

MAF, minor allele frequency.

^a OR, adjusted by gender and age. The codominant model is shown.

^b P-value corresponding to codominant model.

^c P-value corresponding to dominant model.

incorporated in plates and the genotype concordance and correct Mendelian inheritance were verified.

2.5. Statistical analysis

The analysis of association, linkage disequilibrium and haplotype frequency estimations were performed using the web tool for SNP analysis SNPStats [29]. Logistic regression for codominant inheritance model was performed. All analyses were adjusted for gender and age. The haplotypes frequencies were estimated via the Expectation Maximization algorithm and the association between haplotypes and DTC was analyzed via logistic regression using the same web tool. Test for Hardy–Weinberg equilibrium in control group was conducted by Chi-square test. Other statistical analysis was done using SPSS Statistics for Windows OS version 17.0 and G-Stat 2.0.

3. Results

The characteristics of the 402 thyroid cancer patients and 479 controls are summarized in Table 1. No statistical differences among patients and controls in terms of mean age were found; however, females were more frequent in the thyroid cancer group (77.6%) than in the control group (59.1%). The genotype distribution within genders was analyzed for both groups and no statistically significant differences were observed. Thus, the different gender proportion in patient and control groups does not appear to affect the association analysis in this sample set. In addition, the association analysis was carried out with gender and age adjustment.

3.1. Association analysis

In our study the minor allele frequency (MAF) range was 0.05–0.36 for controls. The frequencies for the allele variants at rs1052133 (326Cys), rs25487 (399Gln) and rs3218536 (188His) are equivalent to those reported in the NCBI Single Nucleotide Polymorphism Database for European populations, but slight differences for rs25489 (280His) and rs1799796 (IVS7-14G) were observed.

Allele and genotype frequencies for the five studied SNPs, as well as the association analysis with DTC, are shown in Table 2. The Hardy–Weinberg equilibrium test for the control group showed P-values > 0.05 for all SNPs, indicating the existence of equilibrium. When allele frequencies were compared between cases and control, statistical differences were only found for the Arg280His SNP (P = 0.0253) of the XRCC1 gene.

The odds ratio (OR) and their 95% confidence intervals were calculated by logistic regression analyses with adjustment for age and gender. The codominant model of inheritance for the five SNPs is shown in Table 2. Additionally, the dominant model for the SNP Arg280His of XRCC1 is also shown. No significant differences in ORs were observed between control and thyroid cancer patients in four of the five SNPs studied. Only a significant association for the Arg280His SNP (XRCC1) was found for the dominant models (OR = 1.58, 95% CI 1.05–2.46, P = 0.027) and reaching significance with the codominant model (OR = 1.61, 95% CI 1.05–2.46, P = 0.087). When data was stratified according to the histopathological subtype of thyroid cancer no associations were observed, inclusive for the Arg280His polymorphism of the XRCC1 gene, where a P-value of 0.06 was observed for the papillary type in the dominant inheritance model (data not shown). This lack of significant association is undoubtedly due to the low number of homozygous individuals for the variant allele and the low frequency of the variant allele at this locus.

3.2. Haplotype analysis of XRCC1 polymorphisms

Haplotype analysis was performed for the two SNPs of XRCC1 and the results are indicated in Table 3. Three haplotypes were predicted to have a frequency > 0.01. The fourth haplotype, with the two variant alleles, was predicted to be too rare for meaningful statistical analysis. The haplotype A–G (haplotype 3) containing the risk allele in the His280 locus (G/A) showed a significant increased risk (OR = 1.53, 95% CI 1.03–2.28, P = 0.034), probably due to the effect of the A allele of the 280 locus.

3.3. Gene–gene interaction

The joint effect of any genetic combination of the two BER repair genes (OGG1 and XRCC1) and the two HRR genes (XRCC2 and XRCC3) were evaluated. No interaction was observed for the BER genes (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg280His), however, the statistical analysis between the HRR genes (XRCC2 Arg188His, XRCC3 IVS7-14A>G) show an interaction with a weak protective effect (OR = 0.12, 95% CI 0.01–0.96, P = 0.051) but the number of individuals with genotypes combination (when the minor frequency allele is present) are not adequate to consider the results as statistically strong.

Table 3
Analysis of association for *XRCC1* haplotypes in control and thyroid cancer groups.

Haplotype	rs25489	rs25487	Haplotype frequency		Adjusted OR (95% CI) ^a	P-value
			Controls	Patients		
1	G	G	0.584	0.558	1.00	–
2	G	A	0.363	0.362	1.07 (0.87–1.32)	0.52
3	A	G	0.053	0.079	1.53 (1.03–2.28)	0.034

^a OR adjusted by gender and age.

4. Discussion

Radiation exposure during childhood is a known factor for thyroid cancer, and polymorphisms in DNA repair genes are likely to affect this risk. For this reason we have evaluated the association between five SNPs of four DNA repair genes and DTC. Four polymorphisms correspond to amino acid changes with missense function [Ser326Cys (*OGG1*); Arg280His and Arg399Gln (*XRCC1*); Arg188His (*XRCC2*)], while one corresponds to an intronic change [IVS7-14A>G (*XRCC3*)]. Our results showed a significant association only for the *XRCC1* gene (Arg280His).

In contrast to the clear association between DTC incidence and ionizing radiation exposure, few studies have been designed to determine the role of DNA repair genes as modulators of DTC risk. Our results have been obtained from a large population (479 controls and 402 cases) compared to previous studies reported in literature. This gives special relevance to our data.

To our knowledge, no association studies exist on *OGG1* gene polymorphism with DTC. In spite of this lack of data for DTC patients, *OGG1* polymorphisms have been widely evaluated in different case–control studies, and associations have been reported for different cancers such as prostate, smoking-associated lung, gallbladder and breast cancer [7,30–32]. These positive associations would agree with the experimental evidences obtained using the comet assay, after challenging with 2 Gy of γ -rays, where individuals homozygous for Ser326 show a lower residual DNA damage, compared with heterozygous and homozygous for 326Cys [33]. In addition, a recent study has shown the low glycosylase activity of the 326Cys allele, suggesting that individuals homozygous for this variant could accumulate more mutations under conditions of oxidative stress [34]. In spite of these reported effects for the 326Cys (*OGG1*) variant, our results showed not significant differences between control and DTC patient groups.

The *XRCC1* gene, as it occurs with the *OGG1* gene, is involved in the BER repair pathway. Although lines of evidence have shown the potential biological significance of common polymorphisms at the *XRCC1* gene, the genetic epidemiological studies on cancer risk have not reached conclusive results [7,35]. Three association studies between *XRCC1* and DTC have been recently reported with contradictory results. Thus, the 399Gln variant has been reported to be associated with a decrease in the risk to develop thyroid cancer [22,23] analyzing around 250 patients from Chernobyl and Texas, respectively. On the other hand, no association was observed in a Taiwanese population with a similar sample size (283 DTC patients) [21]. These negative findings are in agreement with the lack of association found in our study for this allele variant.

In the above cited populations of Taiwan [21], Russia and Belorussia [22] no association were observed for the Arg280His polymorphism of the *XRCC1* gene. Nevertheless, these negative results contrast with our positive findings (OR=1.58, 95% CI 1.05–2.46, $P=0.029$) showing a smoothed increase of risk for carriers of this SNP. Several studies have shown a loss of function for the 280His allele [17,36], which would support our positive results and, in addition, heterozygous individuals for this variant showed increased levels of DNA damage after exposure to cobalt or hard metal dusts [37]. Moreover, a positive association has been

found between the 280His allele and breast cancer risk [38] and a meta-analysis on a total of 11,957 cancer cases and 14,174 control subjects from 38 published case-control studies suggest that Arg280His must be considered as a biomarker of susceptibility [35]. At this point, our positive finding would reinforce the possible role of this variant in DTC risk.

It is plausible that genes involved in the same pathway may have a collective effect on DNA repair outcomes. *XRCC1* may interact with the *ADPRT* gene increasing the risk of cancer of esophagus [39], lung [40], stomach [41] and DTC [21]. However, in our study we found no interactions between *XRCC1* and *OGG1*.

The *XRCC2* gene is involved in the HR repair pathway. A possible association of the Arg188His polymorphism with cancer risk must be biologically plausible since the non-conservative substitution or deletion of amino acid 188 can significantly affect cellular sensitivity to DNA damage [42]. However, in a recent study with a Portuguese population constituted by only 109 patients, the 188His allele did not show any significant association with thyroid cancer incidence [26]. These results agree with our study showing a lack of association for this variant. Although *in vitro* experiments with chicken DT40 repair mutants cells *Xrcc2*–/– complemented with variant *XRCC2* Arg188His cDNA were more tolerant to cisplatin [43], this variant did not show association with colorectal cancer [44] and with breast cancer [45], although a slightly increase in prostate cancer was observed [46].

XRCC3 is also involved in the repair of double-strand breaks by HR. Its IVS7-14 polymorphism resides in the intronic region and its functional significance has not yet been elucidated. However, alterations in splicing can cause disease directly, modifying the severity of the disease phenotype, or be linked with disease susceptibility [47]. This allele was significantly associated with the risk of developing late radiotherapy reactions in patients treated for gynaecological tumors, indicating that this variant is associated with harmful effects to healthy cells [48]. Several association studies have been carried out with this polymorphism with conflicting results. Although a significant decrease in breast cancer risk was found in a UK population [49], no significant differences were found for a USA population [39]. On the other hand, the results of a meta-analysis indicated a weak association for breast cancer [50]. In thyroid cancer patients two association studies with *XRCC3* have been reported [26,27], but using a Thr241Met polymorphism, indicating that individuals homozygous for the variant allele had a significantly increased risk for thyroid cancer. Although strong linkage disequilibrium exists between the IVS7-14A allele and the 241Met allele [51], our study does not provide evidence of any association between IVS7-14A allele and the risk of DTC.

The lack of association obtained for the evaluated *XRCC2* and *XRCC3* polymorphisms are accordant with the information reported in a recent meta-analysis with 37,369 breast cancer patients [45], as previously observed in Polish and Cypriot populations [38,50]. When the minor frequency allele is present (*XRCC2* 188His and *XRCC3* IVS7-14G), a weak protective effect (OR=0.12, 95% CI 0.01–0.96, $P=0.051$) was detected in the interaction analysis but the P -value, and the very small number of the individuals with this genotype combination (data not show) were not sufficient to consider the existence of an interaction effect.

In a recent revision on different germ-line DNA polymorphisms and their role on DTC, alterations in DNA repair mechanisms are included as a risk factor [52]. Nevertheless, no clear conclusions were obtained due to the low number of patients included in most of the studies, and only two genes showed a positive association (*CHEK2* and *XRCC3*). The other genes included in the study (*XRCC7*, *RAD51*, *RAD52*, *BRCA1* and *BRCA2*) did not show any relevant role in thyroid cancer risk. Our data, which include a high number of DTC patients, have relevance to open a discussion on the role of DNA repair polymorphisms in thyroid cancer risk.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank all subjects participating in this study, as well as to the members of the Nuclear Medicine Service, Hospital Vall d'Hebron (Barcelona) and the Epidemiological Unit of the Hospital Josep Trueta (Girona) for providing patient blood samples. Aida Baida, Eddy González-Flores, Esteban-Mariano Giménez, Abdel-Mounaim Akdi, and Cristian Valiente actively participated in collecting and preparing the samples for genotype analysis. This work was partially funded by the Spanish Ministry of Education and Science (project SAF2007-6338) and the Generalitat de Catalunya (CIRIT; 2009SGR-725). W.A. García-Quispes was supported by a predoctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona (PIF).

References

- [1] L.A. Akslen, T. Haldorsen, S.O. Thoresen, E. Glattre, Survival and causes of death in thyroid cancer: a population-based study of 2479 cases from Norway, *Cancer Res.* 51 (1991) 1234–1241.
- [2] B. Aschebrook-Kilfoy, M.H. Ward, M.M. Sabra, S.S. Devesa, Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992–2006, *Thyroid* 21 (2011) 125–134.
- [3] C.P. Gilfillan, Review of the genetics of thyroid tumours: diagnostic and prognostic implications, *ANZ J. Surg.* 80 (2010) 33–40.
- [4] S. Preston-Martin, S. Franceschi, E. Ron, E. Negri, Thyroid cancer pooled analysis from 14 case–control studies: what have we learned? *Cancer Causes Control* 14 (2003) 787–789.
- [5] F. Papadopoulou, E. Efthimiou, Thyroid cancer after external or internal ionizing irradiation, *Helv. J. Nucl. Med.* 12 (2009) 266–270.
- [6] K. Hemminki, X. Li, Familial risk of cancer by site and histopathology, *Int. J. Cancer* 103 (2003) 105–109.
- [7] R.J. Hung, J. Hall, P. Brennan, P. Boffetta, Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review, *Am. J. Epidemiol.* 162 (2005) 925–942.
- [8] J.H. Hoeymakers, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature* 411 (2001) 366–374.
- [9] M. Berwick, P. Vineis, Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review, *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (2000) 874–897.
- [10] M. Manuguerra, F. Saletta, M.R. Karagas, M. Berwick, F. Veglia, P. Vineis, G. Matullo, XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review, *Am. J. Epidemiol.* 164 (2006) 297–302.
- [11] A. Naccarati, B. Pardini, K. Hemminki, P. Vodicka, Sporadic colorectal cancer and individual susceptibility: a review of the association studies investigating the role of DNA repair genetic polymorphisms, *Mutat. Res.* 635 (2007) 118–145.
- [12] I. Hiroshi, K. Mitsuhashi, Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA, *Biol. Pharm. Bull.* 27 (2004) 480–485.
- [13] L. Le Marchand, T. Donlon, A. Lum-Jones, A. Seifried, L.R. Wilkens, Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 11 (2002) 409–412.
- [14] J. Xu, S.L. Zheng, A. Turner, S.D. Isaacs, K.E. Wiley, G.A. Hawkins, B.L. Chang, E.R. Blecker, P.C. Walsh, D.A. Meyers, et al., Associations between hOGG1 sequence variants and prostate cancer susceptibility, *Cancer Res.* 62 (2002) 2253–2257.
- [15] T. Okasaka, K. Matsuo, T. Suzuki, H. Ito, S. Hosono, T. Kawase, M. Watanabe, Y. Yatabe, T. Hida, T. Mitsudomi, et al., hOGG1 Ser326Cys polymorphism and risk of lung cancer by histological type, *J. Hum. Genet.* 54 (2009) 739–745.
- [16] S. Marsin, A.E. Vidal, M. Sossou, J. Ménissier-de Murcia, F. Le Page, S. Boiteux, G. de Murcia, J.P. Radicella, Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 44068–44074.
- [17] J. Schneider, V. Classen, S. Helmig, XRCC1 polymorphism and lung cancer risk, *Exp. Rev. Mol. Diag.* 8 (2008) 761–780.
- [18] J. Zipprich, M.B. Terry, P. Brandt-Rauf, G.A. Freyer, Y. Liao, M. Agrawal, I. Gurvich, R. Senie, R.M. Santella, XRCC1 polymorphisms and breast cancer risk from the New York Site of the Breast Cancer Family Registry: a family-based case–control study, *J. Carcinog.* 16 (9) (2010) 4.
- [19] Y. Yang, X.D. Zhai, L.B. Gao, S.L. Li, Z. Wang, G.D. Chen, Genetic polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 and risk of uterine leiomyoma, *Mol. Cell. Biochem.* 338 (2010) 143–147.
- [20] E.L. Goode, C.M. Ulrich, J.D. Potter, Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 11 (2002) 1513–1530.
- [21] F.Y. Chiang, C.W. Wu, P.J. Hsiao, W.R. Kuo, K.W. Lee, J.C. Lin, Y.C. Liao, S.H. Juo, Association between polymorphisms in DNA base excision repair genes XRCC1, APE1, and ADPRT and differentiated thyroid carcinoma, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 5919–5924.
- [22] N.M. Akulevich, V.A. Saenko, T.I. Rogounovitch, V.M. Drozd, E.F. Lushnikov, V.K. Ivanov, N. Mitsutake, R. Kominami, S. Yamashita, Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma, *Endocrinol. Rel. Cancer* 16 (2009) 491–503.
- [23] T. Ho, G. Li, J. Lu, C. Zhao, Q. Wei, E.M. Sturgis, Association of XRCC1 polymorphisms and risk of differentiated thyroid carcinoma: a case–control analysis, *Thyroid* 19 (2009) 129–135.
- [24] R.D. Johnson, N. Liu, M. Jasin, Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination, *Nature* 401 (1999) 397–399.
- [25] M.A. Brenneman, A.E. Weiss, J.A. Nickoloff, D.J. Chen, XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination, *Mutat. Res.* 459 (2000) 89–97.
- [26] H.N. Bastos, M.R. Antão, S.N. Silva, A.P. Azevedo, I. Manita, V. Teixeira, J.E. Pina, O.M. Gil, T.C. Ferreira, E. Limbert, et al., Association of polymorphisms in genes of the homologous recombination DNA repair pathway and thyroid cancer risk, *Thyroid* 19 (2009) 1067–1075.
- [27] E.M. Sturgis, C. Zhao, R. Zheng, Q. Wei, Radiation response genotype and risk of differentiated thyroid cancer: a case control analysis, *Laryngoscope* 115 (2005) 938–945.
- [28] S. Michiels, A. Laplanche, T. Boulet, P. Dessen, B. Guillonnet, A. Méjean, F. Desgrandchamps, M. Lathrop, A. Sarasin, S. Benhamou, Genetic polymorphisms in 85 DNA repair genes and bladder cancer risk, *Carcinogenesis* 30 (2009) 763–768.
- [29] X. Solé, E. Guinó, J. Valls, R. Iniesta, V. Moreno, SNPStats: a web tool for the analysis of association studies, *Bioinformatics* 22 (2006) 1928–1929.
- [30] A.R. Trzeciak, S.G. Nyaga, P. Jaruga, A. Lohani, M. Dizdaroglu, M.K. Evans, Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145, *Carcinogenesis* 25 (2004) 1359–1370.
- [31] A. Srivastava, K. Srivastava, S.N. Pandey, G. Choudhuri, B. Mittal, Single-nucleotide polymorphisms of DNA repair genes OGG1 and XRCC1: association with gallbladder cancer in North Indian population, *Ann. Surg. Oncol.* 16 (2009) 1695–1703.
- [32] W. Yuan, L. Xu, Y. Feng, Y. Yang, W. Chen, J. Wang, D. Pang, D. Li, The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis, *Breast Cancer Res. Treat.* 122 (2010) 835–842.
- [33] P. Aka, R. Mateuca, J.P. Buchet, H. Thierens, M. Kirsch-Volders, Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutat. Res.* 556 (2004) 169–181.
- [34] A. Bravard, M. Vacher, E. Moritz, L. Vaslin, J. Hall, B. Epe, J.P. Radicella, Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity, *Cancer Res.* 69 (2009) 3642–3649.
- [35] Z. Hu, H. Ma, F. Chen, Q. Wei, H. Shen, XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case–control studies, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 14 (2005) 1810–1818.
- [36] J. Tuimala, G. Szekelely, S. Gundy, A. Hirvonen, H. Norppa, Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity, *Carcinogenesis* 23 (2002) 1003–1008.
- [37] R. Mateuca, P.V. Aka, M. De Boeck, R. Hauspie, M. Kirsch-Volders, D. Lison, Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts, *Toxicol. Lett.* 156 (2005) 277–288.
- [38] M.A. Loizidou, T. Michael, S.L. Neuhausen, R.F. Newbold, Y. Marcou, E. Kakouri, M. Daniel, P. Papadopoulou, S. Malas, K. Kyriacos, et al., Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and risk of breast cancer in Cyprus, *Breast Cancer Res. Treat.* 112 (2008) 575–579.
- [39] J. Han, S.E. Hankinson, H. Ranu, I. De Vivo, D.J. Hunter, Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and breast cancer risk in the Nurses' Health Study, *Carcinogenesis* 25 (2004) 189–195.
- [40] Z. Zhang, J. Wan, X. Jin, T. Jin, H. Shen, D. Lu, Z. Xia, Genetic polymorphisms in XRCC1, APE1, ADPRT, XRCC2, and XRCC3 and risk of chronic benzene poisoning in a Chinese occupational population, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 14 (2005) 2614–2619.
- [41] X. Miao, X. Zhang, L. Zhang, Y. Guo, B. Hao, W. Tan, F. He, D. Lin, Adenosine diphosphate ribosyl transferase and X-ray repair cross-complementing 1 polymorphisms in gastric cardia cancer, *Gastroenterology* 131 (2006) 420–427.
- [42] S. Rafii, P. O'Regan, G. Xinarianos, I. Azmy, T. Stephenson, M. Red, M. Meuth, J. Thacker, A. Cox, A potential role for the XRCC2 R188H polymorphic site in DNA-damage repair and breast cancer, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 1433–1438.
- [43] P. Danoy, E. Sonoda, M. Lathrop, S. Takeda, F. Matsuda, A naturally occurring genetic variant of human XRCC2 (R188H) confers increased resistance to

- cisplatin-induced DNA damage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352 (2007) 763–768.
- [44] K. Curtin, W.Y. Lin, R. George, M. Katory, J. Shorto, L.A. Cannon-Albright, G. Smith, D.T. Bishop, A. Cox, N.J. Camp, Genetic variants in XRCC2: new insights into colorectal cancer tumorigenesis, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 18 (2009) 2476–2484.
- [45] K.D. Yu, A.X. Chen, L.X. Qiu, L. Fan, C. Yang, Z.M. Shao, XRCC2 Arg188His polymorphism is not directly associated with breast cancer risk: evidence from 37369 subjects, *Breast Cancer Res. Treat.* 123 (2010) 219–225.
- [46] C.H. van Gils, R.M. Bostick, M.C. Stern, J.A. Taylor, 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. Biomark. Prev.* 11 (2002) 1279–1284.
- [47] G.S. Wang, T.A. Cooper, Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 749–761.
- [48] K. De Ruyck, M. Van Eijkeren, K. Claes, R. Morthier, A. De Paepe, A. Vral, L. De Ridder, H. Thierens, 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 (2005) 1140–1149.
- [49] B. Kuschel, A. Auranen, S. McBride, K.L. Novik, A. Antoniou, J.M. Lipscombe, N.E. Day, D.F. Easton, B.A. Ponder, P.D. Pharoah, et al., Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 1399–1407.
- [50] M. García-Closas, K.M. Egan, P.A. Newcomb, L.A. Brinton, L. Titus-Ernstoff, S. Chanock, R. Welch, J. Lissowska, B. Peplonska, N. Szeszenia-Dabrowska, et al., 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.* 119 (2006) 376–388.
- [51] L. Jiao, M.M. Hassan, M.L. Bondy, R.A. Wolff, D.B. Evans, J.L. Abbruzzese, D. Li, XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism and risk of pancreatic cancer, *Am. J. Gastroenterol.* 103 (2008) 360–367.
- [52] E. Adjadj, M. Schlumberger, F. de Vathaire, Germ-line DNA polymorphisms and their susceptibility to differentiated thyroid cancer, *Lancet Oncol.* 10 (2009) 181–190.

Are thyroid cancer patients sensitive to ionising radiation?

WILSER-ANDRÉS GARCÍA-QUISPE¹, GISELLE PÉREZ-MACHADO^{1,*},
BERENICE SANDOVAL¹, SUSANA PASTOR^{1,2}, ANTONIA VELÁZQUEZ^{1,2},
PERE GALOFRÉ^{3,†}, JOSEFINA BIARNÉS⁴, JOAN CASTELL³, & RICARD MARCOS^{1,2}

¹Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ²CIBER Epidemiologia y Salud Pública, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, ³Servei de Medicina Nuclear, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, and ⁴Unitat d'Endocrinologia, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain

(Received 3 January 2011; Revised 17 March 2011; Accepted 29 March 2011)

Abstract

Purpose: To determine the ionising radiation sensitivity of peripheral blood lymphocytes in a group of differentiated thyroid cancer (DTC) patients.

Material and methods: A total of 53 thyroid cancer patients (26 women and 27 men) and 50 donors (23 women and 27 men) were included in the study. The cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) in G₀ peripheral blood lymphocytes was carried out using the cytochalasin B technique. Four cultures were established per each donor, two were irradiated with 0.5 Gy ¹³⁷Cs γ -rays, while the other two remained untreated.

Results: No significant differences were observed in the frequency of binucleated cells with micronuclei (BNMN) between patients and controls, for both spontaneous and after the irradiation frequencies. Nevertheless, a positive and significant correlation was found between the frequencies of both spontaneous and after irradiation DNA damage, for control and patient groups.

