

TRABAJO FIN DE MÁSTER



**MUTACIONES EN EL FACTOR DE
INICIACIÓN DE LA
TRADUCCIÓN PROTEICA EN
EUCARIOTAS EIF1AX EN
CARCINOMAS AGRESIVOS DE
TIROIDES**

Sara Gil Bernabé

Dirigido por Dra. Ginesa García-Rostán



Universidad de Valladolid



SEPTIEMBRE DE 2018

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. PATOBIOLOGÍA DEL CÁNCER.....	1
1.1 DINÁMICA MOLECULAR DEL CÁNCER.....	1
2. CARCINOMAS DE TIROIDES.....	1
2.1 TIPOS DE CARCINOMAS DE TIROIDES.....	2
2.2 CARCINOMAS ANAPLÁSICOS DE TIROIDES.....	2
3. MECANISMOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	3
3.1 LA TRADUCCIÓN Y EL PAPEL MOLECULAR DE EIF1AX.....	3
3.2 EIF1AX Y EL CÁNCER.....	4
II. OBJETIVOS	5
III. MATERIAL Y MÉTODOS	6
1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	6
2. METODOLOGÍA.....	6
2.1 EXTRACCIÓN ADN GENÓMICO.....	6
2.2 CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ADN GENÓMICO.....	7
2.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	8
2.4 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR.....	9
2.5 PURIFICACIÓN DEL ADN.....	10
2.6 SSCP (SINGLE STRAND CONFORMATION POLIMORPHISM).....	11
2.7 SECUENCIACIÓN DIRECTA POR SANGER.....	12
2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	13
IV. RESULTADOS	14
1. PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES EN EL EXÓN 1,2 Y 6 DE EIF1AX.....	14
1.1 PROMOTOR Y EXÓN 1 DE EIF1AX.....	15
1.2 EXÓN 2 DE EIF1AX.....	15
1.3 EXÓN 6 DE EIF1AX.....	16
2. CLONALIDAD /SUBCLONALIDAD DE LAS MUTACIONES EN EIF1AX.....	17
3. COEXISTENCIA DE MUTACIONES EN EIF1AX CON OTROS EVENTOS ONCOGÉNICOS EN ATCS.....	18
3.1 MUTACIONES EN GENES DE LA FAMILIA DE RAS.....	18
3.2 MUTACIONES EN BRAF.....	18
3.3. MUTACIONES EN EL PROMOTOR DEL GEN TERT.....	18
3.4 COEXISTENCIA DE MUTACIONES EN DIFERENTES GENES HETEROGENEIDAD MOLECULAR INTRATUMORAL.....	19

V.DISCUSION.....	21
1. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES EN EIF1AX EN ATCS.....	21
2.NATURALEZA CLONAL O SUBCLONAL DE LAS MUTACIONES DE EIF1AX.....	21
3.ASOCIACION DE EIF1AX CON DESDIFERENCIACION, PROGRESION TUMORAL.....	21
4.COEXISTENCIA DE LAS MUTACIONES DE EIF1AX CON OTROS EVENTOS ONCOGÉNICOS DESCRITOS EN ATCS.....	21
5.PERSPECTIVAS FUTURAS DE EIF1AX.....	22
VI.CONCLUSIONES.....	23
VII.BIBLIOGRAFIA.....	24
ANEXO I. ABREVIATURAS	

I. INTRODUCCIÓN

1. PATOBIOLOGÍA DEL CÁNCER

En la actualidad, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte en el mundo. Es una enfermedad en la que se altera el comportamiento normal de las células de nuestro organismo. Se produce una proliferación incontrolada de las mismas que comienzan a crecer de forma desordenada y adquieren propiedades invasivas.

La carcinogénesis es además un proceso microevolutivo, prolongado en el tiempo y extraordinariamente dinámico en el que se generan alteraciones cambiantes en el genoma de las células que se ven sometidas a presiones de selección inmunitaria y no inmunitaria. Alteraciones genéticas que dan lugar a la aparición de una miríada de subclones celulares con diferentes capacidades para crecer, proliferar, invadir, metastatizar y responder o resistir a los tratamientos. Con la progresión tumoral, la malignización (adquisición de propiedades invasivas y metastásicas) y la desdiferenciación tumoral aumenta la heterogeneidad intratumoral y también aquellas variantes celulares más agresivas, con mayor capacidad para evadir las defensas naturales de nuestro organismo y resistir a las terapias convencionales. Se puede decir que el cáncer es la expresión fenotípica de un sinfín de alteraciones genéticas¹.