Conclusions: We have found that DTC patients do not present particular sensitivity to ionising radiation when an in vitro treatment is performed in G₀ stage of the cell cycle, but this result does not discard the hypothesis about an increased sensitivity in other stages of the cell cycle in DTC patients.

Keywords: thyroid cancer patients, radiosensitivity, micronuclei

Introduction

Thyroid cancer represents about 1% of all cancer burden diagnosed worldwide; despite this, it should be mentioned that thyroid cancer is the most common of endocrine cancers representing more than 95% (Pitt and Moley 2010). This cancer is more common in females than in males, accounting for 2.7% of all incident cancers among women and 0.7% of cancer diagnoses among men (Ferlay et al. 2010).

Although nutritional factors, especially deficiencies in dietary iodine, have been associated with thyroid cancer risk (Dal Maso et al. 2009), exposure to ionising radiation, particularly during infancy or

early childhood, is the only accepted predisposing factor (Gatzidou et al. 2010, Schonfeld et al. 2011). In addition, external radiation has been associated with a wide spectrum of thyroid effects, including hypothyroidism, stimulation of thyroid autoimmunity and the induction of thyroid nodules (Brent et al. 2007).

The direct and indirect DNA damage produced by the ionising radiation (single- or double-strand breaks) is repaired by DNA repair systems. However, alterations in expression levels and polymorphisms of DNA repair genes are considered responsible for induction of thyroid carcinogenesis (Gatzidou et al. 2010). Therefore, evaluating the DNA damage levels

Correspondence: Ricard Marcos, Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain. Tel: +34 935812052. Fax: +34 935812387. E-mail: ricard.marcos@uab.es

*G. Pérez-Machado is currently at Molecular Simulation and Drug Design (CBQ), Central University of Las Villas, Santa Clara, Cuba.

†Pere Galofré is currently at Servei de Medicina Nuclear, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain.

when an exposure (in vivo or in vitro) takes place, could give important information about the function in the DNA repair systems.

The micronucleus assay in human lymphocytes is one of the most commonly used methods for measuring DNA damage rates in human populations because micronucleus (MN) are more easy to be scored than chromosome aberrations (Bonassi et al. 2001, Fenech 2002). Furthermore, the levels of MN in peripheral blood lymphocytes are considered as a real 'biological dosimeter' for radiation exposure of patients undergoing radiation therapy or of subjects accidentally exposed to radiation (reviewed by Ballardin et al. 2002). MN are found in interphase cells as small, extranuclear bodies resulting from chromosome breaks and/or whole chromosomes that did not reach the spindle poles during the cell division (Decordier et al. 2009).

The use of the MN assay to evaluate individual ionising radiation sensitivity has been reported as a useful tool to determine the intrinsic sensitivity to ionising radiation in cancer patients, as well as in human immunodeficiency virus (HIV)-positive individuals (Scott et al. 1998, Mozdarani et al. 2005, Baeyens et al. 2010). Sensitivity to ionising radiation has been reported among patients with cancer prone syndromes (Mozdarani et al. 2005, Chistiakov et al. 2008); thus, chromosomal radiosensitivity is considered as an important biomarker of cancer predisposition (Tucker et al. 1997, Mozdarani et al. 2005).

The aim of the present study was to evaluate if individuals suffering thyroid cancer are particularly sensitive to ionising radiation. To demonstrate this, we carried out an in vitro study to determine the ionising radiation sensitivity of peripheral blood lymphocytes in a group of differentiated thyroid cancer (DTC) patients. This study was performed by using the cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) as a biomarker of genomic instability.

Materials and methods

Patients and controls

The study was carried out in a total of 53 thyroid cancer patients (26 [46%] women and 27 [54%] men) recruited from both the Nuclear Medicine Service, at the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona, and the Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta in Girona (Spain). The average age of patients was 51.4 ± 14.5 (mean \pm standard deviation [SD]), ranging from 22–76 years. According to the tumour-type, 46 (87%) of them were classified as papillary and seven (13%) as follicular.

Blood samples were collected prior to iodine treatment (^{131}I) and all patients gave informed

consent to participate in the study. As reference group, 50 donors (23 [46%] women and 27 [54%] men) were selected from a healthy population without previous history of cancer and not exposed to genotoxic agents (as irradiation) in the last year. The average age of the control group was 51.6 ± 14.4 (mean \pm SD) ranging from 16–80 years. Neither controls nor patients are professionally exposed to radiation.

All participants completed a questionnaire, covering standard demographic questions, as well as a brief occupational, medical, and family history. The histological classification of the tumour was obtained from the medical records. The study was approved by the Ethics Committees from both hospitals.

Cell culture and in vitro irradiation

The cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) was carried out using the cytochalasin B technique and following a standard procedure (Kirsch-Volders et al. 2000). Blood samples were taken by venipuncture and 0.5 ml of heparinised blood was diluted with 4.5 ml of complete culture medium consisting of RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) supplemented with 15% foetal bovine serum (PAA Laboratories), 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) (PAA Laboratories) and 1% l-glutamine (PAA Laboratories). Lymphocytes were stimulated to divide with 1% phytohaemagglutinin (PHA) (Gibco San Diego CA USA).

Four cultures were established per each donor. Two were irradiated with 0.5 Gy $^{137}\text{Cesium}$ (Cs) γ -rays, while the other two remain untreated. Irradiation was carried out at the Unitat Tècnica de Protecció Radiològica (UTPR-UAB) of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). The irradiator was an IBL 437C, type H, No. 701 (SCHERING CIS Bio International, Gif sur Yvette, France) containing up to 189 TBq (terabecquerel) (5100 curies) of Cesium 137. Samples were loaded into the 3.8 l canister and installed into the unit. Proximity sensors check the closing of the door and the positioning of the canister. Time was set in seconds, through a digital timer. When the IBL 437C is activated from the control panel, the drum rotates 180° for exposure to radiation sources. Simultaneously the sample canister begins its rotation at 0.02 g to provide a homogeneous dose to the samples. The dose rate was 6.0 Gy min^{-1} . Lymphocytes (irradiated and non-irradiated) were cultured at 37°C for 72 h. At 44 h after PHA stimulation, 10 μl (3 mg/ml) of cytochalasin B (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to give a final concentration in culture of 6 $\mu\text{g/ml}$. Cultures were maintained at 37°C and 5% CO_2 .

Cell harvesting and MN scoring

Cells were collected by centrifugation (10 min to 120 *g*). The supernatant was discarded after each centrifugation. The hypotonic treatment was carried out adding 5 ml of KCl 0.075 M at 4°C for 10 min. Next, cells were centrifuged and a methanol/acetic acid mixture (3:1 v/v) was gently added. This fixation step was repeated twice and the resulting cells were re-suspended in a small volume of fixative solution. Air-dried preparations were made and the slides were stained with 10% Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in phosphate buffer (pH 6.8) for 7 min.

To detect the genetic damage levels, the frequency of binucleated cells with micronuclei (BNMN) was evaluated. A total of 1000 binucleated cells per sample (irradiated and non-irradiated) were analysed to determine the frequency of BNMN according to standard criteria (Fenech 2000, Fenech et al. 2003). The effect of irradiation was calculated by subtracting the spontaneous BNMN frequency in the non-irradiated sample from the obtained in the irradiated sample. The result value indicates the radiation induced BNMN frequency and was used as measure of individual sensitivity to ionising radiation.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the SPSS Statistics for Windows OS version 17.0 and G-Stat 2.0. The distribution of the data on DNA damage (spontaneous BNMN, after irradiation BNMN and induced BNMN frequencies) in both, control and patient groups, does not depart significantly from the normal distribution; therefore, Student's *t*-test was considered adequate for the statistical analysis. The Chi-square test was used to evaluate differences in gender proportions.

Results

A previous analysis of the characteristics of the selected groups indicated that there were not significant differences between groups for age (*t*-test, $P=0.95$) and gender (Chi-square, $P=0.76$).

The DNA damage is indicated as the absolute frequency of binucleated cell with one or more micronuclei (BNMN). The spontaneous and after-irradiation BNMN frequencies were slightly higher in patients than in controls, although the *P*-values did not reach statistical significance (Table I).

It is also observed that the parameter radiation induced BNMN does not show significant differences between patients and controls. Although females, in both controls and patients, showed higher spontaneous and after irradiation BNMN frequen-

cies, significant differences were only found for the spontaneous BNMN in the control group. Thus, the BNMN values for female and male were 8.3 vs. 5.1 and 8.9 vs. 6.3 for control and patients, respectively (data not shown).

When data was stratified according to cancer diagnosis (papillary or follicular subtype) patients with follicular thyroid cancer showed higher spontaneous BNMN values (7.1 vs. 10.1) (data not show). However, it must be remembered that the size of the follicular subgroup was smaller than the papillary subgroup (7 vs. 46) and, probably this could be the reason of the lack of signification.

To evaluate the association between the spontaneous and after irradiation BNMN values, Pearson correlation coefficient was used. A positive and significant correlation was found between spontaneous and after irradiation DNA damage levels. This effect was detected in both control and patient groups ($P=0.036$, $R=0.297$ in control; $P<0.001$, $R=0.473$ in patients) (Figure 1).

Table I. DNA damage observed in control and patient groups.

BNMN	Controls	Patients	<i>P</i> -value ^a
	Mean ± SD	Mean ± SD	
Spontaneous	6.6 ± 4.4	7.6 ± 5.7	0.349
After irradiation	31.6 ± 14.3	32.9 ± 15.4	0.658
Radiation induced	25.1 ± 13.5	25.4 ± 13.6	0.901

Frequency of radiation induced BNMN (binucleated cells with micronuclei) = frequency of BNMN after irradiation – frequency of spontaneous BNMN. SD, standard deviation; ^aStudent's *t*-test.

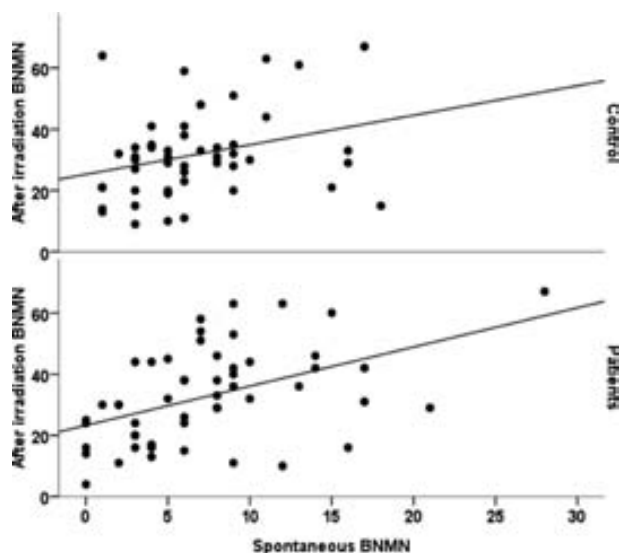


Figure 1. Correlation between spontaneous and after irradiation DNA damage, for both control (up) and patient (down) groups. The line show the positive correlation between both variables in control and patients groups ($P=0.036$, $R=0.297$ in control; $P<0.0001$, $R=0.473$ in patients).

Discussion

The connection between cancer predisposition and radiosensitivity suggest that chromosomal radiosensitivity has to be carefully investigated as a possible marker of cancer proneness (Poggioli et al. 2010). Radiosensitivity can be considered as a measure of individual susceptibility to chemical and physical exposure; thus, each individual reacts in a different way to external stimuli, activating a series of biological responses, including DNA repair machinery (Sterpone et al. 2010).

Several biomarkers are used to evaluate the genotoxic effects induced by radiation exposure as, i.e., frequency of dicentric, of histone H2 variant H2AX (γ -H2AX) foci and micronuclei (Olive and Banáth 2004, El-Zein et al. 2006, Volpato et al. 2008, Lassmann et al. 2010). Moreover, it has been defined that these biomarkers can also be used to evaluate individual sensitivity to ionising radiation, especially in clinical research.

In this study we have used the micronuclei assay, with cytochalasin-B to block cytokinesis (CBMN), because it is a well-established cytogenetic technique, with many advantages over other cytogenetic approaches. It has been demonstrated that CBMN is useful as a marker of DNA damage (Znaor et al. 2003, El-Zein et al. 2006, Murgia et al. 2008). In addition, the CBMN assay has also been considered as a sensitive method for evaluating individual sensitivity to ionising radiation both in vitro and in vivo (Ballardin et al. 2002, Hernández et al. 2006, Vral et al. 2011).

Cancer patients have been the goal of many studies on genomic instability. Thus, the sensitivity to ionising radiation has been demonstrated in cancer patients using the CBMN assay in human lymphocytes (Scott 2004, Mozdarani et al. 2005). As reviewed by Scott (2004), an important part of patients presenting different types of tumours, showed elevated MN frequencies over the controls, after the in vitro irradiation of their lymphocytes.

Nevertheless, no similar data exists in the literature for differentiated thyroid cancer patients. The interest of our study is based not only in the assumed association between DTC incidence and exposure to radiation during childhood previously reported, but in the lack of information on their genomic instability.

In our study, inter-individual variations were found for both control and patient groups, regarding spontaneous and after irradiation BNMN frequencies. This finding corresponds to the heterogeneous genetic background existing in the populations, and it was observed independently if the blood samples were or were not irradiated. Nevertheless, no significant differences were found between controls

and patients for both the spontaneous and ionising radiation-induced DNA damage. This would indicate that no particular radiosensitivity is observed among DTC patients. This is an important finding that contrasts with the data reported for other cancer patients and conflicts with the assumed relationship between DTC incidence and radiation exposure during childhood.

It should be emphasised that we have applied our challenge assay to G₀ lymphocytes and perhaps this stage is not adequate to evaluate the radiosensitivity in DTC patients. It has been reported that sensitivity to ionising radiation in G₀ and G₂ stages is not significantly correlated, and sensitive patients usually have a defect in only one of these stages of the cell cycle (Scott 2004, Howe et al. 2005); therefore, the results shown here do not reject the hypothesis that thyroid cancer patients are sensitive to ionising radiation because this sensitivity could be evident when the cells are in a different stage of the cell cycle.

On the other hand, it is known that radiation sensitivity is modulated by the genetic background and polymorphic genetic variants can play some role in individual sensitivity (Iarmarcovai et al. 2007), although several studies have failed to show such an association (Curwen et al. 2011). This would suggest that radiation susceptibility is likely dependent on many polymorphic genetic variants that have a combined effect on multiple cellular pathways. Thus, depending of the genetic characteristics of the selected donors (patients or controls) responses to radiation can vary significantly. Nevertheless, the size of our sample is large enough to assume that the importance of such underground genetic variants must be neglected.

In spite of this lack of sensitivity for DTC patients, a positive significant correlation between spontaneous and after irradiation DNA damage was observed for both patients and controls. Thus, individuals with low, moderate or high spontaneous values of DNA damage (BNMN) show proportional values of DNA damage after an exposure to ionising radiation. This finding would indicate that the CBMN assay, challenged by in vitro irradiation, can be considered as a biomarker of prognosis to estimate the possible development of secondary effects when the use of therapeutic radiation (internal or external) is considered.

Acknowledgements

We thank all subjects participating in this study, as well as to the members of the Nuclear Medicine Service, Hospital Vall d'Hebron (Barcelona) and the Epidemiological Unit of the Hospital Josep Trueta (Girona) for providing patient blood samples. This work was partially funded by the Spanish Ministry of

Education and Science (project SAF2007-6338) and the Generalitat de Catalunya (CIRIT; 2009SGR-725). W.A. García-Quispes was supported by a predoctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona (PIF).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Baeyens A, Slabbert JP, Willem P, Jozela S, Van Der Merwe D, Vral A. 2010. Chromosomal radiosensitivity of HIV positive individuals. *International Journal of Radiation Biology* 86: 584–592.
- Ballardin M, Gemignani F, Bodei L, Mariani G, Ferdeghini M, Rossi AM, Migliore L, Barale R. 2002. Formation of micronuclei and of clastogenic factor(s) in patients receiving therapeutic doses of iodine-131. *Mutation Research* 514:77–85.
- Bonassi S, Neri M, Puntoni R. 2001. Validation of biomarkers as early predictors of disease. *Mutation Research* 480–481: 349–358.
- Brent GA, Braverman LE, Zoeller RT. 2007. Thyroid health and the environment. *Thyroid* 17:807–809.
- Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA. 2008. Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncologica* 47:809–824.
- Curwen GB, Murphy S, Tawn EJ, Winther JF, Boice JD. 2011. A study of DNA damage recognition and repair gene polymorphisms in relation to cancer predisposition and G2 chromosomal radiosensitivity. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 52:72–76.
- Dal Maso L, Bosetti C, La Vecchia C, Franceschi S. 2009. Risk factors for thyroid cancer: An epidemiological review focused on nutritional factors. *Cancer Causes Control* 20:75–86.
- Decordier I, Papine A, Plas G, Roesems S, Vande Loock K, Moreno-Palomo J, Cemeli E, Anderson D, Fucic A, Marcos R, Soussaline F, Kirsch-Volders M. 2009. Automated image analysis of cytokinesis-blocked micronuclei: An adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring. *Mutagenesis* 24:85–93.
- El-Zein RA, Schabath MB, Etzel CJ, Lopez MS, Franklin JD, Spitz MR. 2006. Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk. *Cancer Research* 66:6449–6456.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. *Mutation Research* 534:65–75.
- Fenech M. 2002. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discovery Today* 7:1128–1137.
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455:81–95.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* 127:2893–2917.
- Gatzidou E, Michailidi C, Tseleni-Balafouta S, Theocharis S. 2010. An epitome of DNA repair related genes and mechanisms in thyroid carcinoma. *Cancer Letters* 290:139–147.
- Hernández A, Xamena N, Gutiérrez S, Velázquez A, Creus A, Surrallés J, Galofré P, Marcos R. 2006. Basal and induced micronucleus frequencies in human lymphocytes with different GST and NAT2 genetic backgrounds. *Mutation Research* 606: 12–20.
- Howe O, Daly P, Seymour C, Ormiston W, Nolan C, Mothersill C. 2005. Elevated G₂ chromosomal radiosensitivity in Irish breast cancer patients: A comparison with other studies. *International Journal of Radiation Biology* 81:373–378.
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsiere T. 2007. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutation Research* 658:215–253.
- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M Jr, Lorge E, Norppa H, Surrallés J, von der Hude W, Wakata A. 2000. Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:167–172.
- Lassmann M, Hänscheid H, Gassen D, Biko J, Meineke V, Reiners C, Scherthan H. 2010. In vivo formation of gamma-H2AX and 53BP1 DNA repair foci in blood cells after radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 51:1318–1325.
- Mozdarani H, Mansouri Z, Haeri SA. 2005. Cytogenetic radiosensitivity of G₀-lymphocytes of breast and esophageal cancer patients as determined by micronucleus assay. *Journal of Radiation Research (Tokyo)* 46:111–116.
- Murgia E, Ballardin M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. 2008. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutation Research* 639:27–34.
- Olive PL, Banáth JP. 2004. Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 58:331–335.
- Pitt SC, Moley JF. 2010. Medullary, anaplastic, and metastatic cancers of the thyroid. *Seminars in Oncology* 37:567–379.
- Poggioli T, Sterpone S, Palma S, Cozzi R, Testa A. 2010. G₀ and G₂ chromosomal assays in the evaluation of sensitivity in a cohort of Italian breast cancer patients. *Journal of Radiation Research* 51:615–619.
- Sterpone S, Cornetta T, Padua L, Mastellone V, Giammarino D, Testa A, Tirindelli D, Cozzi R, Donatto V. 2010. DNA repair capacity and acute radiotherapy adverse effects in Italian breast cancer patients. *Mutation Research* 684:43–48.
- Schonfeld SJ, Lee C, Berrington de González A. 2011. Medical exposure to radiation and thyroid cancer. *Clinical Oncology* Feb 4. 23:244–250.
- Scott D. 2004. Chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer. *Cytogenetics and Genome Research* 104:365–370.
- Scott D, Barber JB, Levine EL, Burrill W, Roberts SA. 1998. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: A test for predisposition? *British Journal of Cancer* 77:614–620.
- Tucker JD, Eastmond DA, Littlefield LG. 1997. Cytogenetic endpoints as biological dosimeters and predictors of risk in epidemiological studies. *IARC Scientific Publications* 142: 185–200.
- Vral A, Fenech M, Thierens H. 2011. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis* 26:11–17.
- Volpato CB, Martínez-Alfaro M, Corvi R, Gabus C, Sauvaigo S, Ferrari P, Bonora E, De Grandi A, Romeo G. 2008. Enhanced sensitivity of the RET proto-oncogene to ionizing radiation in vitro. *Cancer Research* 68:8986–8992.
- Znaor A, Fučić A, Strnad M, Barković D, Škara M, Hozo I. 2003. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes as a possible cancer risk biomarker: A cohort study of occupationally exposed workers in Croatia. *Croatian Medical Journal* 44:441–446.

Influence of DNA repair gene variants on the micronucleus frequency in thyroid cancer patients

¹García-Quispes W.A., ^{1,2}Pastor S., ^{3,4}Galofré P., ⁵Biarnés F., ³Castell J., ^{1,2}Velázquez A., ^{1,2}Marcos R.

¹Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

²CIBER Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Salud Carlos III.

³Servei de Medicina Nuclear, Hospitals Universitaris Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

⁴Present address: Servei de Medicina Nuclear, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain.

⁵Unitat d'Endocrinologia, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain.

*Correspondence to: Ricardo Marcos, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain.

E-mail: ricard.marcos@uab.es

Keywords: Thyroid cancer; Genetic polymorphisms; micronucleus; human lymphocytes

Running title: DNA repair polymorphisms and MN in thyroid cancer

ABSTRACT

The role of different DNA repair genes (*OGG1*, *XRCC1*, *XRCC2* and *XRCC3*), on both the basal and the induced frequency of micronuclei (MN), has been determined in the lymphocytes of a group of 114 patients with differentiated thyroid cancer (DTC). Induced frequency of MN was obtained after treatment of lymphocytes with 0.5 Gy of γ -radiation.

The selected genes are involved in base excision repair (BER) (*OGG1*, Ser326Cys; *XRCC1*, Arg280His and Arg399Gln), and in homologous recombination repair (HRR) (*XRCC2*, Arg188His and *XRCC3*, IVS5-14G). Genotyping was carried out using the iPLEX (Sequenom) technique.

Results indicate that only *OGG1* Ser326Cys polymorphism was able to modulate MN frequency. This effect was only observed in the background MN frequency ($P=0.016$), but not in the MN frequency induced after irradiation. In addition, a strong correlation was observed between basal and induced MN frequency which would suggest an underlying genetic background.

1. Introduction

It is well known that cancer development is influenced by the interaction between genetic and environmental factors. Thus, exposure to ionizing radiation (IR), particularly during childhood, is a well-established risk factor for thyroid cancer and for a wide spectrum of thyroid dysfunctions, including hypothyroidism, stimulation of thyroid autoimmunity, and the induction of thyroid nodules [1,2].

IR exposure produces lesions on DNA, including DNA basis damage and single- and double-strand breaks. Single-strand breaks (SSB) can be produced indirectly when the reactive oxygen species (ROS) generated by IR interact with DNA. Double-strand breaks (DSB) are directly generated by the interaction between IR and DNA, although they can also arise through replication errors [3]. Different DNA repair mechanisms are involved in the processes trying to solve DSB induction but, if they do not work properly, chromosome alterations can appear leading to the formation of micronuclei during cell division.

Repair ability can be modulated by the presence of defined variant alleles in DNA repair genes; such variants might modify the biological responses to exogenous and endogenous DNA insults, both at cellular and tissue level. The existence of genetic polymorphisms can give rise to the appearance of individual susceptibility in those individuals carrying genetic variants, developing different kind of diseases such as cancer [4]. At present, our knowledge of the basic mechanisms of DNA repair has revealed an unexpected complexity, with overlapping specificity within the same pathway, as well as extensive functional interactions between proteins involved in repair pathways [5,6].

Among the different genes and pathways involved in DNA repair, *OGG1* and *XRCC1* genes are involved in base excision repair (BER), while *XRCC2* and *XRCC3* have been reported to be involved in homologous recombination repair (HRR). *OGG1* is a major enzyme responsible for removal of 8-oxoguanine (8-oxoG) adducts, acting in the frontline of the cellular defences against oxidative DNA damage [7]. *XRCC1* is involved in the repair

of SSBs formed by exposure to IR and alkylating agents. Both, OGG1 and XRCC1 proteins, interact during the repair process of DNA damage [4]. On the other hand, XRCC2 and XRCC3 are members of the RecA/Rad51-related protein family and participate in HRR [8]. For these genes, as well as for others involved in DNA repair, a number of polymorphisms have been reported to be associated with the risk of different kinds of cancer; but little information about their intrinsic repair capacity is known for many of them. One approach to determine the role of the different genetic polymorphisms is to demonstrate if cells carrying such variants are sensitive in front of the action of well known genotoxic agents, including IR. In a previous study we have reported a lack of significant differences in radiosensitivity for a group of differentiated thyroid cancer (DTC) patients with respect to their concurrent controls [9]; however, a large variation for both the basal and IR-induced DNA damage was observed among patients. We hypothesize that the differences observed in the levels of DNA damage are associate with a differential function of the proteins involved in the repair mechanisms, due to the presence of genetics variants in the repair genes.

Thus, the aim of this study is to assess the possible influence of genetic polymorphisms in *OGG1* (rs1052133, Ser326Cys), *XRCC1* (rs25487, Arg399Gln; rs25489, Arg280His), *XRCC2* (rs3218536, Arg188His), and *XRCC3* (rs1799796, IVS5-14A>G) on the observed DNA damage (spontaneous and induced by 0.5 Gy of gamma-rays) in lymphocytes of a group of DTC patients. The levels of DNA damage have been evaluated by using the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay, because it is a well-established cytogenetic technique with many advantages over other cytogenetic approaches. It has been well demonstrated that the CBMN assay is very useful as a marker of spontaneous and induced DNA damage [10-12].

2. Materials and methods

2.1. Population studied

The study was carried out in a total of 114 thyroid cancer patients [92 (81%) women and 22 (19%) men] recruited at the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona and the Hospital Universitari Doctor Josep Trueta in Girona (Spain). The average age of patients was 49.96 ± 16.56 years (mean \pm SD). According to the tumour-type, 98 (86%) of them were classified as papillary and 16 (14%) as follicular.

Blood samples were collected prior to iodine treatment (^{131}I). All participants completed a questionnaire, covering standard demographic questions, as well as a brief occupational, medical, and family history. The histological classification of the tumour was obtained from the medical records. The study was approved by the Ethics Committees from both hospitals.

2.2. Cell culture and treatment with IR

The cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) was carried out using the cytochalasin B technique and following a standard procedure [13]. Four cultures were established per each donor. Blood samples were taken by venipuncture and 0.5 mL of heparinised blood was diluted with 4.5 mL of complete culture medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 15% foetal bovine serum, 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) and 1% l-glutamine (all products were from PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). After that, two cultures were irradiated with 0.5 Gy ^{137}Cs γ -rays, while the other two remain untreated. Irradiation was carried out at the Unitat Tècnica de Protecció Radiològica (UTPR-UAB) of the Universitat Autònoma de Barcelona. The irradiator was an IBL 437C, type H, No. 701 (SCHERING CIS Bio International) containing up to 189 TBq (5100 curies) of Cesium 137. Samples were loaded into the 3.8 L canister and installed into the unit. The sampling canister begins its rotation at 0.02 g to provide a homogeneous

dose to the samples. The dose rate was 6.00 Gy min⁻¹. Immediately after the IR treatment lymphocytes were stimulated to divide with 1% phytohaemagglutinin (PHA) (Gibco San Diego, USA). Lymphocytes (irradiated and non-irradiated) were cultured at 37 °C and 5% CO₂ for 72 hours. At 44 hours after PHA stimulation, 10 µL (3 mg/mL) of cytochalasin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were added to give a final concentration in culture of 6 µg/mL.

2.3. Cell harvesting and MN scoring

Cells were collected by centrifugation (10 min at 120 g). The supernatant was discarded after each centrifugation. The hypotonic treatment was carried out adding 5 mL of KCl 0.075 M at 4 °C for 10 minutes. Next, cells were centrifuged and a methanol/acetic acid mixture (3:1 v/v) was gently added. This fixation step was repeated twice and the resulting cells were re-suspended in a small volume of fixative solution. Air-dried preparations were made and the slides were stained with 10% Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in phosphate buffer (pH 6.8) for 7 min.

To detect the levels of genetic damage, the frequency of binucleated cells with micronuclei (BNMN) was evaluated. A total of 1000 binucleated cells per sample (irradiated and non-irradiated) were analyzed, according to standard criteria [14]. The effect of irradiation was calculated by subtracting the spontaneous BNMN frequency in the non-irradiated sample from the obtained in the irradiated sample. The resulting net values represents the frequency of BNMN induced by IR.

2.4. SNP selection

Genetics variants in BER and HRR genes were identified through literature searches and the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The selected polymorphisms were:

OGG1 (rs1052133, Ser326Cys), *XRCC1* (rs25487, Arg399Gln; rs25489, Arg280His), *XRCC2* (rs3218536, Arg188His) and *XRCC3* (rs1799796, IVS5-14A>G).

2.5. DNA extraction and SNP genotyping

DNA was isolated from peripheral blood, using the standard phenol-chloroform method. The SNP genotyping was performed at the Centro Nacional de Genotipado (CeGen) using the iPLEX (Sequenom) assay and it was successfully genotyped according to the quality control criteria of the CeGen (<http://www.cegen.org>).

2.6. Statistical analysis

The influence of genotype on the frequency of micronucleated cells per 1000 binucleated cells was determined by regression analysis, adjusted by gender, age and diagnosis.

The analysis of association, linkage disequilibrium and haplotype frequency estimation were performed using the web tool for SNP analysis SNPStats [15]. Linear regression for codominant and dominant models were performed, in a first instance. All analyses were adjusted for age, gender and diagnosis. Haplotypes analyses were performed using the same web tool. Other statistical analyses were done using R version 2.12.1 (R Development Core Team, 2005, <http://www.R-project.org>).

3. Results

Some general characteristics of DTC patients have been already indicated in the Materials and methods section.

Figure 1 demonstrates the wide variation existing for the background level of genetic damage in DTC patients. It is shown that the values of BNMN in that population range from 0 to 32, with the highest incidence of individuals showing 3-4 BNMN per 1000 BN cells.

A previous aspect to be solved is the possible role of confounding factors, such as age and gender, on the spontaneous BNMN values. In our population no influence of gender was observed ($P = 0.22$). Nevertheless, a significant age-dependent increase for the spontaneous BNMN was found ($P = 0.0009$). For this reason, all subsequent statistical analyses have been corrected for age, as well as for gender; in spite of that, this last factor seems to be not important for the expression of the BNMN values.

The obtained levels of DNA damage, both spontaneous and after the exposure to IR, are indicated in Table 1. Data are also presented after its stratification by gender, age and histological diagnosis. As expected, the values obtained after IR exposure are significantly higher than those obtained without irradiation ($P < 0.001$). It is important to point out that the comparisons between BNMN values, within the same column of the table, for gender and diagnosis did not show statistical significant differences, and this is true for both the spontaneous and induced parameters. On the contrary, age significantly affects the level of BNMN, but only on basal values.

To demonstrate if there is any relationship between the individual values obtained with and without irradiation, we have carried out a correlation analysis and the results are indicated in Figure 2. It is shown that a strong statistical association exist ($P < 0.0001$, $R^2=0.2964$) between both set of values. This would suggest an underlying mechanism modulating both basal and induced DNA damage.

Results of the BNMN frequencies, according the studied genotypes, are indicated in Table 2. As indicated, the codominant model was used to evaluate the association of genotypes with values of DNA damage using linear regression analysis. The analysis was adjusted by gender, age and diagnosis, and all the SNPs were analysed by the same statistical procedure (multiple-SNPs analysis). The only association between SNPs and the levels of BNMN was found for *OOG1*, rs1052133 and only for the spontaneous BNMN values. The values obtained for this genotype are indicated In Table 3. Thus, for the spontaneous BNMN frequency and the codominant model the *p*-trend show a significant value ($P = 0.016$). Although without statistical significance, it is remarkable the decrease observed for the three recessive homozygous *G/G* individuals in the induced BNMN values. No particular characteristics have been detected for these individuals, two with papillary and one with follicular type of DTC. Due to the low number of individuals in certain genotypes, the analysis assuming a dominant model was also carried out (results not shown). The obtained results for the dominant models did not depart from those obtained in the codominant model.

Since two different polymorphisms were studied for the *XRCC1* gene, haplotype-association analyses were also performed for such combinations. Nevertheless, no association was found between haplotype combinations and any measure of DNA damage (data not shown). Similarly, interaction analyses were carried out between genes participating in the same DNA repair pathway (*XRCC1/OGG1* and *XRCC2/XRCC3*), but no association effects were observed and all *P*-values obtained indicated no significant interaction for any measure of DNA damage ($P > 0.05$, data not shown).

4. Discussion

Our results demonstrate that, from the different polymorphisms selected at DNA repair genes, only *OGG1* (Ser326Cys) seems to play a significant role as modulator of DNA damage,

Different polymorphisms at the *OGG1* gene have been evaluated in different cancer case–control studies. In particular, associations with the Ser326Cys polymorphism have been reported for different cancers, such as smoking-associated lung cancer, gallbladder cancer and lymphoblastic leukemia [16-18]; however, a meta-analysis study suggests that the variant 326Cys allele would play a significant protective effect to breast cancer in European women [19]. In a recent study of our group we have not found associations between this SNP and DTC incidence [20].

To explain the possible role of this polymorphism on cancer development, different functional studies have been carried out showing that the variant form of the Ser326Cys polymorphism produces a slow *in vitro* DNA repair capacity, and this has been observed in cells from workers exposed to low doses of IR [21]. Furthermore, higher values of DNA damage measured by the comet assay have also been found in individuals exposed to pesticides [22] and to cobalt [23], when the 326Cys allele was present. This would confirm a certain role of this polymorphism on DNA repair capability, which would agree with the data obtained in our study where a significant association was found of the spontaneous DNA damage with the Cys/Cys genotype. As it was discussed previously by authors P. Aka et al., 2004; R. Mateuca et al., 2005; and P. Rohr et al., 2011 our findings could support the view of a decreased function of the protein itself, or their incorrect interaction with other proteins involved in the same DNA repair pathway when the 326Cys variant is present. However, it should be taken into account the low number of individuals that were homozygous for the 326Cys allele, what suppose a limitation of this study. It is a bit surprising the low frequency of induced BNMN observed for the recessive homozygous

individuals. No particular characteristics have been found to explain this behaviour. One possible explanation is that if this genotype is particularly sensitive to IR, damaged cell could not survive and, as consequence, an apparent decrease in the frequency of BNMN would appear. Nevertheless, when the frequency of CBPI (cell block proliferation index) was evaluated, the mean of these three individual, does not depart significantly from the rest of population.

OGG1 and XRCC1 proteins interact and participate in the same repair pathway (BER) [4]. Nevertheless, when a gene-gene interaction analysis was performed, not significant interaction was found for any of the obtained combinations and DNA damage. This lack of influence could result from the small number of homozygous individuals detected, due to the low frequency of the variant *OGG1* and *XRCC1* alleles.

Although we did not found any influence of the *XRCC1* selected polymorphisms, results from subjects exposed to IR (both X- and γ -rays) indicated that those with the 399Gln allele had higher frequencies of MN than those carrying the wild-type allele [24]. In addition, a meta-analysis on a total of 11957 cancer cases and 14174 control subjects from 38 published case-control studies suggest that the Arg280His polymorphism must be considered as a biomarker of susceptibility [25]. Nevertheless, we did not found associations between the 280His allele and differentiated thyroid cancer incidence [20]. A recent revision of the role of different BER polymorphic variants suggest that the function of *XRCC1* polymorphisms remains uncertain, as to which exhibit altered activity, although a majority of the evidences points to a defect associated to the Arg280His polymorphism [26].

XRCC2 and *XRCC3* proteins are involved in the repair of DSBs by the HRR mechanism and some positive associations have been observed between genetic variants and pancreatic cancer [27] and acute myeloid leukaemia [28]. Unfortunately, there is little information on the influence of the different polymorphisms in the function of their proteins.

In vitro experiments carried out in chicken DT40 repair mutants cells (*Xrcc2*^{-/-}) complemented with variant *XRCC2* (Arg188His) cDNA were more tolerant to cisplatin treatment [29]. This would indicate that the change of amino acid 188 affects cellular sensitivity to DNA damage, at least in this cell type.

Although the *XRCC3* IVS5-14A>G polymorphism has a doubtful functional significance, the study of this polymorphism is important because alterations in splicing can cause diseases, modifying the severity of disease phenotype, or being linked with the susceptibility to the disease [30]. This allele was significantly associated with the risk of developing late radiotherapy reactions in patients treated for gynecological tumors, indicating that this variant is associated with harmful effects to healthy cells [31].

Repair of DSB is a complex process involving HR and NHEJ mechanism, which act in different stages of the cell cycle. Thus, while NHEJ acts in G1/S stages, HRR acts on S/G2. A decreased function in *XRCC2* or *XRCC3* would influence the increase of MN, when the DSB are not repaired in previous stages of cell cycle. The lack of association found for *XRCC2* and *XRCC3* polymorphisms cannot be considered as conclusive of lack of function because the DSB produced in G0 can be effectively repaired in G1 by NHEJ. This would indicate that the role of genetic polymorphisms on MN formation are complex, influenced (to a different extent) by several variants of proteins and enzymes involved in xenobiotic metabolism, DNA repair proteins, and folate-metabolism, as well as by lifestyle factors [6]. Nevertheless, in spite of these difficulties we have been able to show a certain role of the *OGG1* (Ser326Cys) polymorphism in the modulation of the background frequency of MN. Furthermore, it is important to emphasize the good correlation observed between the induced and the basal frequency of MN what suggest the existence of a genetic background modulating MN frequency.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank all subjects participating in this study, as well as to the members of the Nuclear Medicine Service, Hospital Vall d'Hebron (Barcelona) and the Epidemiological Unit of the Hospital Josep Trueta (Girona) for providing patient blood samples. This work was partially funded by the Spanish Ministry of Education and Science (project SAF2007-6338) and the Generalitat de Catalunya (CIRIT; 2009SGR-725). W.A. García-Quispes was supported by a predoctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona (PIF).

REFERENCES

1. G.A. Brent, L.E. Braverman, R.T. Zoeller, Thyroid health and the environment, *Thyroid* 17 (2007) 807-809.
2. L. Dal Maso, C. Bosetti, C. La Vecchia, S. Franceschi, Risk factors for thyroid cancer: an epidemiological review focused on nutritional factors, *Cancer Causes Control* 20 (2009) 75-86.
3. Y. Xu, B.D. Price, Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks, *Cell Cycle* 10 (2011) 261-267.
4. S. Sterpone, R. Cozzi, Influence of XRCC1 genetic polymorphisms on ionizing radiation-induced DNA damage and repair, *J. Nucl. Acids* 25 (2010) 2010.
5. F. Altieri, C. Grillo, M. Maceroni, S. Chichiarelli, DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications, *Antiox. Redox Signal.* 10 (2008) 891-937.
6. G. Iarmarcovai, S. Bonassi, A. Botta, R.A. Baan, T. Orsière, Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature, *Mutat. Res.* 658 (2008) 215-233.
7. S. Tanrikulu, S. Dođru-Abbasođlu, A. Ozderya, E. Ademođlu, B. Karadađ, Y. Erbil, M. Uysal, The 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (hOGG1) Ser326Cys variant affects the susceptibility to Graves' disease, *Cell Biochem. Funct.* 29 (2011) 244-248.
8. J.Y. Masson, M.C. Tarsounas, A.Z. Stasiak, A. Stasiak, R. Shah, M.J. McIlwraith, F.E. Benson, S.C. West, Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs, *Genes Dev.* 15 (2001) 3296-3307.
9. W.A. García-Quispes, G. Pérez-Machado, B. Sandoval, S. Pastor, A. Velázquez, P. Galofré, J. Biarnés, J. Castell, R. Marcos, Are thyroid cancer patients sensitive to ionising radiation? *Int. J. Radiat. Biol.* 87 (2011) 932-935.
10. D. Scott, J.B. Barber, E.L. Levine, W. Burrill, S.A. Roberts, Radiation-induced

- micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? *Brit. J. Cancer* 77 (1998) 614-620.
11. A. Baeyens, J.P. Slabbert, P. Willem, S. Jozela, D. Van Der Merwe, A. Vral, Chromosomal radiosensitivity of HIV positive individuals. *International Journal Radiation Biology* 86 (2010) 584-592.
 12. S. Bonassi, R. El-Zein, C. Bolognesi, M. Fenech, Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies, *Mutagenesis* 26 (2011) 93-100.
 13. M. Kirsch-Volders, T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate Jr, S. Kirchner, E. Lorge, T. Morita, H. Norppa, J. Surrallés, A. Vanhauwaert, A. Wakata, Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Mutat. Res.* 540 (2003) 153-163.
 14. M. Fenech, W.P. Chang, M. Kirsch-Volders, N. Holland, S. Bonassi, E. Zeiger, Human Micronucleus project, HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mut. Res.* 534 (2003) 65-75.
 15. X. Solé, E. Guinó, J. Valls, R. Iriarte, V. Moreno, SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22 (2006) 1928-1929.
 16. R.J Hung, J. Hall, P. Brennan, P. Boffetta, Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review, *Amer. J. Epidemiol.* 162 (2005) 925-942.
 17. A. Srivastava, K. Srivastava, S.N. Pandey, G. Choudhuri, B. Mittal, Single-nucleotide polymorphisms of DNA repair genes OGG1 and XRCC1: association with gallbladder cancer in North Indian population, *Ann. Surger. Oncol.* 16 (2009) 1695-1703.
 18. Q. Li, L. Huang, L. Rong, Y. Xue, Q. Lu, Y. Rui, J. Li, N. Tong, M. Wang, Z. Zhang, Y.

- Fang, hOGG1 Ser326Cys polymorphism and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population, *Cancer Sci.* 102 (2011) 1123-1127.
19. W. Yuan, L. Xu, Y. Feng, Y. Yang, W. Chen, J. Wang, D. Pang, D. Li, The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis, *Breast Cancer Res. Treat.* 122 (2010) 835-842.
 20. W.A. García-Quispes, G. Pérez-Machado, A. Akdi, S. Pastor, P. Galofré, F. Biarnés, J. Castell, A. Velázquez, R. Marcos, Association studies of OGG1, XRCC1, XRCC2 and XRCC3 polymorphisms with differentiated thyroid cancer, *Mutat. Res.* 709-710 (2011) 67-72.
 21. P. Aka, R. Mateuca, J.P. Buchet, TH. hierens, M. Kirsch-Volders, Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutat. Res.* 556 (2004) 169-181.
 22. P. Rohr, J. da Silva, B. Erdtmann, J. Saffi, T.N. Guecheva, J. Antônio Pêgas Henriques, K. Kvitko, BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure, *Environ. Mol. Mutagen.* 52 (2011) 20-27.
 23. R. Mateuca, P.V. Aka, M. De Boeck, R. Hauspie, M. Kirsch-Volders, D. Lison, Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts, *Toxicol. Lett.* 156 (2005) 277-288.
 24. S. Angelini, R. Kumar, F. Carbone, F. Maffei, G.C. Forti, F.S. Violante, V. Lodi, S. Curti, K. Hemminki, P. Hrelia, Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes, *Mutat. Res.* 570 (2005) 105-117.
 25. Z. Hu, H. Ma, F. Chen, Q. Wei, H. Shen, XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 14 (2005)

- 1810-1818.
26. D.M. Wilson 3rd, D. Kim, B.R. Berquist, A.J. Sigurdson, Variation in base excision repair capacity, *Mutat. Res.* 711 (2011) 100-112.
 27. D. Li, H. Liu, L. Jiao, D.Z. Chang, G. Beinart, R.A. Wolff, D.B. Evans, M.M. Hassan, J.L. Abbruzzese, Significant effect of homologous recombination DNA repairs gene polymorphisms on pancreatic cancer survival, *Cancer Res.* 66 (2006) 3323-3330.
 28. L. Liu, L. Yang, Z.F. Zhang, M.H. Xu, J.X. Wang, Z.J. Xiao, Polymorphisms of RAD51(G135C) and XRCC3(C241T) genes and correlations thereof with prognosis and clinical outcomes of acute myeloid leukemia, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 88 (2008) 378-382.
 29. P. Danoy, E. Sonoda, M. Lathrop, S. Takeda, F. Matsuda, A naturally occurring genetic variant of human XRCC2 (R188H) confers increased resistance to cisplatin-induced DNA damage, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 352 (2007) 763-768.
 30. G.S. Wang, T.A. Cooper, Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 749-761.
 31. K. De Ruyck, M. Van Eijkeren, K. Claes, R. Morthier, A. De Paepe, A. Vral, L. De Ridder, H. Thierens, 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 (2005) 1140-1149..

Figure legend

Fig 1. Distribution and frequency of spontaneous BNMN values in the DTC patients.

Fig. 2. Correlation between DNA damage values (spontaneous vs after irradiation) in the selected DTC patients.

Table 1. Frequency of basal and induced BNMN, stratified by gender, age and histological diagnosis.

	n	Spontaneous BNMN (mean ± SD)	After irradiation BNMN (mean ± SD)	Net BNMN ^a (mean ± SD)
Total	114	6.86 ± 5.97	31.33 ± 16.11	24.52 ± 13.80
By gender				
Female	92	7.18 ± 6.26	31.17 ± 16.53	24.04 ± 13.95
Male	22	5.50 ± 4.43	32.00 ± 14.57	26.50 ± 13.27
By age				
< 45	44	4.95 ± 4.14*	29.00 ± 14.89	24.12 ± 13.78
≥ 45	70	7.93 ± 6.61	32.97 ± 16.76	25.07 ± 13.73
By diagnosis				
Papillary	98	6.62 ± 5.73	31.69 ± 15.02	25.09 ± 12.79
Follicular	16	8.31 ± 7.29	29.13 ± 22.12	21.01 ± 19.03

^a Net BNMN = BNMN after irradiation– spontaneous BNMN. SD, standard deviation.

**P*-value < 0.05 using Wilcoxon test.

Table 2. Frequency of spontaneous and induced BNMN, stratified according to genotypes.

Gene	SNP	DNA damage	mean \pm SD		
			C/C (n=75)	C/G (n=35)	G/G (n=3)
<i>OGG1</i>	rs1052133	Spontaneous BNMN	6.15 \pm 4.93	7.40 \pm 6.86	16.0 \pm 12.00
		After irradiation BNMN	29.69 \pm 14.64	35.51 \pm 18.63	28.33 \pm 17.22
		Net BNMN	23.61 \pm 12.99	28.11 \pm 14.67	12.33 \pm 10.79
<i>XRCC1d</i>	rs25487	Spontaneous BNMN	5.21 \pm 4.36	7 \pm 5.32	7.85 \pm 7.93
		After irradiation BNMN	28.39 \pm 11.20	32.33 \pm 11.18	33.46 \pm 12.58
		Net BNMN	23.18 \pm 9.36	25.41 \pm 15.80	25.62 \pm 12.69
<i>XRCC1</i>	rs25489	Spontaneous BNMN	7 \pm 6.14	6.15 \pm 3.97	1 \pm 1.41
		After irradiation BNMN	32.1 \pm 16.14	28.46 \pm 16.69	19.5 \pm 12.02
		Net BNMN	25.13 \pm 13.56	22.46 \pm 15.93	18.5 \pm 10.61
<i>XRCC2</i>	rs3218536	Spontaneous BNMN	6.66 \pm 5.85	7.11 \pm 6.63	10 \pm 5.66
		After irradiation BNMN	31.34 \pm 15.44	32.16 \pm 19.75	30.5 \pm 21.92
		Net BNMN	24.71 \pm 13.43	25.16 \pm 15.52	20.5 \pm 16.26
<i>XRCC3</i>	rs1799796	Spontaneous BNMN	7.44 \pm 6.36	5.5 \pm 5.04	6.8 \pm 4.87
		After irradiation BNMN	31.6 \pm 15.44	30.39 \pm 17.82	37.2 \pm 14.89
		Net BNMN	24.18 \pm 12.90	24.97 \pm 15.48	30.4 \pm 13.46

Table 3. Association between *OGG1* Ser326Cys variants and DNA damage values (spontaneous, after irradiation and net BNMN).

DNA damage measure	Genotype	n	Response (mean \pm SD)	Difference (95% CI)	<i>p</i> -value
Spontaneous BNMN	C/C	75	6.15 \pm 4.93	0	0.016
	C/G	35	7.40 \pm 6.86	1.05 (-1.18 - 3.27)	
	G/G	3	16.0 \pm 12.00	9.49 (2.94 - 16.04)	
After irradiation BNMN	C/C	75	29.69 \pm 14.64	0	0.24
	C/G	35	35.51 \pm 18.63	5.64 (-0.86 - 12.14)	
	G/G	3	28.33 \pm 17.22	-0.75 (-19.89 - 18.40)	
Net BNMN	C/C	75	23.61 \pm 12.99	0	0.11
	C/G	35	28.11 \pm 14.67	4.53 (-0.98 - 10.04)	
	G/G	3	12.33 \pm 10.79	-10.38 (-26.60 - 5.84)	

SD: standard deviation; CI: confidence interval.

Lineal regression analysis for codominant model is shown.

Analysis was adjusted by gender and age.

Figure 1

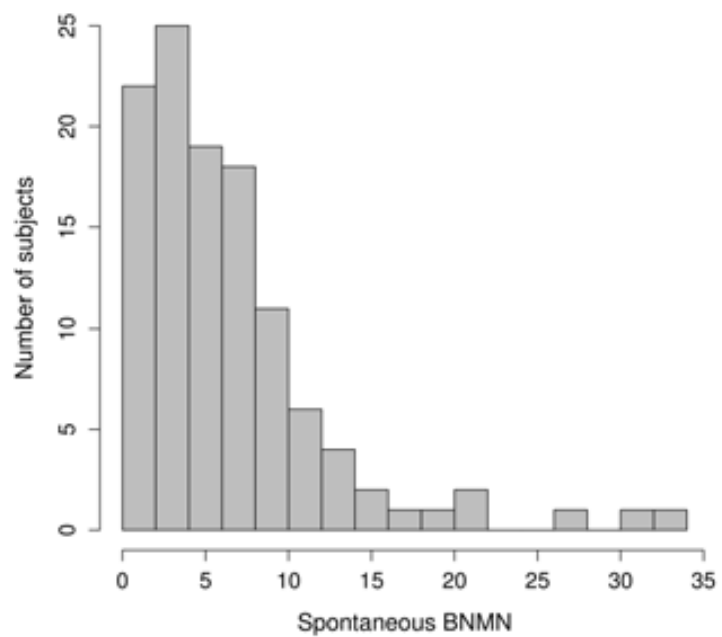
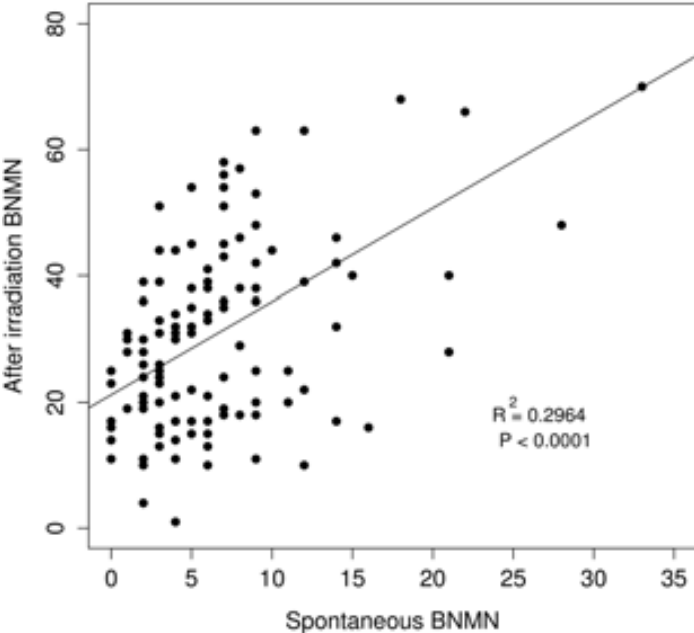


Figure 2



Possible role of the *WDR3* gene on genome stability in thyroid cancer patients

Wilser Andrés García-Quispes¹, Susana Pastor^{1,2}, Pere Galofré^{3,4}, Josefina Biarnés⁵, Joan Castell³, Antonia Velázquez^{1,2}, Ricard Marcos^{1,2,*}

¹Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

²CIBER Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Salud Carlos III.

³Servei de Medicina Nuclear, Hospitals Universitaris Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

⁴Present address: Servei de Medicina Nuclear, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain.

⁵Unitat d'Endocrinologia, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain.

*Correspondence to: Ricardo Marcos, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain.

E-mail: ricard.marcos@uab.es

Abstract

The role of the *WDR3* gene on genomic instability has been evaluated in a group of 115 differentiated thyroid cancer (DTC) patients. Genomic instability has been measured according to the response of peripheral blood lymphocytes to ionizing radiation (0.5 Gy). The response has been measured with the micronucleus (MN) test evaluating the frequency of binucleated cells with MN (BNMN), both before and after the irradiation.

No differences between genotypes, for the BNMN frequencies before irradiation, were observed. Nevertheless significant decreases of DNA damage after irradiation were observed in individuals carrying the variant alleles for each of the three genotyped SNPs: rs3754127 [-8.85 (-15.01 to -2.70), $P < 0.01$]; rs3765501 [-8.98 (-15.61 to -2.36), $P < 0.01$]; rs4658973 [-8.70 (-14.94 to -2.46), $P < 0.01$]. These values correspond to those obtained assuming a dominant model.

This study shows for the first time that *WDR3* can modulate genome stability and, consequently, it can be involved in the incidence of cancer, including thyroid cancer.

Keywords: *WDR3*, genetic damage, genomic instability, micronucleus, radiosensitivity

Introduction

The chromosome region 1p12 has been associated to different types of cancer, including differentiated thyroid carcinoma (DTC) [1,2]. Previous studies conducted by our group in this region have found that the *WDR3* gene, mapped in this region, shows a significant association with DTC, suggesting its implication in the aetiology of thyroid cancer [3].

Few information exists on the role of *WDR3*, but it is known that it belongs to a family of eukaryotic genes carrying WD repeats [4]. WD repeats are minimally conserved regions of approximately 40 amino acids, typically bracketed by Gly-His and Trp-Asp, which may facilitate formation of heterotrimeric or multiprotein complexes. Since WD-repeat proteins do not exist in prokaryotic genomes, it is assumed that probably they arose in the immediate precursors of eukaryotes [5]. Proteins belonging to the WD repeat family are involved in a variety of cellular processes; including cell cycle progression, signal transduction, apoptosis, and gene regulation [6]. Regarding to the *WDR3* gene, it should be mention that it encodes a nuclear protein of 943 amino acids containing 10 WD repeats [4]. This gene is involved in cell cycle progression and signal transduction [7] and, although the specific function of *WDR3* is unknown, a role in ribosome biogenesis has recently been reported [8].

Since neither of the functions attributed to *WDR3* can be specifically associated with thyroid cancer, we hypothesized that perhaps it is involved in more general mechanisms maintaining genomic stability. Consequently, variations in the *WDR3* function associated with the existence of genetic polymorphisms can generate genome instability that can result in an increase of cancer risk. In this context, it must be indicated that ribosomal proteins have been reported to be also involved in maintaining genome integrity [9].

Although genomic instability is a complex parameter, a general characteristic of individuals showing diseases such as Fanconi's anemia or ataxia telangiectasia is a poor response against agents affecting the integrity of the genome, as it is the case of ionizing radiation

(IR). Thus, radiosensitivity is considered a biomarker of genomic instability [10]. To determine if a candidate gene is involved in genomic stability it must be demonstrated that cells carrying different genetic polymorphisms are particularly sensitive in front of the IR action.

Here, we evaluated the relationship between three non-coding single nucleotide polymorphisms of the *WDR3* gene and the frequency of micronucleus, both spontaneous and after IR exposure. The study has been carried out in peripheral blood lymphocytes from a group of 115 DTC patients, and the levels of DNA damage have been evaluated by the cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN), because it is a well-established cytogenetic technique with many advantages over other cytogenetic approaches. In this context, it must be stressed that it has been well demonstrated that CBMN assay is very useful as a marker of spontaneous and induced DNA damage [11-13].

Materials and Methods

Ethic statement

The study was approved by the Ethic Committees from Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona, and the Hospital Universitari Doctor Josep Trueta in Girona (Spain).

Population studied

The study was carried out in a total of 115 thyroid cancer patients, 93 (81%) women and 22 (19%) men, recruited from both the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona, and the Hospital Universitari Doctor Josep Trueta in Girona (Spain). The average age at diagnosis was 43.30 ± 15.07 (mean \pm SD) years and 49.76 ± 16.49 when the sample was obtained. According to the tumour-type, 99 (86%) of patients were classified as papillary and 16 (14%) as follicular.

Blood samples were collected prior to iodine treatment (^{131}I), after obtaining a written informed consent of all patients. All participants completed a questionnaire, covering standard demographic questions, as well as a brief occupational, medical, and family history. The histological classification of the tumour was obtained from the medical records. All participants signed a written consent

Cell culture and treatment with IR

The cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) was carried out using the cytochalasin B technique and following a standard procedure [14]. Blood samples were taken by venipuncture and 0.5 mL of heparinised blood was diluted with 4.5 mL of complete culture medium consisting of RPMI 1640, supplemented with 15% foetal bovine serum, 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) and 1% l-glutamine, all chemical were obtained from PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria. Lymphocytes were stimulated to divide with 1% phytohaemagglutinin (PHA) (Gibco San Diego, USA) immediately after the treatment with IR.

Four cultures were established per each donor. Two were irradiated with 0.5 Gy ^{137}Cs γ -rays, while the other two remain untreated. Irradiation was carried out at the Unitat Tècnica de Protecció Radiològica (UTPR-UAB) of the Universitat Autònoma de Barcelona. The dose rate was 6.00 Gy min⁻¹. Lymphocytes (irradiated and non-irradiated) were cultured at 37 °C for 72 hours. At 44 hours after PHA stimulation, 10 μL (3 mg/mL) of cytochalasin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was added to give a final concentration in culture of 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cultures were maintained at 37 °C and 5% CO_2 .

Cell harvesting and MN scoring

Cells were collected by centrifugation (10 min at 120 g). The supernatant was discarded after each centrifugation. The hypotonic treatment was carried out adding 5 mL of KCl 0.075 M at 4 °C for 10 min. Next, cells were centrifuged and a methanol/acetic acid mixture (3:1 v/v) was gently added. This fixation step was repeated twice and the resulting cells were re-suspended in a small volume of fixative solution. Air-dried preparations were made and the slides were stained with 10% Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in phosphate buffer (pH 6.8) for 7 min. Slides were coded by a person does not involved in the scoring.

To detect the level of genetic damage, the frequency of binucleated cells with micronuclei (BNMN) was evaluated. A blinded scoring of 1000 binucleated cells per sample (irradiated and non-irradiated) were analyzed to determine the presence of micronuclei, according to standard criteria [14].

SNP selection

The polymorphisms used in this study were selected according to our previous study [3]. Thus, we selected the three tag SNPs that showed haplotype association with thyroid cancer, rs3754127 (C/T, 5' near gene), rs3765501 (G/A, intron) and rs4658973 (T/G, intron).

DNA extraction and SNP genotyping

DNA was isolated from peripheral blood, using the standard phenol-chloroform method. The SNP genotyping was performed at the Centro Nacional de Genotipado (CeGen) using the iPLEX (Sequenom) technique and it was successfully genotyped according to the quality control criteria of the CeGen (<http://www.cegen.org>). To assure the genotyping reliability, 10% of the samples were randomly selected and double genotyped by replicates in multiple 96 well plates. In addition, two HapMap reference trios were incorporated in plates and the genotype concordance and correct Mendelian inheritance were verified.

Statistical analysis

The analysis of association, linkage disequilibrium and haplotype frequency estimation were performed using the web tool for SNP analysis SNPStats [15]. Linear regression model for codominant, inheritance model was performed. All analyses were adjusted for age, gender and histological diagnosis. Haplotypes analyses were performed using the same web tool. Haploview software [16] was used to examine the LD between SNPs. Other statistical analysis were done using R version 2.12.1 [17].

Results

General characteristics of the selected DTC patients are summarized in the Material and Methods section. As indicated, the proportion of women was higher than that of men, reflecting the highest incidence of DTC in women. In addition, the elevated incidence of the papillary thyroid cancer indicates the predominance of this histological subtype.

Table 1 shows that the mean of spontaneous BNMN frequency in the 115 patients was 6.87 ± 0.55 (mean \pm SE). The BNMN values showed a 4.6 fold increase (31.35 ± 1.5) after exposure to 0.5 Gy of ionizing radiation, regarding to the spontaneous levels. These differences between the spontaneous and after irradiation BNMN frequency are, as expected, statistically significant ($P < 0.001$). Moreover, although the mean of spontaneous BNMN was higher in females (7.19 ± 0.65) than in males (5.51 ± 0.94) this difference did not attain statistical significance ($P = 0.339$). On the other hand, no differences were observed between females and males after irradiation (31.19 ± 1.70 and 31.01 ± 3.11 ; respectively, $P = 0.833$).

The spontaneous BNMN values in the subtype of patients with papillary thyroid cancer showed a slight but not significant decrease in comparison with the follicular subtype (6.64 ± 0.57 and 8.31 ± 1.82 ; respectively, $P = 0.559$). The values of BNMN after irradiation neither shown significant differences between both subtypes (31.71 ± 1.50 and 29.13 ± 5.53 ; respectively, $P = 0.553$).

In Figure 1 it is observed the good correlation that exists between the spontaneous BNMN values and those observed after the irradiation ($R^2 = 0.28$, $P < 0.001$). This would indicate an underlying genetic cause.

We have also evaluated the cellular proliferation rate using the cytokinesis-blocked proliferation index (CBPI). The CBPI value indicates the average number of cell cycles per cell [18]. The results (data not shown) indicate a significant decrease of CBPI in cultures exposed to ionizing radiation ($P < 0.001$).

The differences and their 95% confidence intervals were calculated by linear regression analyses using as a reference the homozygous genotype for the most frequent allele, with adjustment for age, gender and diagnoses. Table 2 shows the differences observed on spontaneous BNMN values, according to the different polymorphisms, taking into account the codominant model of inheritance. For the spontaneous BNMN frequency small differences between genotypes were found for all the evaluated polymorphisms. Interestingly, in all the cases the BNMN values were higher in the reference genotypes (homozygous for the common allele), but these differences did not attain statistical significances.

Haplotype analysis was performed for the three SNPs of *WDR3* and the results are indicated in Table 3. Three haplotypes were predicted to have a frequency > 0.01. The other haplotypes were predicted to be too odd for meaningful statistical analysis. No significant associations were observed for any of the most frequent haplotypes with the spontaneous BNMN values.

When the BNMN data obtained after the irradiation were distributed according to the studied genotypes, significant associations were observed for all the genotyped SNPs (Table 4). The presence of the minor allele frequency (MAF), for all the studied polymorphisms, was associated with a significant lower DNA damage after ionizing radiation exposure (Table 4). Thus, these results indicate that the association between the three *WDR3* SNPs and the radiation-induced damage follows a dominant model of inheritance, i.e. the rs3754127 C/T-T/T genotypes showed a decrease of the BNMN frequency compared with CC individuals (see Table 4). Accordingly, we also found an association between the induced damage and the haplotype combining the minor allele of each of the three genotyped SNPs [-4.9 (-9.16 to -0.63), P=0.026]; see Table 5.

When the analysis was performed stratifying the population by type of tumour at diagnosis (follicular or papillary), the papillary subgroup showed values after irradiation similar to

those of the overall population: rs3754127 [-8.39 (-14.45 to -2.33), $P < 0.01$]; rs3765501 [-8.83 (-15.37 to -2.29), $P < 0.01$]; rs4658973 [-8.36 (-14.46 to -2.27), $P < 0.01$], all for dominant model. On the other hand, the effect observed for the follicular subtype after irradiation was higher than in papillary; however, the differences were not statistically significant, probably due to low numbers of patients: rs3754127 [-27.78 (-55.54 to -0.02), $P = 0.074$]; rs3765501 [-28.67 (-62.46 to 5.12), $P = 0.12$]; rs4658973 [-29.10 (-60.26 to 2.06), $P = 0.094$], all for dominant model.

Discussion

In this study we have shown a significant relationship between the three selected polymorphisms of the *WDR3* gene and the levels of DNA damage after a treatment with IR. This would indicate a role of *WDR3* in the maintenance of genomic stability.

WDR3 gene encodes a nuclear protein containing 10 WD repeats with unknown function [4] and the members of this large family are structurally related, but functionally diverse. Some of the cellular functions or pathways regulated by the members of this family includes gene regulation, signal transduction, RNA processing and splicing, lymphocyte homing, regulation of cell cycle progression, cell division/chromatin separation, and cell/tissue differentiation, among other, as reviewed [5,6]. However, up to now there is not information indicating a possible involvement with repair mechanisms or influence, in the maintenance of genomic stability for *WDR3*, or for any member of its family.

Aiming to find a reasonable explanation for the association observed between *WDR3* polymorphisms and DTC incidence, we have already reported the up-regulation of *WRD3* in different thyroid cancer cell lines, suggesting its possible implication in thyroid cancer tumorigenesis [3]. This would agree with the studies carried out in the breast carcinoma cell line MCF-7 showing that the suppression of *WDR3* reduce cell proliferation, decrease cell size and reduce foci formation, indicating that *WDR3* confers a growth and proliferative advantage on cancer cells [8]. The *WDR3* protein is redistributed within the nucleus when ribosome biogenesis is disrupted. Cellular events appear to be influenced by the regulation of expression of *WDR3* altering the ribosome biogenesis [8]. Decreased transient changes on the levels of DNA-damage repair proteins (non-homologous end-joining proteins) have been observed in the nucleolus after ionizing radiation exposure; therefore, it seems possible that these alterations reflect a biologically relevant response to DNA double-strand break damage [19].

Our findings suggest the association between the minor frequency alleles for rs3754127,

rs3765501, rs4658973 polymorphisms with lower values of DNA damage, after the treatment with ionizing radiation. Although the SNPs used in our study do not produce changes of amino acids in the protein sequence, it is known that non-coding single nucleotide polymorphisms may alter gene expression [20]. Modifications near the promoter sequence (rs3754127) can interrupt the correct interaction with transcription factors changing totally the gene expression or influencing the level of expression [21]; this means that the transcription of *WDR3* could depend of genetic variance at its promoter region. Although alternative splicing, due to the presence of SNPs, probably occur [22,23], it must be pointed out that alternative transcripts are also induced by ionizing radiation [24]. Thus, polymorphisms at rs3765501 and/or rs4658973 may also influence alternative splicing, not only because of its presence but also by additional or differential effects with the ionizing radiation effects. Alternatively, any of these polymorphisms may be responsible for the decrease of DNA damage after IR, but they act as genetic markers of genetic variants of *WDR3* directly involved in the *WDR3* genomic stability.

The observed effects, indicating the involvement of *WDR3* in maintaining genomic stability after the exposure to IR, would agree with the association found with DTC and with the role attributed in the ribosome biogenesis. Thus, alterations in the expression of *WDR3* would disrupt the signalling pathways that exist between ribosome biogenesis and p53 activation [8]. All these results altogether suggest an important role of *WDR3* in maintaining genome stability as well as in carcinogenesis and cell cycle regulation. . Interesting, preliminary results with colon cancer patients (V. Moreno, personal communication) seems to indicate an altered expression of *WDR3* in colon cancer, supporting our view, suggesting a role of *WDR3* in genomic stability and cancer. Our data are interesting enough to carry out additional studies in *WDR3* gene expression to confirm this hypothesis.

Acknowledgments

We thank all subjects participating in this study, as well as to the members of the Nuclear Medicine Service, Hospital Vall d'Hebron (Barcelona) and the Epidemiological Unit of the Hospital Josep Trueta (Girona) for providing patient blood samples. This work was partially funded by the Spanish Ministry of Education and Science (project SAF2007-6338) and the Generalitat de Catalunya (CIRIT; 2009SGR-725). W.A. García-Quispes was supported by a predoctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona (PIF).

Author contribution

Conceived and designed the experiments: AV, RM. Performed the experiments: WAGQ, SP. Analyzed the data: WAGQ, SP, AV, RM. Contributed reagents/materials/analysis tools: PG, JB, JC. Wrote the paper: WAGQ, AV, RM.

Competing interest

The authors declare that no competing interest exists.

References

1. Zhang J, Glatfelter AA, Taetle R, Trent JM (1999). Frequent alterations of evolutionarily conserved regions of chromosome 1 in human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 11: 119-123.
2. Baida A, Akdi A, González-Flores E, Galofré P, Marcos R, *et al.* (2008) Strong association of chromosome 1p12 loci with thyroid cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 17: 1499-1504.
3. Akdi A, Giménez EM, García-Quispes W, Pastor S, Castell J, *et al.* (2010) WDR3 gene haplotype is associated with thyroid cancer risk in a Spanish population. *Thyroid* 20: 803-809.
4. Claudio JO, Liew CC, Ma J, Heng HH, Stewart AK, *et al.* (1999) Cloning and expression analysis of a novel WD repeat gene, WDR3, mapping to 1p12-p13. *Genomics* 59: 85-89.
5. Jin F, Dai J, Ji C, Gu S, Wu M, *et al.* (2004) A novel human gene (WDR25) encoding a 7-WD40-containing protein maps on 14q32. *Biochem Genet* 42: 419-427.
6. Smith TF (2008) Diversity of WD-repeat proteins. *Subcell Biochem* 48: 20-30.
7. Li D, Roberts R (2001) WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci* 58: 2085-2097.
8. McMahon M, Ayllón V, Panov KI, O'Connor R (2010) Ribosomal 18 S RNA processing by the IGF-I-responsive WDR3 protein is integrated with p53 function in cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 285: 18309-18318.
9. Yadavilli S, Mayo LD, Higgins M, Lain S, Hegde V, *et al.* (2009) Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain. *DNA Repair* 8: 1215-1224.
10. Jeggo P (2010) The role of the DNA damage response mechanisms after low-dose radiation exposure and a consideration of potentially sensitive individuals. *Radiat Res*

174: 825-832.

11. Scott D, Barber JB, Levine EL, Burrill W, Roberts SA (1998) Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? *Brit J Cancer* 77: 614-620.
12. Baeyens A, Slabbert JP, Willem P, Jozela S, Van Der Merwe D, *et al.* (2010) Chromosomal radiosensitivity of HIV positive individuals. *Int J Radiat Biol* 86: 584-592.
13. Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C, Fenech M (2011) Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* 26: 93-100.
14. Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protocols* 2: 1084-1104.
15. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22: 1928-1929.
16. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265.
17. R Development Core Team (2010) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
18. Surrallés J, Natarajan AT (1997) Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat Res* 392: 165-174.
19. Moore HM, Bai B, Boisvert FM, Latonen L, Rantanen V, *et al.* (2011) Quantitative proteomics and dynamic imaging of the nucleolus reveal distinct responses to UV and ionizing radiation. *Mol Cell Proteomics* 10: M111.009241.
20. Hudson TJ (2003) Wanted: regulatory SNPs. *Nat Genet* 33: 439-440.

21. Guo Y, Jamison DC (2005) The distribution of SNPs in human gene regulatory regions. *BMC Genomics* 6: 140.
22. Kwan T, Benovoy D, Dias C, Gurd S, Provencher C, *et al.* (2008) Genome-wide analysis of transcript isoform variation in humans. *Nat Genet* 40: 225-231.
23. Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtukova I, Zhang L, *et al.* (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456: 470-476.
24. Sprung CN, Li J, Hovan D, McKay MJ, Forrester HB (2011) Alternative transcript initiation and splicing as a response to DNA damage. *PLoS One* 6: e25758.

Figure legend

Figure 1. Correlation between DNA damage values (spontaneous vs after irradiation).

Table 1. Spontaneous and after irradiation BNMN frequencies, according to gender and histological DTC type

Patients (n)	Spontaneous BNMN (mean ± SE)	<i>P</i>^a	BNMN after irradiation (mean ± SE)	<i>P</i>^b
Total (115)	6.87 ± 0.55		31.35 ± 1.51	
Female (93)	7.19 ± 0.65	0.339	31.19 ± 1.70	0.833
Male (22)	5.51 ± 0.94		31.01 ± 3.11	
Papillary (99)	6.64 ± 0.57	0.559	31.71 ± 1.50	0.553
Follicular (16)	8.31 ± 1.32		29.13 ± 5.53	

^aWilcoxon signed rank test

^bStudent's t-tests

Table 2. Differences for basal DNA damage (BNMN), according to *WDR3* polymorphisms

	Genotype	N	mean BNMN \pm SE	Difference (95% CI)*	P
rs3754127	C/C	39	8.38 \pm 1.25	0	0.34
	C/T	55	6.07 \pm 0.63	-1.77 (-4.13 to 0.59)	
	T/T	21	6.14 \pm 0.97	-0.94 (-4.03 to 2.15)	
rs3765501	G/G	35	8.94 \pm 1.36	0	0.28
	G/A	43	6.42 \pm 0.78	-1.84 (-4.47 to 0.78)	
	A/A	30	5.70 \pm 0.72	-2.12 (-5.04 to 0.80)	
rs4658973	T/T	39	8.38 \pm 1.25	0	0.41
	T/G	53	6.13 \pm 0.65	-1.65 (-4.06 to 0.76)	
	G/G	21	6.24 \pm 0.95	-1.15 (-4.24 to 1.95)	

SE: standard error; CI: confidence interval.

*Adjusted by gender, age and diagnosis.

Table 3. Differences for basal DNA damage, according to *WDR3* haplotypes

	rs3754127	rs3765501	rs4658973	Frequency	Difference (95% CI)	<i>P</i>
1	C	G	T	0.5226	0	---
2	T	A	G	0.4217	-0.74 (-2.26 to 0.78)	0.34
3	C	A	T	0.0513	-1.96 (-5.15 to 1.23)	0.23
rare	*	*	*	0.0043	-5.79 (-16.98 to 5.39)	0.31

Global haplotype association P-value: 0.31

Table 4. Differences for after-irradiation DNA damage, according to *WDR3* polymorphisms

	Genotype	N	mean BNMN ± SE	Difference (95% CI)*	P
rs3754127	C/C	39	37.46 ± 2.91	0	0.021^C
	C/T	55	27.87 ± 1.77	-9.24 (-15.76 to -2.71)	
	T/T	21	29.1 ± 3.55	-7.77 (-16.31 to 0.77)	
	C/C	39	37.46 ± 2.91	0	0.0057^D
	C/T-T/T	76	28.21 ± 1.6	-8.85 (-15.01 to -2.70)	
rs3765501	G/G	35	38.09 ± 3.17	0	0.034^C
	G/A	43	29.14 ± 2.07	-8.77 (-16.03 to -1.51)	
	A/A	30	28.33 ± 2.73	-9.33 (-17.41 to -1.24)	
	G/G	35	38.09 ± 3.17	0	0.0091^D
	G/A-A/A	73	28.81 ± 1.65	-8.98 (-15.61 to -2.36)	
rs4658973	T/T	39	37.46 ± 2.91	0	0.025^C
	T/G	53	27.89 ± 1.82	-9.23 (-15.87 to -2.59)	
	G/G	21	29.71 ± 3.55	-7.30 (-15.84 to 1.23)	
	T/T	39	37.46 ± 2.91	0	0.0074^D
	T/G-G/G	74	28.41 ± 1.64	-8.70 (-14.94 to -2.46)	

SE: standard error; CI: confidence interval.

*Adjusted by gender, age and diagnosis.

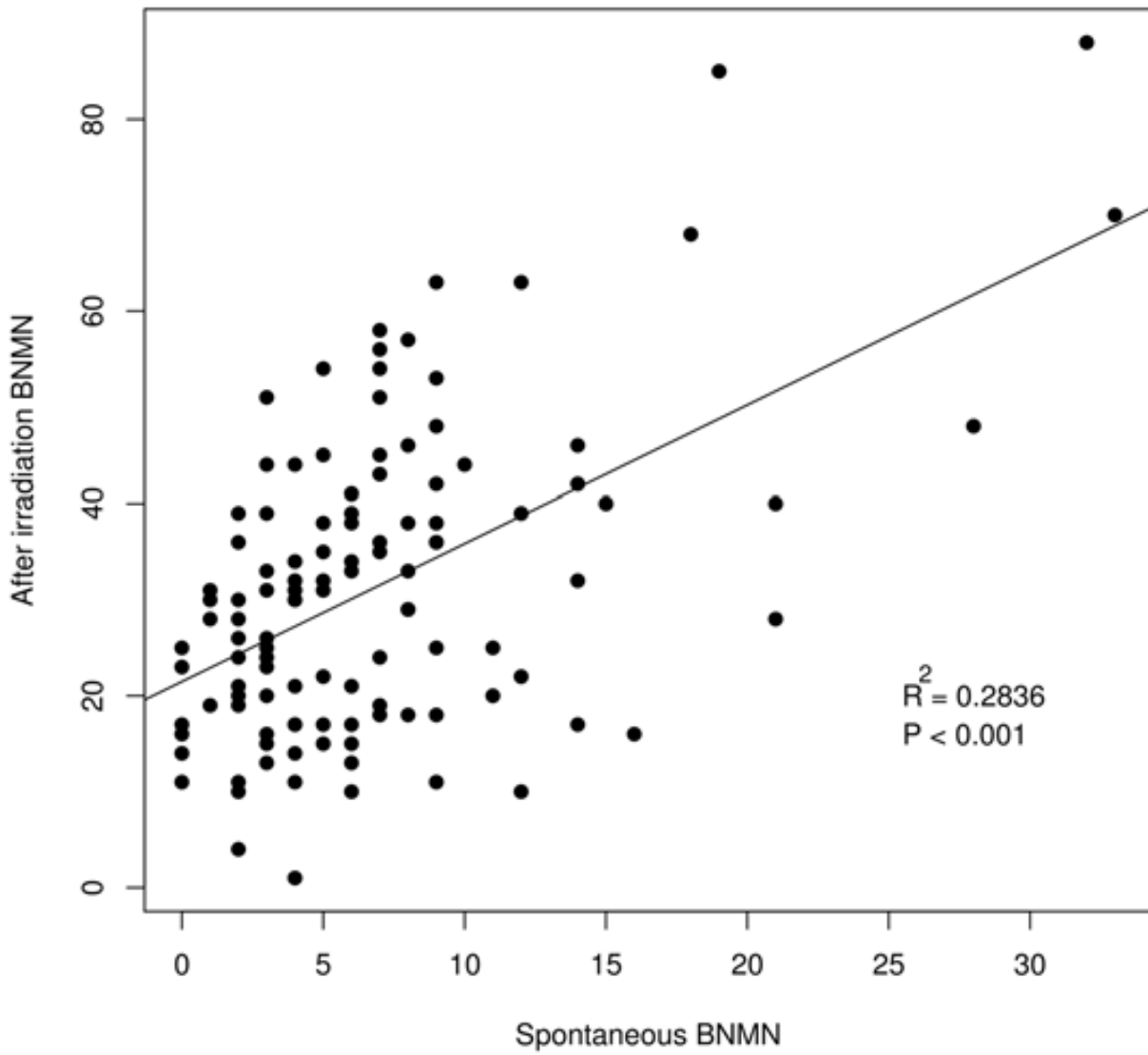
C, D: Codominant and Dominant models, respectively.

Table 5. Differences for after-irradiation DNA damage, according to *WDR3* haplotypes

	rs3754127	rs3765501	rs4658973	Frequency	Difference (95% CI)	P-value
1	C	G	T	0.5227	0	---
2	T	A	G	0.4217	-4.9 (-9.16 to -0.63)	0.026
3	C	A	T	0.0512	-3.74 (-12.73 to 5.26)	0.42
rare	*	*	*	0.0043	4.21 (-27.15 to 35.58)	0.79

Global haplotype association P-value: 0.79

Figure 1



ANEXO 5

OR (95% CI) por polimorfismo y gen de acuerdo a varios modelos de herencia para CTD

SNP (Gen), cambio	Modelo	Genotipo	Controles n (%)	Pacientes n (%)	OR (95% CI) ^a	P
rs1052133 (OGG1) Ser326Cys	Codominante	C/C	294 (63)	253 (63,7)	1,00 (Referencia)	0,74
		C/G	154 (33)	125 (31,5)	0,97 (0,72-1,31)	
		G/G	19 (4,1)	19 (4,8)	1,28 (0,65-2,51)	
	Dominante	C/C	294 (63)	253 (63,7)	1,00 (Referencia)	0,98
		C/G+G/G	173 (37)	144 (36,3)	1,00 (0,76-1,33)	
	Recesivo	C/C+C/G	448 (95,9)	378 (95,2)	1,00 (Referencia)	0,45
		G/G	19 (4,1)	19 (4,8)	1,29 (0,66-2,52)	
	Sobredominante	C/C+G/G	313 (67)	272 (68,5)	1,00 (Referencia)	0,76
		C/G	154 (33)	125 (31,5)	0,96 (0,71-1,28)	
	Log-aditivo	---	---	---	---	1,04 (0,82-1,32)
rs25487 (XRCC1) Arg399Gln	Codominante	G/G	196 (41,4)	153 (39,6)	1,00 (Referencia)	0,47
		G/A	212 (44,7)	186 (48,2)	1,17 (0,87-1,57)	
		A/A	66 (13,9)	47 (12,2)	0,94 (0,61-1,46)	
	Dominante	G/G	196 (41,4)	153 (39,6)	1,00 (Referencia)	0,46
		G/A+A/A	278 (58,6)	233 (60,4)	1,11 (0,84-1,47)	
	Recesivo	G/G+G/A	408 (86,1)	339 (87,8)	1,00 (Referencia)	0,49
		A/A	66 (13,9)	47 (12,2)	0,87 (0,57-1,30)	
	Sobredominante	G/G+A/A	262 (55,3)	200 (51,8)	1,00 (Referencia)	0,23
		G/A	212 (44,7)	186 (48,2)	1,18 (0,90-1,56)	
	Log-aditivo	---	---	---	---	1,02 (0,83-1,25)
rs25489 (XRCC1) Arg280His	Codominante	G/G	426 (90,1)	337 (84,7)	1,00 (Referencia)	0,087
		G/A	44 (9,3)	58 (14,6)	1,61 (1,05-2,46)	
		A/A	3 (0,6)	3 (0,8)	1,22 (0,24-6,24)	
	Dominante	G/G	426 (90,1)	337 (84,7)	1,00 (Referencia)	0,029
		G/A+A/A	47 (9,9)	61 (15,3)	1,58 (1,05-2,40)	
	Recesivo	G/G+G/A	470 (99,4)	395 (99,2)	1,00 (Referencia)	0,87
		A/A	3 (0,6)	3 (0,8)	1,15 (0,22-5,89)	
	Sobredominante	G/G+A/A	429 (90,7)	340 (85,4)	1,00 (Referencia)	0,028
		G/A	44 (9,3)	58 (14,6)	1,61 (1,05-2,46)	
	Log-aditivo	---	---	---	---	1,49 (1,02-2,19)
rs3218536 (XRCC2) Arg188His	Codominante	G/G	383 (80,3)	314 (79,1)	1,00	0,75
		G/A	90 (18,9)	79 (19,9)	1,12 (0,80-1,59)	
		A/A	4 (0,8)	4 (1)	1,36 (0,33-5,63)	
	Dominante	G/G	383 (80,3)	314 (79,1)	1,00 (Referencia)	0,47
		G/A+A/A	94 (19,7)	83 (20,9)	1,13 (0,81-1,59)	
	Recesivo	G/G+G/A	473 (99,2)	393 (99)	1,00 (Referencia)	0,7
		A/A	4 (0,8)	4 (1)	1,33 (0,32-5,48)	
	Sobredominante	G/G+A/A	387 (81,1)	318 (80,1)	1,00 (Referencia)	0,52
		G/A	90 (18,9)	79 (19,9)	1,12 (0,79-1,58)	
	Log-aditivo	---	---	---	---	1,13 (0,82-1,55)
rs1799796 (XRCC3) A>G	Codominante	A/A	267 (55,9)	236 (59,3)	1,00 (Referencia)	0,34
		A/G	179 (37,5)	145 (36,4)	0,94 (0,71-1,25)	
		G/G	32 (6,7)	17 (4,3)	0,63 (0,34-1,18)	
	Dominante	A/A	267 (55,9)	236 (59,3)	1,00 (Referencia)	0,43
		A/G+G/G	211 (44,1)	162 (40,7)	0,90 (0,68-1,18)	
	Recesivo	A/A+A/G	446 (93,3)	381 (95,7)	1,00 (Referencia)	0,16
		G/G	32 (6,7)	17 (4,3)	0,65 (0,35-1,20)	
	Sobredominante	A/A+G/G	299 (62,5)	253 (63,6)	1,00 (Referencia)	0,88
		A/G	179 (37,5)	145 (36,4)	0,98 (0,74-1,30)	
	Log-aditivo	---	---	---	---	0,87 (0,69-1,09)

^aOR ajustado por edad y género

ANEXO 6

OR (95% CI) por polimorfismo y gen de acuerdo a varios modelos de herencia para el suptipo papilar

SNP (Gen), cambio	Modelo	Genotipo	Controles n (%)	Pacientes n (%)	OR (95% CI) ^a	P
rs1052133 (OGG1) Ser326Cys	Codominante	C/C	294 (63)	215 (64)	1,00 (Referencia)	0,97
		C/G	154 (33)	108 (32,1)	0,98 (0,72-1,33)	
		G/G	19 (4,1)	13 (3,9)	1,07 (0,51-2,26)	
	Dominante	C/C	294 (63)	215 (64)	1,00 (Referencia)	0,94
		C/G+G/G	173 (37)	121 (36)	0,99 (0,73-1,33)	
	Recesivo	C/C+C/G	448 (95,9)	323 (96,1)	1,00 (Referencia)	0,83
		G/G	19 (4,1)	13 (3,9)	1,08 (0,52-2,26)	
	Sobredominante	C/C+G/G	313 (67)	228 (67,9)	1,00 (Referencia)	0,87
		C/G	154 (33)	108 (32,1)	0,97 (0,72-1,32)	
	Log-aditivo	---	---	---	---	1,00 (0,78-1,29)
rs25487 (XRCC1) Arg399Gln	Codominante	G/G	196 (41,4)	125 (38,1)	1,00 (Referencia)	0,43
		G/A	212 (44,7)	160 (48,8)	1,22 (0,90-1,67)	
		A/A	66 (13,9)	43 (13,1)	1,06 (0,67-1,67)	
	Dominante	G/G	196 (41,4)	125 (38,1)	1,00 (Referencia)	0,26
		G/A+A/A	278 (58,6)	203 (61,9)	1,19 (0,88-1,59)	
	Recesivo	G/G+G/A	408 (86,1)	285 (86,9)	1,00 (Referencia)	0,81
		A/A	66 (13,9)	43 (13,1)	0,95 (0,62-1,45)	
	Sobredominante	G/G+A/A	262 (55,3)	168 (51,2)	1,00 (Referencia)	0,2
		G/A	212 (44,7)	160 (48,8)	1,21 (0,90-1,61)	
	Log-aditivo	---	---	---	---	1,08 (0,87-1,33)
rs25489 (XRCC1) Arg280His	Codominante	G/G	426 (90,1)	288 (85,5)	1,00 (Referencia)	0,17
		G/A	44 (9,3)	46 (13,7)	1,52 (0,97-2,39)	
		A/A	3 (0,6)	3 (0,9)	1,46 (0,28-7,49)	
	Dominante	G/G	426 (90,1)	288 (85,5)	1,00 (Referencia)	0,06
		G/A+A/A	47 (9,9)	49 (14,5)	1,52 (0,98-2,35)	
	Recesivo	G/G+G/A	470 (99,4)	334 (99,1)	1,00 (Referencia)	0,7
		A/A	3 (0,6)	3 (0,9)	1,39 (0,27-7,13)	
	Sobredominante	G/G+A/A	429 (90,7)	291 (86,3)	1,00 (Referencia)	0,067
		G/A	44 (9,3)	46 (13,7)	1,52 (0,97-2,38)	
	Log-aditivo	---	---	---	---	1,45 (0,97-2,16)
rs3218536 (XRCC2) Arg188His	Codominante	G/G	383 (80,3)	259 (77,1)	1,00 (Referencia)	0,36
		G/A	90 (18,9)	73 (21,7)	1,26 (0,89-1,80)	
		A/A	4 (0,8)	4 (1,2)	1,63 (0,39-6,76)	
	Dominante	G/G	383 (80,3)	259 (77,1)	1,00 (Referencia)	0,17
		G/A+A/A	94 (19,7)	77 (22,9)	1,28 (0,90-1,81)	
	Recesivo	G/G+G/A	473 (99,2)	332 (98,8)	1,00 (Referencia)	0,55
		A/A	4 (0,8)	4 (1,2)	1,55 (0,37-6,42)	
	Sobredominante	G/G+A/A	387 (81,1)	263 (78,3)	1,00 (Referencia)	0,21
		G/A	90 (18,9)	73 (21,7)	1,26 (0,88-1,79)	
	Log-aditivo	---	---	---	---	1,27 (0,92-1,75)
rs1799796 (XRCC3) A>G	Codominante	A/A	267 (55,9)	199 (59)	1,00 (Referencia)	0,62
		A/G	179 (37,5)	121 (35,9)	0,93 (0,68-1,25)	
		G/G	32 (6,7)	17 (5)	0,75 (0,40-1,40)	
	Dominante	A/A	267 (55,9)	199 (59)	1,00 (Referencia)	0,47
		A/G+G/G	211 (44,1)	138 (41)	0,90 (0,67-1,20)	
	Recesivo	A/A+A/G	446 (93,3)	320 (95)	1,00 (Referencia)	0,4
		G/G	32 (6,7)	17 (5)	0,77 (0,42-1,43)	
	Sobredominante	A/A+G/G	299 (62,5)	216 (64,1)	1,00 (Referencia)	0,74
		A/G	179 (37,5)	121 (35,9)	0,95 (0,71-1,28)	
	Log-aditivo	---	---	---	---	0,90 (0,71-1,13)

^aOR ajustado por edad y género

ANEXO 7

OR (95% CI) por polimorfismo y gen de acuerdo a varios modelos de herencia para el subtipo folicular

SNP (Gen), cambio	Modelo	Genotipo	Controles n (%)	Pacientes n (%)	OR (95% CI) ^a	P	
rs1052133 (OGG1) Ser326Cys	Codominante	C/C	294 (63)	36 (61)	1,00 (Referencia)	0,18	
		C/G	154 (33)	17 (28,8)	0,94 (0,51-1,75)		
		G/G	19 (4,1)	6 (10,2)	2,68 (0,97-7,37)		
	Dominante	C/C	294 (63)	36 (61)	1,00 (Referencia)	0,67	
		C/G+G/G	173 (37)	23 (39)	1,13 (0,64-1,99)		
	Recesivo	C/C+C/G	448 (95,9)	53 (89,8)	1,00 (Referencia)	0,064	
		G/G	19 (4,1)	6 (10,2)	2,73 (1,01-7,36)		
	Sobredominante	C/C+G/G	313 (67)	42 (71,2)	1,00 (Referencia)	0,61	
		C/G	154 (33)	17 (28,8)	0,86 (0,47-1,57)		
	Log-aditivo	---	---	---	---	1,29 (0,82-2,03)	0,27
	rs25487 (XRCC1) Arg399Gln	Codominante	G/G	196 (41,4)	28 (50)	1,00 (Referencia)	0,31
			G/A	212 (44,7)	24 (42,9)	0,88 (0,49-1,59)	
A/A			66 (13,9)	4 (7,1)	0,45 (0,15-1,35)		
Dominante		G/G	196 (41,4)	28 (50)	1,00 (Referencia)	0,38	
		G/A+A/A	278 (58,6)	28 (50)	0,78 (0,44-1,36)		
Recesivo		G/G+G/A	408 (86,1)	52 (92,9)	1,00 (Referencia)	0,14	
		A/A	66 (13,9)	4 (7,1)	0,48 (0,17-1,39)		
Sobredominante		G/G+A/A	262 (55,3)	32 (57,1)	1,00 (Referencia)	0,96	
		G/A	212 (44,7)	24 (42,9)	1,02 (0,57-1,80)		
Log-aditivo		---	---	---	---	0,75 (0,49-1,15)	0,18
rs25489 (XRCC1) Arg280His		Codominante	G/G	426 (90,1)	48 (81,4)	1,00 (Referencia)	0,11
			G/A	44 (9,3)	11 (18,6)	2,07 (0,99-4,33)	
	A/A		3 (0,6)	0 (0)	0,00 (0,00-NA)		
	Dominante	G/G	426 (90,1)	48 (81,4)	1,00 (Referencia)	0,099	
		G/A+A/A	47 (9,9)	11 (18,6)	1,91 (0,92-3,97)		
	Recesivo	G/G+G/A	470 (99,4)	59 (100)	1,00 (Referencia)	0,32	
		A/A	3 (0,6)	0 (0)	0,00 (0,00-NA)		
	Sobredominante	G/G+A/A	429 (90,7)	48 (81,4)	1,00 (Referencia)	0,062	
		G/A	44 (9,3)	11 (18,6)	2,09 (1,00-4,37)		
	Log-aditivo	---	---	---	---	1,62 (0,83-3,19)	0,18
	rs3218536 (XRCC2) Arg188His	Codominante	G/G	383 (80,3)	53 (89,8)	1,00 (Referencia)	0,13
			G/A	90 (18,9)	6 (10,2)	0,47 (0,19-1,14)	
A/A			4 (0,8)	0 (0)	0,00 (0,00-NA)		
Dominante		G/G	383 (80,3)	53 (89,8)	1,00 (Referencia)	0,056	
		G/A+A/A	94 (19,7)	6 (10,2)	0,45 (0,19-1,10)		
Recesivo		G/G+G/A	473 (99,2)	59 (100)	1,00 (Referencia)	0,39	
		A/A	4 (0,8)	0 (0)	0,00 (0,00-NA)		
Sobredominante		G/G+A/A	387 (81,1)	53 (89,8)	1,00 (Referencia)	0,073	
		G/A	90 (18,9)	6 (10,2)	0,47 (0,20-1,15)		
Log-aditivo		---	---	---	---	0,45 (0,19-1,08)	0,05
rs1799796 (XRCC3) A>G		Codominante	A/A	267 (55,9)	35 (59,3)	1,00 (Referencia)	0,023
			A/G	179 (37,5)	24 (40,7)	1,03 (0,59-1,80)	
	G/G		32 (6,7)	0 (0)	0,00 (0,00-NA)		
	Dominante	A/A	267 (55,9)	35 (59,3)	1,00 (Referencia)	0,63	
		A/G+G/G	211 (44,1)	24 (40,7)	0,87 (0,50-1,52)		
	Recesivo	A/A+A/G	446 (93,3)	59 (100)	1,00 (Referencia)	0,006	
		G/G	32 (6,7)	0 (0)	0,00 (0,00-NA)		
	Sobredominante	A/A+G/G	299 (62,5)	35 (59,3)	1,00 (Referencia)	0,63	
		A/G	179 (37,5)	24 (40,7)	1,15 (0,66-2,01)		
	Log-aditivo	---	---	---	---	0,75 (0,46-1,21)	0,23

^aOR ajustado por edad y género

ANEXO 8

Diferencias (95% CI) entre el nivel de daño basal por polimorfismo y gen de acuerdo a varios modelos de herencia para el CTD

SNP (Gen), cambio	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P	
rs1052133 (OGG1) Ser326Cys	Codominante	C/C	75	6,15 ± 0,57	0 (Referencia)	0,016	
		C/G	35	7,4 ± 1,16	1,05 (-1,18 - 3,27)		
		G/G	3	16 ± 6,93	9,49 (2,94 - 16,04)		
	Dominante	C/C	75	6,15 ± 0,57	0 (Referencia)	0,12	
		C/G+G/G	38	8,08 ± 1,22	1,74 (-0,46 - 3,95)		
	Recesivo	C/C+C/G	110	6,55 ± 0,53	0 (Referencia)	0,0065	
		G/G	3	16 ± 6,93	9,23 (2,71 - 15,75)		
	Sobredominante	C/C+G/G	78	6,53 ± 0,63	0 (Referencia)	0,5	
		C/G	35	7,4 ± 1,16	0,78 (-1,51 - 3,07)		
		Log-aditivo	---	---	---	2,16 (0,23 - 4,09)	0,031
	rs25487 (XRCC1) Arg399Gln	Codominante	G/G	33	5,21 ± 0,76	0 (Referencia)	0,2
			G/A	63	7 ± 0,67	1,62 (-0,54 - 3,77)	
A/A			13	7,85 ± 2,2	2,66 (-0,61 - 5,94)		
Dominante		G/G	33	5,21 ± 0,76	0 (Referencia)	0,094	
		G/A+A/A	76	7,14 ± 0,66	1,80 (-0,28 - 3,88)		
Recesivo		G/G+G/A	96	6,39 ± 0,52	0 (Referencia)	0,29	
		A/A	13	7,85 ± 2,2	1,61 (-1,37 - 4,59)		
Sobredominante		G/G+A/A	46	5,96 ± 0,83	0 (Referencia)	0,39	
		G/A	63	7 ± 0,67	0,87 (-1,09 - 2,83)		
		Log-aditivo	---	---	---	1,41 (-0,12 - 2,94)	0,074
rs25489 (XRCC1) Arg280His		Codominante	G/G	98	7 ± 0,62	0 (Referencia)	0,44
			G/A	13	6,15 ± 1,1	-0,20 (-3,50 - 3,11)	
	A/A		2	1 ± 1	-5,21 (-13,21 - 2,79)		
	Dominante	G/G	98	7 ± 0,62	0 (Referencia)	0,59	
		G/A+A/A	15	5,47 ± 1,06	-0,86 (-3,97 - 2,25)		
	Recesivo	G/G+G/A	111	6,9 ± 0,57	0 (Referencia)	0,2	
		A/A	2	1 ± 1	-5,19 (-13,14 - 2,76)		
	Sobredominante	G/G+A/A	100	6,88 ± 0,62	0 (Referencia)	0,96	
		G/A	13	6,15 ± 1,1	-0,08 (-3,39 - 3,22)		
		Log-aditivo	---	---	---	-1,16 (-3,77 - 1,45)	0,39
	rs3218536 (XRCC2) Arg188His	Codominante	G/G	92	6,66 ± 0,61	0 (Referencia)	0,6
			G/A	19	7,11 ± 1,52	1,00 (-1,87 - 3,87)	
A/A			2	10 ± 4	3,29 (-4,76 - 11,35)		
Dominante		G/G	92	6,66 ± 0,61	0 (Referencia)	0,39	
		G/A+A/A	21	7,38 ± 1,41	1,21 (-1,54 - 3,97)		
Recesivo		G/G+G/A	111	6,74 ± 0,57	0 (Referencia)	0,45	
		A/A	2	10 ± 4	3,07 (-4,94 - 11,08)		
Sobredominante		G/G+A/A	94	6,73 ± 0,6	0 (Referencia)	0,53	
		G/A	19	7,11 ± 1,52	0,91 (-1,95 - 3,77)		
		Log-aditivo	---	---	---	1,21 (-1,20 - 3,62)	0,33
rs1799796 (XRCC3) A>G		Codominante	A/A	72	7,44 ± 0,75	0 (Referencia)	0,38
			A/G	36	5,5 ± 0,84	-1,60 (-3,88 - 0,68)	
	G/G		5	6,8 ± 2,18	-0,00 (-5,16 - 5,15)		
	Dominante	A/A	72	7,44 ± 0,75	0 (Referencia)	0,21	
		A/G+G/G	41	5,66 ± 0,78	-1,40 (-3,58 - 0,77)		
	Recesivo	A/A+A/G	108	6,8 ± 0,58	0 (Referencia)	0,84	
		G/G	5	6,8 ± 2,18	0,53 (-4,59 - 5,65)		
	Sobredominante	A/A+G/G	77	7,4 ± 0,72	0 (Referencia)	0,17	
		A/G	36	5,5 ± 0,84	-1,60 (-3,84 - 0,65)		
		Log-aditivo	---	---	---	-0,92 (-2,74 - 0,91)	0,33

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico

ANEXO 9

Diferencias (95% CI) entre el nivel de daño tras la irradiación por polimorfismo y gen de acuerdo a varios modelos de herencia para el CTD

SNP (Gen), cambio	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P	
rs1052133 (OGG1) Ser326Cys	Codominante	C/C	75	29,69 ± 1,69	0 (Referencia)	0,24	
		C/G	35	35,51 ± 3,15	5,64 (-0,86 - 12,14)		
		G/G	3	28,33 ± 9,94	-0,75 (-19,89 - 18,40)		
	Dominante	C/C	75	29,69 ± 1,69	0 (Referencia)	0,11	
		C/G+G/G	38	34,95 ± 2,99	5,11 (-1,17 - 11,39)		
	Recesivo	C/C+C/G	110	31,55 ± 1,54	0 (Referencia)	0,83	
		G/G	3	28,33 ± 9,94	-2,12 (-21,36 - 17,13)		
	Sobredominante	C/C+G/G	78	29,64 ± 1,66	0 (Referencia)	0,088	
		C/G	35	35,51 ± 3,15	5,66 (-0,79 - 12,11)		
		Log-aditivo	---	---		3,83 (-1,75 - 9,41)	0,18
	rs25487 (XRCC1) Arg399Gln	Codominante	G/G	33	28,39 ± 1,95	0 (Referencia)	0,47
			G/A	63	32,33 ± 2,29	3,77 (-2,93 - 10,46)	
A/A			13	33,46 ± 3,49	5,00 (-5,20 - 15,19)		
Dominante		G/G	33	28,39 ± 1,95	0 (Referencia)	0,23	
		G/A+A/A	76	32,53 ± 1,98	3,98 (-2,48 - 10,44)		
Recesivo		G/G+G/A	96	30,98 ± 1,65	0 (Referencia)	0,59	
		A/A	13	33,46 ± 3,49	2,54 (-6,68 - 11,77)		
Sobredominante		G/G+A/A	46	29,83 ± 1,73	0 (Referencia)	0,45	
		G/A	63	32,33 ± 2,29	2,36 (-3,68 - 8,41)		
		Log-aditivo	---	---		2,85 (-1,92 - 7,61)	0,24
rs25489 (XRCC1) Arg280His		Codominante	G/G	98	32,1 ± 1,63	0 (Referencia)	0,45
			G/A	13	28,46 ± 4,63	-2,96 (-12,38 - 6,46)	
	A/A		2	19,5 ± 8,5	-13,28 (-36,08 - 9,53)		
	Dominante	G/G	98	32,1 ± 1,63	0 (Referencia)	0,34	
		G/A+A/A	15	27,27 ± 4,16	-4,32 (-13,17 - 4,52)		
	Recesivo	G/G+G/A	111	31,68 ± 1,53	0 (Referencia)	0,27	
		A/A	2	19,5 ± 8,5	-12,90 (-35,61 - 9,81)		
	Sobredominante	G/G+A/A	100	31,85 ± 1,61	0 (Referencia)	0,58	
		G/A	13	28,46 ± 4,63	-2,67 (-12,09 - 6,74)		
		Log-aditivo	---	---		-4,43 (-11,85 - 2,99)	0,24
	rs3218536 (XRCC2) Arg188His	Codominante	G/G	92	31,34 ± 1,61	0 (Referencia)	0,97
			G/A	19	32,16 ± 4,53	0,35 (-7,87 - 8,57)	
A/A			2	30,5 ± 15,5	-2,77 (-25,84 - 20,31)		
Dominante		G/G	92	31,34 ± 1,61	0 (Referencia)	0,99	
		G/A+A/A	21	32 ± 4,23	0,06 (-7,82 - 7,95)		
Recesivo		G/G+G/A	111	31,48 ± 1,53	0 (Referencia)	0,81	
		A/A	2	30,5 ± 15,5	-2,84 (-25,74 - 20,05)		
Sobredominante		G/G+A/A	94	31,32 ± 1,59	0 (Referencia)	0,92	
		G/A	19	32,16 ± 4,53	0,43 (-7,73 - 8,59)		
		Log-aditivo	---	---		-0,21 (-7,12 - 6,70)	0,95
rs1799796 (XRCC3) A>G		Codominante	A/A	72	31,6 ± 1,82	0 (Referencia)	0,71
			A/G	36	30,39 ± 2,97	-0,64 (-7,18 - 5,90)	
	G/G		5	37,2 ± 6,66	5,75 (-9,04 - 20,54)		
	Dominante	A/A	72	31,6 ± 1,82	0 (Referencia)	0,96	
		A/G+G/G	41	31,22 ± 2,73	0,14 (-6,11 - 6,40)		
	Recesivo	A/A+A/G	108	31,19 ± 1,56	0 (Referencia)	0,42	
		G/G	5	37,2 ± 6,66	5,96 (-8,61 - 20,52)		
	Sobredominante	A/A+G/G	77	31,96 ± 1,75	0 (Referencia)	0,76	
		A/G	36	30,39 ± 2,97	-1,01 (-7,47 - 5,44)		
		Log-aditivo	---	---		0,87 (-4,37 - 6,10)	0,75

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico

ANEXO 10

Diferencias (95% CI) entre el incremento de daño por polimorfismo y gen de acuerdo a varios modelos de herencia para el CTD

SNP (Gen), cambio	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P	
rs1052133 (OGG1) Ser326Cys	Codominante	C/C	75	23,61 ± 1,5	0 (Referencia)	0,11	
		C/G	35	28,11 ± 2,48	4,53 (-0,98 - 10,04)		
		G/G	3	12,33 ± 6,23	-10,38 (-26,60 - 5,84)		
	Dominante	C/C	75	23,61 ± 1,5	0 (Referencia)	0,23	
		C/G+G/G	38	26,87 ± 2,42	3,30 (-2,08 - 8,69)		
	Recesivo	C/C+C/G	110	25,05 ± 1,3	0 (Referencia)	0,17	
		G/G	3	12,33 ± 6,23	-11,48 (-27,76 - 4,80)		
	Sobredominante	C/C+G/G	78	23,18 ± 1,48	0 (Referencia)	0,089	
		C/G	35	28,11 ± 2,48	4,82 (-0,68 - 10,32)		
		Log-aditivo	---	---	1,61 (-3,18 - 6,40)	0,51	
	rs25487 (XRCC1) Arg399Gln	Codominante	G/G	33	23,18 ± 1,63	0 (Referencia)	0,74
			G/A	63	25,41 ± 1,99	2,23 (-3,66 - 8,12)	
A/A			13	25,62 ± 3,52	2,34 (-6,62 - 11,31)		
Dominante		G/G	33	23,18 ± 1,63	0 (Referencia)	0,44	
		G/A+A/A	76	25,45 ± 1,75	2,25 (-3,43 - 7,93)		
Recesivo		G/G+G/A	96	24,65 ± 1,42	0 (Referencia)	0,83	
		A/A	13	25,62 ± 3,52	0,89 (-7,19 - 8,97)		
Sobredominante		G/G+A/A	46	23,87 ± 1,52	0 (Referencia)	0,56	
		G/A	63	25,41 ± 1,99	1,57 (-3,73 - 6,87)		
		Log-aditivo	---	---	1,46 (-2,73 - 5,65)	0,5	
rs25489 (XRCC1) Arg280His		Codominante	G/G	98	25,13 ± 1,37	0 (Referencia)	0,6
			G/A	13	22,46 ± 4,42	-2,64 (-10,70 - 5,41)	
	A/A		2	18,5 ± 7,5	-8,05 (-27,57 - 11,46)		
	Dominante	G/G	98	25,13 ± 1,37	0 (Referencia)	0,39	
		G/A+A/A	15	21,93 ± 3,9	-3,36 (-10,91 - 4,19)		
	Recesivo	G/G+G/A	111	24,82 ± 1,31	0 (Referencia)	0,44	
		A/A	2	18,5 ± 7,5	-7,72 (-27,16 - 11,71)		
	Sobredominante	G/G+A/A	100	25 ± 1,35	0 (Referencia)	0,55	
		G/A	13	22,46 ± 4,42	-2,47 (-10,50 - 5,56)		
		Log-aditivo	---	---			
	rs3218536 (XRCC2) Arg188His	Codominante	G/G	92	24,71 ± 1,4	0 (Referencia)	0,83
			G/A	19	25,16 ± 3,56	-0,54 (-7,55 - 6,46)	
A/A			2	20,5 ± 11,5	-6,03 (-25,69 - 13,63)		
Dominante		G/G	92	24,71 ± 1,4	0 (Referencia)	0,76	
		G/A+A/A	21	24,71 ± 3,32	-1,05 (-7,78 - 5,68)		
Recesivo		G/G+G/A	111	24,78 ± 1,3	0 (Referencia)	0,55	
		A/A	2	20,5 ± 11,5	-5,91 (-25,42 - 13,60)		
Sobredominante		G/G+A/A	94	24,62 ± 1,38	0 (Referencia)	0,92	
		G/A	19	25,16 ± 3,56	-0,37 (-7,33 - 6,59)		
		Log-aditivo	---	---			
rs1799796 (XRCC3) A>G		Codominante	A/A	72	24,18 ± 1,52	0 (Referencia)	0,66
			A/G	36	24,97 ± 2,58	1,01 (-4,56 - 6,59)	
	G/G		5	30,4 ± 6,02	5,74 (-6,87 - 18,35)		
	Dominante	A/A	72	24,18 ± 1,52	0 (Referencia)	0,56	
		A/G+G/G	41	25,63 ± 2,37	1,59 (-3,74 - 6,92)		
	Recesivo	A/A+A/G	108	24,44 ± 1,32	0 (Referencia)	0,4	
		G/G	5	30,4 ± 6,02	5,41 (-7,02 - 17,83)		
	Sobredominante	A/A+G/G	77	24,58 ± 1,47	0 (Referencia)	0,82	
		A/G	36	24,97 ± 2,58	0,64 (-4,87 - 6,15)		
		Log-aditivo	---	---	1,81 (-2,65 - 6,26)	0,43	

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico

ANEXO 11

Diferencias (95% CI) entre el nivel de daño basal por polimorfismo y gen de acuerdo a varios modelos de herencia para el CT de tipo papilar

SNP (Gen), cambio	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P	
rs1052133 (OGG1) Ser326Cys	Codominante	C/C	64	6,22 ± 0,64	0 (Referencia)	0,85	
		C/G	32	7,28 ± 1,2	0,68 (-1,65 - 3,02)		
		G/G	1	4 ± 0	0,45 (-10,54 - 11,43)		
	Dominante	C/C	64	6,22 ± 0,64	0 (Referencia)	0,56	
		C/G+G/G	33	7,18 ± 1,17	0,68 (-1,62 - 2,97)		
	Recesivo	C/C+C/G	96	6,57 ± 0,59	0 (Referencia)	0,96	
		G/G	1	4 ± 0	0,25 (-10,68 - 11,17)		
	Sobredominante	C/C+G/G	65	6,18 ± 0,64	0 (Referencia)	0,57	
		C/G	32	7,28 ± 1,2	0,68 (-1,64 - 3,00)		
		Log-aditivo	---	---	---	0,62 (-1,56 - 2,80)	0,58
	rs25487 (XRCC1) Arg399Gln	Codominante	G/G	29	4,83 ± 0,79	0 (Referencia)	0,26
			G/A	54	6,93 ± 0,72	1,81 (-0,34 - 3,97)	
A/A			12	6,17 ± 1,54	1,32 (-1,87 - 4,52)		
Dominante		G/G	29	4,83 ± 0,79	0 (Referencia)	0,11	
		G/A+A/A	66	6,79 ± 0,64	1,72 (-0,35 - 3,79)		
Recesivo		G/G+G/A	83	6,19 ± 0,55	0 (Referencia)	0,91	
		A/A	12	6,17 ± 1,54	0,16 (-2,74 - 3,07)		
Sobredominante		G/G+A/A	41	5,22 ± 0,71	0 (Referencia)	0,15	
		G/A	54	6,93 ± 0,72	1,42 (-0,52 - 3,36)		
		Log-aditivo	---	---	---	0,95 (-0,56 - 2,46)	0,22
rs25489 (XRCC1) Arg280His		Codominante	G/G	84	6,67 ± 0,65	0 (Referencia)	0,39
			G/A	11	6,64 ± 1,23	0,54 (-2,89 - 3,97)	
	A/A		2	1 ± 1	-5,15 (-12,81 - 2,52)		
	Dominante	G/G	84	6,67 ± 0,65	0 (Referencia)	0,85	
		G/A+A/A	13	5,77 ± 1,19	-0,32 (-3,53 - 2,89)		
	Recesivo	G/G+G/A	95	6,66 ± 0,59	0 (Referencia)	0,18	
		A/A	2	1 ± 1	-5,22 (-12,83 - 2,39)		
	Sobredominante	G/G+A/A	86	6,53 ± 0,64	0 (Referencia)	0,7	
		G/A	11	6,64 ± 1,23	0,68 (-2,76 - 4,12)		
		Log-aditivo	---	---	---	-0,83 (-3,47 - 1,81)	0,54
	rs3218536 (XRCC2) Arg188His	Codominante	G/G	76	6,32 ± 0,63	0 (Referencia)	0,57
			G/A	19	7,11 ± 1,52	1,00 (-1,75 - 3,75)	
A/A			2	10 ± 4	3,31 (-4,42 - 11,04)		
Dominante		G/G	76	6,32 ± 0,63	0 (Referencia)	0,37	
		G/A+A/A	21	7,38 ± 1,41	1,21 (-1,43 - 3,85)		
Recesivo		G/G+G/A	95	6,47 ± 0,59	0 (Referencia)	0,43	
		A/A	2	10 ± 4	3,08 (-4,60 - 10,77)		
Sobredominante		G/G+A/A	78	6,41 ± 0,62	0 (Referencia)	0,52	
		G/A	19	7,11 ± 1,52	0,90 (-1,84 - 3,64)		
		Log-aditivo	---	---	---	1,21 (-1,10 - 3,52)	0,31
rs1799796 (XRCC3) A>G		Codominante	A/A	62	7,23 ± 0,77	0 (Referencia)	0,43
			A/G	30	5,1 ± 0,88	-1,56 (-3,96 - 0,83)	
	G/G		5	6,8 ± 2,18	-0,00 (-4,96 - 4,96)		
	Dominante	A/A	62	7,23 ± 0,77	0 (Referencia)	0,25	
		A/G+G/G	35	5,34 ± 0,81	-1,34 (-3,61 - 0,93)		
	Recesivo	A/A+A/G	92	6,53 ± 0,6	0 (Referencia)	0,84	
		G/G	5	6,8 ± 2,18	0,52 (-4,39 - 5,43)		
	Sobredominante	A/A+G/G	67	7,19 ± 0,73	0 (Referencia)	0,2	
		A/G	30	5,1 ± 0,88	-1,56 (-3,91 - 0,79)		
		Log-aditivo	---	---	---	-0,81 (-2,67 - 1,04)	0,39

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico

ANEXO 12

Diferencias (95% CI) entre el nivel de daño tras la irradiación por polimorfismo y gen de acuerdo a varios modelos de herencia para el CT de tipo papilar

SNP (Gen), cambio	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P	
rs1052133 (OGG1) Ser326Cys	Codominante	C/C	64	30,84 ± 1,8	0 (Referencia)	0,61	
		C/G	32	34,19 ± 2,9	3,03 (-3,33 - 9,39)		
		G/G	1	21 ± 0	-4,45 (-34,37 - 25,47)		
	Dominante	C/C	64	30,84 ± 1,8	0 (Referencia)	0,38	
		C/G+G/G	33	33,79 ± 2,83	2,79 (-3,47 - 9,05)		
	Recesivo	C/C+C/G	96	31,96 ± 1,54	0 (Referencia)	0,73	
		G/G	1	21 ± 0	-5,33 (-35,18 - 24,51)		
	Sobredominante	C/C+G/G	65	30,69 ± 1,77	0 (Referencia)	0,34	
		C/G	32	34,19 ± 2,9	3,09 (-3,23 - 9,40)		
		Log-aditivo	---	---	---	2,31 (-3,65 - 8,27)	0,45
	rs25487 (XRCC1) Arg399Gln	Codominante	G/G	29	28,72 ± 2,19	0 (Referencia)	0,62
			G/A	54	32,54 ± 2,23	3,06 (-3,54 - 9,66)	
A/A			12	32,25 ± 3,56	3,53 (-6,25 - 13,31)		
Dominante		G/G	29	28,72 ± 2,19	0 (Referencia)	0,33	
		G/A+A/A	66	32,48 ± 1,92	3,15 (-3,19 - 9,49)		
Recesivo		G/G+G/A	83	31,2 ± 1,64	0 (Referencia)	0,73	
		A/A	12	32,25 ± 3,56	1,56 (-7,24 - 10,37)		
Sobredominante		G/G+A/A	41	29,76 ± 1,86	0 (Referencia)	0,5	
		G/A	54	32,54 ± 2,23	2,03 (-3,90 - 7,96)		
		Log-aditivo	---	---	---	2,09 (-2,52 - 6,70)	0,38
rs25489 (XRCC1) Arg280His		Codominante	G/G	84	32,6 ± 1,65	0 (Referencia)	0,34
			G/A	11	28,36 ± 4,36	-3,77 (-13,13 - 5,59)	
	A/A		2	19,5 ± 8,5	-13,91 (-34,82 - 7,00)		
	Dominante	G/G	84	32,6 ± 1,65	0 (Referencia)	0,24	
		G/A+A/A	13	27 ± 3,9	-5,31 (-14,02 - 3,41)		
	Recesivo	G/G+G/A	95	32,11 ± 1,54	0 (Referencia)	0,21	
		A/A	2	19,5 ± 8,5	-13,40 (-34,23 - 7,42)		
	Sobredominante	G/G+A/A	86	32,29 ± 1,63	0 (Referencia)	0,48	
		G/A	11	28,36 ± 4,36	-3,40 (-12,78 - 5,98)		
		Log-aditivo	---	---	---	-5,18 (-12,33 - 1,97)	0,16
	rs3218536 (XRCC2) Arg188His	Codominante	G/G	76	31,8 ± 1,58	0 (Referencia)	0,94
			G/A	19	32,16 ± 4,53	0,22 (-7,34 - 7,78)	
A/A			2	30,5 ± 15,5	-3,77 (-25,01 - 17,47)		
Dominante		G/G	76	31,8 ± 1,58	0 (Referencia)	0,97	
		G/A+A/A	21	32 ± 4,23	-0,14 (-7,40 - 7,11)		
Recesivo		G/G+G/A	95	31,87 ± 1,54	0 (Referencia)	0,72	
		A/A	2	30,5 ± 15,5	-3,82 (-24,88 - 17,24)		
Sobredominante		G/G+A/A	78	31,77 ± 1,56	0 (Referencia)	0,93	
		G/A	19	32,16 ± 4,53	0,33 (-7,17 - 7,83)		
		Log-aditivo	---	---	---	-0,46 (-6,82 - 5,90)	0,89
rs1799796 (XRCC3) A>G		Codominante	A/A	62	32,45 ± 1,94	0 (Referencia)	0,59
			A/G	30	29,7 ± 2,68	-1,78 (-8,35 - 4,78)	
	G/G		5	37,2 ± 6,66	5,47 (-8,13 - 19,07)		
	Dominante	A/A	62	32,45 ± 1,94	0 (Referencia)	0,82	
		A/G+G/G	35	30,77 ± 2,49	-0,74 (-6,98 - 5,50)		
	Recesivo	A/A+A/G	92	31,55 ± 1,57	0 (Referencia)	0,38	
		G/G	5	37,2 ± 6,66	6,07 (-7,30 - 19,43)		
	Sobredominante	A/A+G/G	67	32,81 ± 1,86	0 (Referencia)	0,5	
		A/G	30	29,7 ± 2,68	-2,21 (-8,68 - 4,25)		
		Log-aditivo	---	---	---	0,38 (-4,71 - 5,47)	0,88

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico

ANEXO 13

Diferencias (95% CI) entre el incremento de daño por polimorfismo y gen de acuerdo a varios modelos de herencia para el CT de tipo papilar

SNP (Gen), cambio	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P	
rs1052133 (OGG1) Ser326Cys	Codominante	C/C	64	24,66 ± 1,59	0 (Referencia)	0,64	
		C/G	32	26,91 ± 2,25	2,31 (-3,11 - 7,73)		
		G/G	1	17 ± 0	-4,91 (-30,42 - 20,60)		
	Dominante	C/C	64	24,66 ± 1,59	0 (Referencia)	0,45	
		C/G+G/G	33	26,61 ± 2,2	2,08 (-3,26 - 7,42)		
	Recesivo	C/C+C/G	96	25,41 ± 1,3	0 (Referencia)	0,67	
		G/G	1	17 ± 0	-5,58 (-31,00 - 19,84)		
	Sobredominante	C/C+G/G	65	24,54 ± 1,57	0 (Referencia)	0,39	
		C/G	32	26,91 ± 2,25	2,37 (-3,01 - 7,76)		
		Log-aditivo	---	---	---	1,66 (-3,42 - 6,74)	0,52
	rs25487 (XRCC1) Arg399Gln	Codominante	G/G	29	23,9 ± 1,8	0 (Referencia)	0,86
			G/A	54	25,65 ± 1,93	1,29 (-4,54 - 7,11)	
A/A			12	26,08 ± 3,8	2,20 (-6,42 - 10,83)		
Dominante		G/G	29	23,9 ± 1,8	0 (Referencia)	0,61	
		G/A+A/A	66	25,73 ± 1,71	1,46 (-4,14 - 7,06)		
Recesivo		G/G+G/A	83	25,04 ± 1,4	0 (Referencia)	0,73	
		A/A	12	26,08 ± 3,8	1,38 (-6,36 - 9,12)		
Sobredominante		G/G+A/A	41	24,54 ± 1,67	0 (Referencia)	0,81	
		G/A	54	25,65 ± 1,93	0,64 (-4,59 - 5,87)		
		Log-aditivo	---	---	---	1,15 (-2,91 - 5,21)	0,58
rs25489 (XRCC1) Arg280His		Codominante	G/G	84	25,93 ± 1,37	0 (Referencia)	0,4
			G/A	11	21,91 ± 4,19	-4,13 (-12,12 - 3,86)	
	A/A		2	18,5 ± 7,5	-8,75 (-26,60 - 9,09)		
	Dominante	G/G	84	25,93 ± 1,37	0 (Referencia)	0,21	
		G/A+A/A	13	21,38 ± 3,63	-4,83 (-12,24 - 2,59)		
	Recesivo	G/G+G/A	95	25,46 ± 1,3	0 (Referencia)	0,37	
		A/A	2	18,5 ± 7,5	-8,20 (-26,02 - 9,62)		
	Sobredominante	G/G+A/A	86	25,76 ± 1,35	0 (Referencia)	0,34	
		G/A	11	21,91 ± 4,19	-3,89 (-11,86 - 4,08)		
		Log-aditivo	---	---	---	-4,24 (-10,33 - 1,86)	0,18
	rs3218536 (XRCC2) Arg188His	Codominante	G/G	76	25,49 ± 1,37	0 (Referencia)	0,74
			G/A	19	25,16 ± 3,56	-0,67 (-7,09 - 5,76)	
A/A			2	20,5 ± 11,5	-7,08 (-25,13 - 10,98)		
Dominante		G/G	76	25,49 ± 1,37	0 (Referencia)	0,69	
		G/A+A/A	21	24,71 ± 3,32	-1,25 (-7,43 - 4,92)		
Recesivo		G/G+G/A	95	25,42 ± 1,3	0 (Referencia)	0,45	
		A/A	2	20,5 ± 11,5	-6,92 (-24,82 - 10,98)		
Sobredominante		G/G+A/A	78	25,36 ± 1,36	0 (Referencia)	0,89	
		G/A	19	25,16 ± 3,56	-0,46 (-6,85 - 5,93)		
		Log-aditivo	---	---	---	-1,59 (-7,00 - 3,81)	0,56
rs1799796 (XRCC3) A>G		Codominante	A/A	62	25,26 ± 1,58	0 (Referencia)	0,64
			A/G	30	24,6 ± 2,41	-0,25 (-5,85 - 5,35)	
	G/G		5	30,4 ± 6,02	5,44 (-6,15 - 17,04)		
	Dominante	A/A	62	25,26 ± 1,58	0 (Referencia)	0,83	
		A/G+G/G	35	25,43 ± 2,23	0,57 (-4,75 - 5,89)		
	Recesivo	A/A+A/G	92	25,04 ± 1,32	0 (Referencia)	0,34	
		G/G	5	30,4 ± 6,02	5,53 (-5,85 - 16,91)		
	Sobredominante	A/A+G/G	67	25,64 ± 1,53	0 (Referencia)	0,81	
		A/G	30	24,6 ± 2,41	-0,68 (-6,20 - 4,85)		
		Log-aditivo	---	---	---	1,17 (-3,16 - 5,51)	0,6

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico

ANEXO 14

Diferencias (95% CI) entre el nivel de daño basal por polimorfismo y gen de acuerdo a varios modelos de herencia para el CT de tipo folicular

SNP (Gen), cambio	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P	
rs1052133 (OGG1) Ser326Cys	Codominante	C/C	11	5,73 ± 1,01	0 (Referencia)	0,0065	
		C/G	3	8,67 ± 5,24	2,61 (-4,43 - 9,66)		
		G/G	2	22 ± 6	17,21 (8,80 - 25,63)		
	Dominante	C/C	11	5,73 ± 1,01	0 (Referencia)	0,026	
		C/G+G/G	5	14 ± 4,74	8,60 (1,94 - 15,26)		
	Recesivo	C/C+C/G	14	6,36 ± 1,28	0 (Referencia)	0,0015	
		G/G	2	22 ± 6	17,15 (8,91 - 25,40)		
	Sobredominante	C/C+G/G	13	8,23 ± 2,01	0 (Referencia)	0,67	
		C/G	3	8,67 ± 5,24	2,35 (-8,23 - 12,93)		
	Log-aditivo	---	---	---	7,05 (3,25 - 10,86)	0,0034	
	rs25487 (XRCC1) Arg399Gln	Codominante	G/G	4	8 ± 2,27	0 (Referencia)	0,042
			G/A	9	7,44 ± 1,98	-0,58 (-8,44 - 7,29)	
A/A			1	28 ± 0	20,99 (6,83 - 35,15)		
Dominante		G/G	4	8 ± 2,27	0 (Referencia)	0,56	
		G/A+A/A	10	9,5 ± 2,71	3,04 (-6,88 - 12,95)		
Recesivo		G/G+G/A	13	7,62 ± 1,49	0 (Referencia)	0,0097	
		A/A	1	28 ± 0	21,24 (8,19 - 34,29)		
Sobredominante		G/G+A/A	5	12 ± 4,37	0 (Referencia)	0,52	
		G/A	9	7,44 ± 1,98	-3,39 (-13,47 - 6,68)		
Log-aditivo		---	---	---	5,72 (-1,34 - 12,78)	0,14	
rs25489 (XRCC1) Arg280His		Codominante	G/G	14	9 ± 2,02	0 (Referencia)	0,45
			G/A	2	3,5 ± 1,5	-4,64 (-16,41 - 7,13)	
	A/A		---	---	---		
rs3218536 (XRCC2) Arg188His	Codominante	G/G	---	---	---		
		G/A	---	---	---		
		A/A	---	---	---		
rs1799796 (XRCC3) A>G	Codominante	A/A	10	8,8 ± 2,62	0 (Referencia)	0,6	
		A/G	6	7,5 ± 2,4	-2,16 (-10,09 - 5,76)		
		G/G	---	---	---		

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico

ANEXO 15

Diferencias (95% CI) entre el nivel de daño tras la irradiación por polimorfismo y gen de acuerdo a varios modelos de herencia para el CT de tipo folicular

SNP (Gen), cambio	Modelo	Genotipo	n	Media (EE)	Diferencia (95% CI) ^a	P	
rs1052133 (OGG1) Ser326Cys	Codominante	C/C	11	23 ± 4,57	0 (Referencia)	0,27	
		C/G	3	49,67 ± 21,76	25,98 (-4,97 - 56,92)		
		G/G	2	32 ± 16	10,20 (-26,77 - 47,17)		
	Dominante	C/C	11	23 ± 4,57	0 (Referencia)	0,13	
		C/G+G/G	5	42,6 ± 13,65	19,50 (-3,86 - 42,86)		
	Recesivo	C/C+C/G	14	28,71 ± 6,12	0 (Referencia)	0,64	
		G/G	2	32 ± 16	9,63 (-29,88 - 49,14)		
	Sobredominante	C/C+G/G	13	24,38 ± 4,34	0 (Referencia)	0,12	
		C/G	3	49,67 ± 21,76	25,82 (-4,20 - 55,84)		
		Log-aditivo	---	---	---	10,51 (-5,69 - 26,71)	0,23
	rs25487 (XRCC1) Arg399Gln	Codominante	G/G	4	26 ± 2,86	0 (Referencia)	0,7
			G/A	9	31,11 ± 9,27	-0,38 (-33,19 - 32,43)	
A/A			1	48 ± 0	25,00 (-34,09 - 84,09)		
Dominante		G/G	4	26 ± 2,86	0 (Referencia)	0,81	
		G/A+A/A	10	32,8 ± 8,46	3,87 (-26,85 - 34,59)		
Recesivo		G/G+G/A	13	29,54 ± 6,38	0 (Referencia)	0,39	
		A/A	1	48 ± 0	25,17 (-29,23 - 79,57)		
Sobredominante		G/G+A/A	5	30,4 ± 4,93	0 (Referencia)	0,82	
		G/A	9	31,11 ± 9,27	-3,74 (-35,07 - 27,60)		
		Log-aditivo	---	---	---	6,94 (-16,79 - 30,68)	0,58
rs25489 (XRCC1) Arg280His		Codominante	G/G	14	29,14 ± 5,79	0 (Referencia)	0,86
			G/A	2	29 ± 25	-3,56 (-41,27 - 34,15)	
	A/A		---	---	---		
rs3218536 (XRCC2) Arg188His	Codominante	G/G	---	---	---		
		G/A	---	---	---		
		A/A	---	---	---		
rs1799796 (XRCC3) A>G	Codominante	A/A	10	26,3 ± 5,1	0 (Referencia)	0,52	
		A/G	6	33,83 ± 12,64	8,44 (-16,21 - 33,08)		
		G/G	---	---	---		

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico

ANEXO 16

Diferencias (95% CI) entre el incremento de daño por polimorfismo y gen de acuerdo a varios modelos de herencia para el CT de tipo folicular

SNP (Gen), cambio	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P	
rs1052133 (OGG1) Ser326Cys	Codominante	C/C	11	17,55 ± 4,13	0 (Referencia)	0,24	
		C/G	3	41 ± 17,21	22,84 (-2,76 - 48,43)		
		G/G	2	10 ± 10	-6,97 (-37,55 - 23,60)		
	Dominante	C/C	11	17,55 ± 4,13	0 (Referencia)	0,34	
		C/G+G/G	5	28,6 ± 12,51	10,60 (-10,15 - 31,36)		
	Recesivo	C/C+C/G	14	22,57 ± 5,22	0 (Referencia)	0,67	
		G/G	2	10 ± 10	-7,47 (-40,56 - 25,61)		
	Sobredominante	C/C+G/G	13	16,38 ± 3,73	0 (Referencia)	0,094	
		C/G	3	41 ± 17,21	22,94 (-1,78 - 47,66)		
	Log-aditivo	---	---	---	3,33 (-10,98 - 17,64)	0,66	
	rs25487 (XRCC1) Arg399Gln	Codominante	G/G	4	18 ± 2,12	0 (Referencia)	0,99
			G/A	9	24 ± 8,23	0,35 (-28,18 - 28,88)	
A/A			1	20 ± 0	4,17 (-47,21 - 55,54)		
Dominante		G/G	4	18 ± 2,12	0 (Referencia)	0,94	
		G/A+A/A	10	23,6 ± 7,37	0,99 (-24,79 - 26,77)		
Recesivo		G/G+G/A	13	22,15 ± 5,68	0 (Referencia)	0,87	
		A/A	1	20 ± 0	4,02 (-43,28 - 51,31)		
Sobredominante		G/G+A/A	5	18,4 ± 1,69	0 (Referencia)	0,99	
		G/A	9	24 ± 8,23	-0,21 (-26,51 - 26,09)		
Log-aditivo		---	---	---	1,34 (-18,84 - 21,51)	0,9	
rs25489 (XRCC1) Arg280His		Codominante	G/G	14	20,36 ± 4,85	0 (Referencia)	0,97
			G/A	2	25,5 ± 23,5	0,65 (-30,93 - 32,23)	
	A/A		---	---	---		
rs3218536 (XRCC2) Arg188His	Codominante	G/G	---	---	---		
		G/A	---	---	---		
		A/A	---	---	---		
rs1799796 (XRCC3) A>G	Codominante	A/A	10	17,5 ± 4,43	0 (Referencia)	0,3	
		A/G	6	26,83 ± 10,54	11,18 (-8,84 - 31,21)		
		G/G	---	---	---		

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico

ANEXO 17

Diferencias (95% CI) en el nivel de daño basal para la interacción entre XRCC1 (rs25487, Arg399Gln) y OGG1 (rs1052133, Ser326Cys)

XRCC1 Arg399Gln rs25487	OGG1 Ser326Cys rs1052133	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a
GG	CC	24	5,04 ± 0,86	0 (Referencia)
	CG	8	5,88 ± 1,82	0,03 (-3,96 – 4,01)
	GG	1	4 ± ---	1,03 (-8,83 – 10,90)
GA	CC	41	6,41 ± 0,58	1,13 (-1,34 – 3,60)
	CG	21	7,71 ± 1,61	2,46 (-0,40 – 5,31)
	GG	1	16 ± ---	10,37 (0,05 – 20,70)
AA	CC	7	5,43 ± 1,04	0,29 (-3,85 – 4,43)
	CG	5	7,2 ± 3,6	2,41 (-2,34 – 7,15)
	GG	1	28 ± ---	19,93 (9,77 – 30,09)

Interacción (P= 0,18)

EE, error estándar

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico,

ANEXO 18

Diferencias (95% CI) en el nivel de daño basal para la interacción entre XRCC1 (rs25489, Arg280His) y OGG1 (rs1052133, Ser326Cys)

XRCC1 Arg280His rs25489	OGG1 Ser326Cys rs1052133	n	Media \pm EE	Diferencia (95% CI) ^a
GG	CC	64	6,34 \pm 0,64	0 (Referencia)
	CG	31	7,48 \pm 1,27	1,17 (-1,23 – 3,57)
	GG	3	16 \pm 6,93	9,43 (2,83 – 16,04)
GA	CC	9	5,89 \pm 1,16	0,75 (-3,16 – 4,67)
	CG	4	6,75 \pm 2,72	-0,12 (-5,72 – 5,49)
	GG	0	---	---
AA	CC	2	1 \pm 1	-4,63 (-12,48 – 3,21)
	CG	0	---	---
	GG	0	---	---

Interacción (P= 0,57)

EE, error estándar

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico,

ANEXO 19

Diferencias (95% CI) en el nivel de daño basal para la interacción entre XRCC2 (rs3218536, Arg188His) y XRCC3 (rs1799796, IVS7-14 A>G)

XRCC3 IVS7-14 A>G rs1799796	XRCC2 Arg188His rs3218536	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a
AA	GG	56	7,48 ± 0,83	0 (Referencia)
	GA	15	7,4 ± 1,92	0,94 (-2,38 – 4,26)
	AA	1	6 ± ---	-1,35 (-12,66 – 9,96)
AG	GG	33	5,52 ± 0,91	-1,25 (-3,75 – 1,24)
	GA	3	5,33 ± 0,88	-3,10 (-9,83 – 3,64)
	AA	0	---	---
GG	GG	3	4 ± 1,73	-3,24 (-9,91 – 3,43)
	GA	1	8 ± ---	3,81 (-7,68 – 15,29)
	AA	1	14 ± ---	6,91 (-4,66 – 18,48)

Interacción (P=0,43)

EE, error estándar

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico,

ANEXO 20

Diferencias (95% CI) en el nivel de daño tras la irradiación para la interacción entre XRCC1 (rs25487, Arg399Gln) y OGG1 (rs1052133, Ser326Cys)

XRCC1 Arg399 rs25487	OGG1 Ser326Cys rs1052133	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a
GG	CC	24	28,62 ± 2,18	0 (Referencia)
	CG	8	28,62 ± 4,92	-1,63 (-14,39 – 11,14)
	GG	1	21 ± ---	-4,53 (-36,12 – 27,07)
GA	CC	41	28,95 ± 2,4	-0,26 (-8,17 – 7,64)
	CG	21	39,71 ± 4,66	10,87 (1,73 – 20,01)
	GG	1	16 ± ---	-15,43 (-48,50 – 17,64)
AA	CC	7	35,57 ± 5,44	6,09 (-7,17 – 19,36)
	CG	5	27,6 ± 3,5	-0,29 (-15,49 – 14,90)
	GG	1	48 ± ---	17,38 (-15,16 – 49,92)

Interacción (P= 0,14)

EE, error estándar

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico,

ANEXO 21

Diferencias (95% CI) en el nivel de daño tras la irradiación para la interacción entre XRCC1 (rs25489, Arg280His) y OGG1 (rs1052133, Ser326Cys)

XRCC1 Arg280His rs25489	OGG1 Ser326Cys rs1052133	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a
GG	CC	64	30,81 ± 1,8	0 (Referencia)
	CG	31	35,13 ± 3,45	4,29 (-2,72 – 11,29)
	GG	3	28,33 ± 9,94	-1,48 (-20,76 – 17,80)
GA	CC	9	24 ± 5,37	-5,78 (-17,21 – 5,65)
	CG	4	38,5 ± 7,58	7,31 (-9,06 – 23,67)
	GG	0	---	---
AA	CC	2	19,5 ± 8,5	-12,03 (-34,91 – 10,86)
	CG	0	---	---
	GG	0	---	---

Interacción (P= 0,4)
EE, error estándar
^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico,

ANEXO 22

Diferencias (95% CI) en el nivel de daño tras la irradiación para la interacción entre XRCC2 (rs3218536, Arg188His) y XRCC3 (rs1799796, IVS7-14 A>G)

XRCC3 IVS5-14 rs1799796	XRCC2 Arg188His rs3218536	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a
AA	GG	56	32,23 ± 1,89	0 (Referencia)
	GA	15	30,33 ± 5,14	-1,75 (-11,22 – 7,73)
	AA	1	15 ± ---	-17,50 (-49,77 – 14,77)
AG	GG	33	30,15 ± 3,12	-1,10 (-8,21 – 6,01)
	GA	3	33 ± 11,59	-1,97 (-21,19 – 17,24)
	AA	0	---	---
GG	GG	3	27,67 ± 4,91	-4,68 (-23,71 – 14,36)
	GA	1	57 ± ---	28,83 (-3,93 – 61,58)
	AA	1	46 ± ---	10,86 (-22,14 – 43,86)

Interacción (P= 0,24)

EE, error estándar

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico,

ANEXO 23

Diferencias (95% CI) en el incremento de daño para la interacción entre XRCC1 (rs25487, Arg399Gln) y OGG1 (rs1052133, Ser326Cys)

XRCC1 Arg399 rs25487	OGG1 Ser326Cys rs1052133	n	Media \pm EE	Diferencia (95% CI) ^a
GG	CC	24	23,58 \pm 1,9	0 (Referencia)
	CG	8	22,75 \pm 3,71	-1,60 (-12,69 – 9,50)
	GG	1	17 \pm ---	-5,57 (-33,03 – 21,89)
GA	CC	41	22,66 \pm 2,27	-1,26 (-8,12 – 5,61)
	CG	21	32 \pm 3,53	8,42 (0,47 – 16,36)
	GG	1	0 \pm ---	-25,93 (-54,67 – 2,81)
AA	CC	7	30,14 \pm 5,18	5,86 (-5,67 – 17,38)
	CG	5	20,4 \pm 4,99	-2,68 (-15,88 – 10,52)
	GG	1	20 \pm ---	-2,72 (-31,00 – 25,57)

Interacción (P= 0,1)

EE, error estándar

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico,

ANEXO 24

Diferencias (95% CI) en el incremento de daño para la interacción entre XRCC1 (rs25489, Arg280His) y OGG1 (rs1052133, Ser326Cys)

XRCC1 Arg280His rs25489	OGG1 Ser326Cys rs1052133	n	Media \pm EE	Diferencia (95% CI) ^a
GG	CC	64	24,52 \pm 1,58	0 (Referencia)
	CG	31	27,65 \pm 2,7	3,08 (-2,84 – 9,00)
	GG	3	12,33 \pm 6,23	-11,05 (-27,35 – 5,25)
GA	CC	9	18,33 \pm 5,34	-6,36 (-16,02 – 3,31)
	CG	4	31,75 \pm 6,46	7,36 (-6,47 – 21,20)
	GG	0	---	---
AA	CC	2	18,5 \pm 7,5	-7,39 (-26,74 – 11,96)
	CG	0	---	---
	GG	0	---	---

Interacción (P= 0,23)

EE, error estándar

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico,

ANEXO 25

Diferencias (95% CI) en el incremento de daño para la interacción entre XRCC2 (rs3218536, Arg188His) y XRCC3 (rs1799796, IVS7-14 A>G)

XRCC3 IVS5-14 rs1799796	XRCC2 Arg188His rs3218536	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a
AA	GG	56	24,75 ± 1,66	0 (Referencia)
	GA	15	23,07 ± 3,77	-2,51 (-10,60 – 5,57)
	AA	1	9 ± ---	-16,12 (-43,66 – 11,41)
AG	GG	33	24,73 ± 2,7	0,24 (-5,82 – 6,31)
	GA	3	27,67 ± 10,71	1,18 (-15,22 – 17,58)
	AA	0	---	---
GG	GG	3	23,67 ± 6,33	-1,42 (-17,66 – 14,83)
	GA	1	49 ± ---	25,02 (-2,93 – 52,97)
	AA	1	32 ± ---	4,05 (-24,11 – 32,21)

Interacción (P= 0,31)
EE, error estándar
^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico,

ANEXO 26

Diferencias (95% CI) entre el nivel de daño basal por polimorfismo del gen WDR3 de acuerdo a varios modelos de herencia (CTD)

SNP	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P	
rs3754127	Codominante	C/C	39	8,38 ± 1,25	0 (Referencia)	0,34	
		C/T	55	6,07 ± 0,63	-1,77 (-4,13 - 0,59)		
		T/T	21	6,14 ± 0,97	-0,94 (-4,03 - 2,15)		
	Dominante	C/C	39	8,38 ± 1,25	0 (Referencia)	0,18	
		C/T+T/T	76	6,09 ± 0,53	-1,55 (-3,78 - 0,68)		
	Recesivo	C/C+C/T	94	7,03 ± 0,64	0 (Referencia)	0,92	
		T/T	21	6,14 ± 0,97	0,14 (-2,61 - 2,89)		
	Sobredominante	C/C+T/T	60	7,6 ± 0,89	0 (Referencia)	0,18	
		C/T	55	6,07 ± 0,63	-1,43 (-3,52 - 0,65)		
		Log-aditivo	---	---	---	-0,67 (-2,18 - 0,85)	0,39
	rs3765501	Codominante	G/G	35	8,94 ± 1,36	0 (Referencia)	0,28
			G/A	43	6,42 ± 0,78	-1,84 (-4,47 - 0,78)	
A/A			30	5,7 ± 0,72	-2,12 (-5,04 - 0,80)		
Dominante		G/G	35	8,94 ± 1,36	0 (Referencia)	0,11	
		G/A+A/A	73	6,12 ± 0,54	-1,95 (-4,35 - 0,44)		
Recesivo		G/G+G/A	78	7,55 ± 0,75	0 (Referencia)	0,42	
		A/A	30	5,7 ± 0,72	-1,03 (-3,52 - 1,46)		
Sobredominante		G/G+A/A	65	7,45 ± 0,82	0 (Referencia)	0,46	
		G/A	43	6,42 ± 0,78	-0,84 (-3,08 - 1,40)		
		Log-aditivo	---	---	---	-1,08 (-2,53 - 0,38)	0,15
rs4658973		Codominante	T/T	39	8,38 ± 1,25	0 (Referencia)	0,41
			T/G	53	6,13 ± 0,65	-1,65 (-4,06 - 0,76)	
	G/G		21	6,24 ± 0,95	-1,15 (-4,24 - 1,95)		
	Dominante	T/T	39	8,38 ± 1,25	0 (Referencia)	0,19	
		T/G+G/G	74	6,16 ± 0,53	-1,51 (-3,78 - 0,75)		
	Recesivo	T/T+T/G	92	7,09 ± 0,65	0 (Referencia)	0,91	
		G/G	21	6,24 ± 0,95	-0,16 (-2,91 - 2,59)		
	Sobredominante	T/T+G/G	60	7,63 ± 0,88	0 (Referencia)	0,26	
		T/G	53	6,13 ± 0,65	-1,24 (-3,37 - 0,89)		
		Log-aditivo	---	---	---	-0,72 (-2,24 - 0,79)	0,35

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico

ANEXO 27

Diferencias (95% CI) entre el nivel de daño tras la irradiación por polimorfismo del gen WDR3 de acuerdo a varios modelos de herencia (CTD)

SNP	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P
rs3754127	Codominante	C/C	39	37,46 ± 2,91	0 (Referencia)	0,021
		C/T	55	27,87 ± 1,77	-9,24 (-15,76 - -2,71)	
		T/T	21	29,1 ± 3,55	-7,77 (-16,31 - 0,77)	
	Dominante	C/C	39	37,46 ± 2,91	0 (Referencia)	0,0057
		C/T+T/T	76	28,21 ± 1,6	-8,85 (-15,01 - -2,70)	
	Recesivo	C/C+C/T	94	31,85 ± 1,65	0 (Referencia)	0,59
		T/T	21	29,1 ± 3,55	-2,14 (-9,92 - 5,64)	
	Sobredominante	C/C+T/T	60	34,53 ± 2,3	0 (Referencia)	0,032
		C/T	55	27,87 ± 1,77	-6,47 (-12,30 - -0,64)	
		Log-aditivo	---	---	---	-4,69 (-8,91 - -0,48)
rs3765501	Codominante	G/G	35	38,09 ± 3,17	0 (Referencia)	0,034
		G/A	43	29,14 ± 2,07	-8,77 (-16,03 - -1,51)	
		A/A	30	28,33 ± 2,73	-9,33 (-17,41 - -1,24)	
	Dominante	G/G	35	38,09 ± 3,17	0 (Referencia)	0,0091
		G/A+A/A	73	28,81 ± 1,65	-8,98 (-15,61 - -2,36)	
	Recesivo	G/G+G/A	78	33,15 ± 1,88	0 (Referencia)	0,25
		A/A	30	28,33 ± 2,73	-4,17 (-11,18 - 2,85)	
	Sobredominante	G/G+A/A	65	33,58 ± 2,19	0 (Referencia)	0,18
		G/A	43	29,14 ± 2,07	-4,34 (-10,62 - 1,95)	
		Log-aditivo	---	---	---	-4,75 (-8,81 - -0,70)
rs4658973	Codominante	T/T	39	37,46 ± 2,91	0 (Referencia)	0,025
		T/G	53	27,89 ± 1,82	-9,23 (-15,87 - -2,59)	
		G/G	21	29,71 ± 3,55	-7,30 (-15,84 - 1,23)	
	Dominante	T/T	39	37,46 ± 2,91	0 (Referencia)	0,0074
		T/G+G/G	74	28,41 ± 1,64	-8,70 (-14,94 - -2,46)	
	Recesivo	T/T+T/G	92	31,95 ± 1,68	0 (Referencia)	0,65
		G/G	21	29,71 ± 3,55	-1,78 (-9,55 - 5,99)	
	Sobredominante	T/T+G/G	60	34,75 ± 2,29	0 (Referencia)	0,032
		T/G	53	27,89 ± 1,82	-6,58 (-12,51 - -0,66)	
		Log-aditivo	---	---	---	-4,43 (-8,66 - -0,20)

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico

ANEXO 28

Diferencias (95% CI) entre el incremento de daño por polimorfismo del gen WDR3 de acuerdo a varios modelos de herencia (CTD)

SNP	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P
rs3754127	Codominante	C/C	39	29,08 ± 2,31	0 (Referencia)	0,032
		C/T	55	21,89 ± 1,67	-7,38 (-13,01 - -1,74)	
		T/T	21	22,95 ± 3,1	-6,82 (-14,19 - 0,55)	
	Dominante	C/C	39	29,08 ± 2,31	0 (Referencia)	0,0088
		C/T+T/T	76	22,18 ± 1,47	-7,23 (-12,55 - -1,92)	
	Recesivo	C/C+C/T	94	24,87 ± 1,41	0 (Referencia)	0,5
		T/T	21	22,95 ± 3,1	-2,32 (-9,01 - 4,36)	
	Sobredominante	C/C+T/T	60	26,93 ± 1,88	0 (Referencia)	0,057
		C/T	55	21,89 ± 1,67	-4,95 (-9,98 - 0,09)	
		Log-aditivo	---	---	---	-4,01 (-7,64 - -0,38)
rs3765501	Codominante	G/G	35	29,14 ± 2,54	0 (Referencia)	0,066
		G/A	43	22,77 ± 1,98	-6,86 (-13,16 - -0,57)	
		A/A	30	22,73 ± 2,41	-7,10 (-14,11 - -0,09)	
	Dominante	G/G	35	29,14 ± 2,54	0 (Referencia)	0,02
		G/A+A/A	73	22,75 ± 1,52	-6,95 (-12,70 - -1,21)	
	Recesivo	G/G+G/A	78	25,63 ± 1,61	0 (Referencia)	0,32
		A/A	30	22,73 ± 2,41	-3,05 (-9,11 - 3,00)	
	Sobredominante	G/G+A/A	65	26,18 ± 1,79	0 (Referencia)	0,21
		G/A	43	22,77 ± 1,98	-3,49 (-8,91 - 1,93)	
		Log-aditivo	---	---	---	-3,62 (-7,13 - -0,11)
rs4658973	Codominante	T/T	39	29,08 ± 2,31	0 (Referencia)	0,037
		T/G	53	21,85 ± 1,71	-7,48 (-13,21 - -1,74)	
		G/G	21	23,48 ± 3,14	-6,15 (-13,51 - 1,22)	
	Dominante	T/T	39	29,08 ± 2,31	0 (Referencia)	0,011
		T/G+G/G	74	22,31 ± 1,51	-7,11 (-12,50 - -1,72)	
	Recesivo	T/T+T/G	92	24,91 ± 1,43	0 (Referencia)	0,63
		G/G	21	23,48 ± 3,14	-1,67 (-8,35 - 5,01)	
	Sobredominante	T/T+G/G	60	27,12 ± 1,88	0 (Referencia)	0,047
		T/G	53	21,85 ± 1,71	-5,25 (-10,36 - -0,14)	
		Log-aditivo	---	---	---	-3,69 (-7,33 - -0,04)

^aDiferencia ajustada por edad, género y diagnóstico

ANEXO 29

Diferencias (95% CI) entre el nivel de daño basal por polimorfismo del gen WDR3 de acuerdo a varios modelos de herencia (suptipo papilar)

SNP	Modelo	Genotipo	n	Media (EE)	Diferencia (95% CI) ^a	P	
rs3754127	Codominante	C/C	32	7,66 ± 1,3	0 (Referencia)	0,49	
		C/T	48	6,02 ± 0,7	-1,38 (-3,82 - 1,07)		
		T/T	19	6,47 ± 1,05	-0,19 (-3,33 - 2,96)		
	Dominante	C/C	32	7,66 ± 1,3	0 (Referencia)	0,37	
		C/T+T/T	67	6,15 ± 0,58	-1,05 (-3,36 - 1,25)		
	Recesivo	C/C+C/T	80	6,67 ± 0,67	0 (Referencia)	0,64	
		T/T	19	6,47 ± 1,05	0,66 (-2,12 - 3,43)		
	Sobredominante	C/C+T/T	51	7,22 ± 0,9	0 (Referencia)	0,23	
		C/T	48	6,02 ± 0,7	-1,31 (-3,45 - 0,83)		
		Log-aditivo	---	---	---	-0,27 (-1,81 - 1,28)	0,74
	rs3765501	Codominante	G/G	28	8,25 ± 1,44	0 (Referencia)	0,48
			G/A	38	6,34 ± 0,85	-1,56 (-4,28 - 1,16)	
A/A			27	5,96 ± 0,78	-1,50 (-4,49 - 1,49)		
Dominante		G/G	28	8,25 ± 1,44	0 (Referencia)	0,23	
		G/A+A/A	65	6,18 ± 0,59	-1,54 (-4,01 - 0,94)		
Recesivo		G/G+G/A	66	7,15 ± 0,79	0 (Referencia)	0,65	
		A/A	27	5,96 ± 0,78	-0,59 (-3,12 - 1,95)		
Sobredominante		G/G+A/A	55	7,13 ± 0,83	0 (Referencia)	0,48	
		G/A	38	6,34 ± 0,85	-0,83 (-3,13 - 1,47)		
		Log-aditivo	---	---	---	-0,76 (-2,25 - 0,73)	0,32
rs4658973		Codominante	T/T	32	7,66 ± 1,3	0 (Referencia)	0,58
			T/G	47	6,11 ± 0,71	-1,28 (-3,75 - 1,19)	
	G/G		19	6,58 ± 1,02	-0,42 (-3,57 - 2,72)		
	Dominante	T/T	32	7,66 ± 1,3	0 (Referencia)	0,38	
		T/G+G/G	66	6,24 ± 0,58	-1,04 (-3,36 - 1,28)		
	Recesivo	T/T+T/G	79	6,73 ± 0,67	0 (Referencia)	0,81	
		G/G	19	6,58 ± 1,02	0,35 (-2,42 - 3,11)		
	Sobredominante	T/T+G/G	51	7,25 ± 0,89	0 (Referencia)	0,31	
		T/G	47	6,11 ± 0,71	-1,12 (-3,29 - 1,04)		
		Log-aditivo	---	---	---	-0,35 (-1,89 - 1,20)	0,66

^aDiferencia ajustada por edad, género

ANEXO 30

Diferencias (95% CI) entre el nivel de daño tras la irradiación por polimorfismo del gen WDR3 de acuerdo a varios modelos de herencia (suptipo papilar)

SNP	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P
rs3754127	Codominante	C/C	32	37,84 ± 3,02	0 (Referencia)	0,024
		C/T	48	28,27 ± 1,64	-9,06 (-15,49 - -2,64)	
		T/T	19	30,05 ± 3,79	-6,58 (-14,85 - 1,68)	
	Dominante	C/C	32	37,84 ± 3,02	0 (Referencia)	0,0079
		C/T+T/T	67	28,78 ± 1,58	-8,39 (-14,45 - -2,33)	
	Recesivo	C/C+C/T	80	32,1 ± 1,64	0 (Referencia)	0,79
		T/T	19	30,05 ± 3,79	-1,05 (-8,58 - 6,48)	
	Sobredominante	C/C+T/T	51	34,94 ± 2,4	0 (Referencia)	0,025
		C/T	48	28,27 ± 1,64	-6,63 (-12,33 - -0,93)	
		Log-aditivo	---	---	---	-4,07 (-8,19 - 0,05)
rs3765501	Codominante	G/G	28	38,68 ± 3,36	0 (Referencia)	0,03
		G/A	38	28,63 ± 2	-9,68 (-16,87 - -2,50)	
		A/A	27	29,96 ± 2,75	-7,55 (-15,45 - 0,34)	
	Dominante	G/G	28	38,68 ± 3,36	0 (Referencia)	0,0096
		G/A+A/A	65	29,18 ± 1,63	-8,83 (-15,37 - -2,29)	
	Recesivo	G/G+G/A	66	32,89 ± 1,92	0 (Referencia)	0,6
		A/A	27	29,96 ± 2,75	-1,87 (-8,76 - 5,03)	
	Sobredominante	G/G+A/A	55	34,4 ± 2,24	0 (Referencia)	0,059
		G/A	38	28,63 ± 2	-6,01 (-12,16 - 0,15)	
		Log-aditivo	---	---	---	-3,85 (-7,85 - 0,16)
rs4658973	Codominante	T/T	32	37,84 ± 3,02	0 (Referencia)	0,024
		T/G	47	28,11 ± 1,67	-9,22 (-15,70 - -2,74)	
		G/G	19	30,74 ± 3,78	-6,18 (-14,41 - 2,05)	
	Dominante	T/T	32	37,84 ± 3,02	0 (Referencia)	0,0085
		T/G+G/G	66	28,86 ± 1,6	-8,36 (-14,46 - -2,27)	
	Recesivo	T/T+T/G	79	32,05 ± 1,66	0 (Referencia)	0,87
		G/G	19	30,74 ± 3,78	-0,61 (-8,11 - 6,89)	
	Sobredominante	T/T+G/G	51	35,2 ± 2,39	0 (Referencia)	0,02
		T/G	47	28,11 ± 1,67	-6,91 (-12,65 - -1,17)	
		Log-aditivo	---	---	---	-3,87 (-7,99 - 0,25)

^aDiferencia ajustada por edad, género

ANEXO 31

Diferencias (95% CI) entre el incremento de daño por polimorfismo del gen WDR3 de acuerdo a varios modelos de herencia (suptipo papilar)

SNP	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P
rs3754127	Codominante	C/C	32	30,19 ± 2,31	0 (Referencia)	0,026
		C/T	48	22,29 ± 1,57	-7,64 (-13,17 - -2,11)	
		T/T	19	23,58 ± 3,33	-6,39 (-13,51 - 0,72)	
	Dominante	C/C	32	30,19 ± 2,31	0 (Referencia)	0,0072
		C/T+T/T	67	22,66 ± 1,45	-7,30 (-12,51 - -2,09)	
	Recesivo	C/C+C/T	80	25,45 ± 1,38	0 (Referencia)	0,6
		T/T	19	23,58 ± 3,33	-1,73 (-8,19 - 4,74)	
	Sobredominante	C/C+T/T	51	27,73 ± 1,94	0 (Referencia)	0,038
		C/T	48	22,29 ± 1,57	-5,28 (-10,20 - -0,36)	
		Log-aditivo	---	---	---	-3,80 (-7,33 - -0,26)
rs3765501	Codominante	G/G	28	30,43 ± 2,58	0 (Referencia)	0,04
		G/A	38	22,34 ± 1,91	-8,07 (-14,28 - -1,86)	
		A/A	27	24 ± 2,47	-6,05 (-12,87 - 0,78)	
	Dominante	G/G	28	30,43 ± 2,58	0 (Referencia)	0,014
		G/A+A/A	65	23,03 ± 1,51	-7,26 (-12,92 - -1,61)	
	Recesivo	G/G+G/A	66	25,77 ± 1,62	0 (Referencia)	0,67
		A/A	27	24 ± 2,47	-1,31 (-7,25 - 4,64)	
	Sobredominante	G/G+A/A	55	27,27 ± 1,82	0 (Referencia)	0,062
		G/A	38	22,34 ± 1,91	-5,13 (-10,43 - 0,18)	
		Log-aditivo	---	---	---	-3,08 (-6,54 - 0,38)
rs4658973	Codominante	T/T	32	30,19 ± 2,31	0 (Referencia)	0,024
		T/G	47	22,04 ± 1,58	-7,90 (-13,47 - -2,32)	
		G/G	19	24,16 ± 3,37	-5,75 (-12,83 - 1,34)	
	Dominante	T/T	32	30,19 ± 2,31	0 (Referencia)	0,0076
		T/G+G/G	66	22,65 ± 1,48	-7,29 (-12,53 - -2,05)	
	Recesivo	T/T+T/G	79	25,34 ± 1,39	0 (Referencia)	0,77
		G/G	19	24,16 ± 3,37	-0,98 (-7,44 - 5,47)	
	Sobredominante	T/T+G/G	51	27,94 ± 1,94	0 (Referencia)	0,025
		T/G	47	22,04 ± 1,58	-5,75 (-10,69 - -0,80)	
		Log-aditivo	---	---	---	-3,51 (-7,05 - 0,03)

^aDiferencia ajustada por edad, género

ANEXO 32

Diferencias (95% CI) entre el nivel de daño basal por polimorfismo del gen WDR3 de acuerdo a varios modelos de herencia (suptipo folicular)

SNP	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P
rs3754127	Codominante	C/C	7	11,71 ± 3,61	0 (Referencia)	0,45
		C/T	7	6,43 ± 1,43	-5,66 (-16,16 - 4,85)	
		T/T	2	3 ± 1	-8,19 (-21,90 - 5,51)	
	Dominante	C/C	7	11,71 ± 3,61	0 (Referencia)	0,22
		C/T+T/T	9	5,67 ± 1,21	-6,35 (-15,88 - 3,19)	
	Recesivo	C/C+C/T	14	9,07 ± 2	0 (Referencia)	0,45
		T/T	2	3 ± 1	-4,90 (-17,22 - 7,42)	
	Sobredominante	C/C+T/T	9	9,78 ± 3,04	0 (Referencia)	0,57
		C/T	7	6,43 ± 1,43	-2,85 (-12,40 - 6,69)	
		Log-aditivo	---	---	---	-4,34 (-10,77 - 2,08)
rs3765501	Codominante	G/G	7	11,71 ± 3,61	0 (Referencia)	0,54
		G/A	5	7 ± 1,97	-5,02 (-17,97 - 7,93)	
		A/A	3	3,33 ± 0,67	-8,09 (-22,01 - 5,83)	
	Dominante	G/G	7	11,71 ± 3,61	0 (Referencia)	0,31
		G/A+A/A	8	5,62 ± 1,37	-6,27 (-17,88 - 5,34)	
	Recesivo	G/G+G/A	12	9,75 ± 2,29	0 (Referencia)	0,4
		A/A	3	3,33 ± 0,67	-4,77 (-15,54 - 6,00)	
	Sobredominante	G/G+A/A	10	9,2 ± 2,78	0 (Referencia)	0,94
		G/A	5	7 ± 1,97	-0,40 (-10,75 - 9,95)	
		Log-aditivo	---	---	---	-3,98 (-10,60 - 2,64)
rs4658973	Codominante	T/T	7	11,71 ± 3,61	0 (Referencia)	0,5
		T/G	6	6,33 ± 1,69	-5,83 (-17,88 - 6,23)	
		G/G	2	3 ± 1	-8,28 (-22,85 - 6,30)	
	Dominante	T/T	7	11,71 ± 3,61	0 (Referencia)	0,25
		T/G+G/G	8	5,5 ± 1,36	-6,62 (-17,34 - 4,09)	
	Recesivo	T/T+T/G	13	9,23 ± 2,16	0 (Referencia)	0,46
		G/G	2	3 ± 1	-4,97 (-17,77 - 7,84)	
	Sobredominante	T/T+G/G	9	9,78 ± 3,04	0 (Referencia)	0,64
		T/G	6	6,33 ± 1,69	-2,61 (-13,37 - 8,14)	
		Log-aditivo	---	---	---	-4,31 (-11,21 - 2,59)

^aDiferencia ajustada por edad, género

ANEXO 33

Diferencias (95% CI) entre el nivel de daño tras la irradiación por polimorfismo del gen WDR3 de acuerdo a varios modelos de herencia (suptipo folicular)

SNP	Modelo	Genotipo	n	Media (EE)	Diferencia (95% CI) ^a	P	
rs3754127	Codominante	C/C	7	35,71 ± 9,04	0 (Referencia)	0,22	
		C/T	7	25,14 ± 8,63	-27,74 (-58,54 - 3,05)		
		T/T	2	20 ± 10	-27,88 (-68,04 - 12,29)		
	Dominante	C/C	7	35,71 ± 9,04	0 (Referencia)	0,074	
		C/T+T/T	9	24 ± 6,84	-27,78 (-55,54 - -0,02)		
	Recesivo	C/C+C/T	14	30,43 ± 6,18	0 (Referencia)	0,57	
		T/T	2	20 ± 10	-11,73 (-50,72 - 27,26)		
	Sobredominante	C/C+T/T	9	32,22 ± 7,47	0 (Referencia)	0,23	
		C/T	7	25,14 ± 8,63	-18,21 (-46,73 - 10,31)		
		Log-aditivo	---	---	---	-16,14 (-35,64 - 3,37)	0,13
	rs3765501	Codominante	G/G	7	35,71 ± 9,04	0 (Referencia)	0,2
			G/A	5	33 ± 10,02	-21,63 (-57,96 - 14,70)	
A/A			3	13,67 ± 8,57	-38,92 (-77,97 - 0,13)		
Dominante		G/G	7	35,71 ± 9,04	0 (Referencia)	0,12	
		G/A+A/A	8	25,75 ± 7,5	-28,67 (-62,46 - 5,12)		
Recesivo		G/G+G/A	12	34,58 ± 6,43	0 (Referencia)	0,15	
		A/A	3	13,67 ± 8,57	-24,63 (-55,94 - 6,68)		
Sobredominante		G/G+A/A	10	29,1 ± 7,37	0 (Referencia)	0,97	
		G/A	5	33 ± 10,02	0,62 (-31,51 - 32,74)		
		Log-aditivo	---	---	---	-19,32 (-37,86 - -0,77)	0,066
rs4658973		Codominante	T/T	7	35,71 ± 9,04	0 (Referencia)	0,26
			T/G	6	26,17 ± 10,14	-29,32 (-64,57 - 5,93)	
	G/G		2	20 ± 10	-28,66 (-71,29 - 13,97)		
	Dominante	T/T	7	35,71 ± 9,04	0 (Referencia)	0,094	
		T/G+G/G	8	24,62 ± 7,73	-29,10 (-60,26 - 2,06)		
	Recesivo	T/T+T/G	13	31,31 ± 6,61	0 (Referencia)	0,57	
		G/G	2	20 ± 10	-12,00 (-52,37 - 28,36)		
	Sobredominante	T/T+G/G	9	32,22 ± 7,47	0 (Referencia)	0,29	
		T/G	6	26,17 ± 10,14	-18,18 (-50,33 - 13,96)		
		Log-aditivo	---	---	---	-15,86 (-36,81 - 5,08)	0,17

^aDiferencia ajustada por edad, género

ANEXO 34

Diferencias (95% CI) entre el incremento de daño por polimorfismo del gen WDR3 de acuerdo a varios modelos de herencia (suptipo folicular)

SNP	Modelo	Genotipo	n	Media ± EE	Diferencia (95% CI) ^a	P
rs3754127	Codominante	C/C	7	24 ± 7,6	0 (Referencia)	0,28
		C/T	7	19,14 ± 8,05	-21,87 (-48,25 - 4,51)	
		T/T	2	17 ± 9	-19,91 (-54,32 - 14,50)	
	Dominante	C/C	7	24 ± 7,6	0 (Referencia)	0,1
		C/T+T/T	9	18,67 ± 6,34	-21,34 (-45,13 - 2,45)	
	Recesivo	C/C+C/T	14	21,57 ± 5,36	0 (Referencia)	0,68
		T/T	2	17 ± 9	-7,18 (-40,01 - 25,65)	
	Sobredominante	C/C+T/T	9	22,44 ± 6,08	0 (Referencia)	0,24
		C/T	7	19,14 ± 8,05	-15,06 (-38,95 - 8,83)	
		Log-aditivo	---	---	---	-11,85 (-28,57 - 4,86)
rs3765501	Codominante	G/G	7	24 ± 7,6	0 (Referencia)	0,27
		G/A	5	26 ± 9,73	-16,94 (-48,43 - 14,55)	
		A/A	3	11,33 ± 7,69	-30,01 (-63,85 - 3,84)	
	Dominante	G/G	7	24 ± 7,6	0 (Referencia)	0,16
		G/A+A/A	8	20,5 ± 6,88	-22,26 (-51,21 - 6,70)	
	Recesivo	G/G+G/A	12	24,83 ± 5,73	0 (Referencia)	0,2
		A/A	3	11,33 ± 7,69	-18,82 (-45,66 - 8,02)	
	Sobredominante	G/G+A/A	10	20,2 ± 5,88	0 (Referencia)	0,99
		G/A	5	26 ± 9,73	0,22 (-26,81 - 27,24)	
		Log-aditivo	---	---	---	-14,88 (-30,95 - 1,20)
rs4658973	Codominante	T/T	7	24 ± 7,6	0 (Referencia)	0,33
		T/G	6	20,33 ± 9,43	-23,18 (-53,39 - 7,02)	
		G/G	2	17 ± 9	-20,56 (-57,08 - 15,96)	
	Dominante	T/T	7	24 ± 7,6	0 (Referencia)	0,13
		T/G+G/G	8	19,5 ± 7,13	-22,33 (-49,05 - 4,39)	
	Recesivo	T/T+T/G	13	22,31 ± 5,74	0 (Referencia)	0,68
		G/G	2	17 ± 9	-7,39 (-41,43 - 26,65)	
	Sobredominante	T/T+G/G	9	22,44 ± 6,08	0 (Referencia)	0,29
		T/G	6	20,33 ± 9,43	-15,20 (-42,12 - 11,73)	
		Log-aditivo	---	---	---	-11,60 (-29,55 - 6,35)

^aDiferencia ajustada por edad, género