1.1 DINÁMICA MOLECULAR DEL CÁNCER

Debido a las mutaciones producidas, las células tumorales pierden su capacidad para regular el ciclo celular, viéndose alterada la maquinaria celular implicada en su regulación lo que lleva a la proliferación celular descontrolada, debido a la pérdida de la apoptosis y la incapacidad de generar una respuesta inmune.

Existen dos mecanismos moleculares alterados principalmente que dan lugar a esta enfermedad: los oncogenes, cuyas mutaciones promueven la proliferación celular, y los genes supresores de tumores, que producen el efecto contrario. Para que se produzca el cáncer debe haber al menos dos mutaciones en estos genes.

La generación de estas mutaciones sigue siendo hoy uno de los grandes retos en la investigación del cáncer. Una de las teorías defiende que los genes pueden ser modificados debido a radiación ultravioleta, la epigenética, sustancias carcinógenas o enfermedades víricas, recogiendo todas estas causas en lo que se denominan eventos oncogénicos. Las mutaciones generadas pueden ser de diferentes tipos: sustituciones nucleotídicas puntuales de tipo missense, deleciones, inserciones y truncantes. Todas ellas pueden ser patogénicas para la célula y desencadenar la transformación neoplásica y progresión tumoral. En condiciones normales las células tienen sistemas de reparación del ADN capaces de provocar la muerte de aquellas células alteradas, sin embargo, las células tumorales en muchos casos son capaces de evadir dichos sistemas².

2. CARCINOMAS DE TIROIDES

El cáncer de tiroides es el cáncer endocrino más frecuente y en los últimos años el número de casos ha aumentado. El tiroides es el órgano endocrino humano más grande, situado en el cuello y con forma de mariposa. Presenta dos lóbulos rodeados con tejido conectivo que está conectado con el sistema sanguíneo por donde libera las hormonas que produce y, de esta forma, regula el metabolismo. El tiroides está formado por dos tipos de células parénquimales. Las células foliculares que producen las hormonas tiroideas (T3 y T4) y captan yodo y las células C o parafoliculares que producen la calcitonina.

El riesgo de padecer cáncer de tiroides es mayor en las mujeres y en pacientes de entre 20 a 50 años, también pueden ser importantes la exposición a radiaciones, una baja ingesta de yodo, problemas de tiroides y de hormonas y la predisposición familiar³.

2.1 TIPOS DE CARCINOMAS DE TIROIDES

Los carcinomas de tiroides se pueden clasificar en función de sus características histológicas y citológicas distinguiéndose así dos grandes tipos en función de las células de las que deriven los tumores:

- ✿ Carcinomas foliculares, derivados del epitelio folicular, son el 95% de los carcinomas de tiroides y se pueden diferenciar en varios tipos según su histología y diferenciación celular:
 - ✓ Carcinomas tiroideos bien diferenciados, son tumores poco agresivos con una supervivencia a los 5 años mayor del 90%:
 - Carcinomas tiroideos papilares (PTCs): Son los más frecuentes (85-90%) y tienen una probabilidad alta de generar metástasis linfáticas además de metástasis a distancia muy poco frecuentes
 - Carcinomas tiroideos foliculares (FTCs): Pertenecen a este grupo menos del 10% de los carcinomas de tiroides. Pueden generar metástasis a distancia con mayor probabilidad que los carcinomas papilares debido a su elevada invasividad sanguínea.
 - ✓ Carcinomas tiroideos pobremente diferenciados (PDCs): Son aproximadamente el 7% de los carcinomas de tiroides. Tienen una agresividad más elevada que los carcinomas bien diferenciados. Su probabilidad de generar metástasis linfáticas y a distancia es de hasta el 80%. La supervivencia a los 5 años es del 50%.
 - ✓ Carcinomas tiroideos anaplásicos (ATCs): Representan el 2% de los carcinomas de tiroides. Son los más indiferenciados y agresivos teniendo una supervivencia a los 5 años de hasta el 17%. Son característicos en personas de avanzada edad. Son muy invasivos y metastásicos.

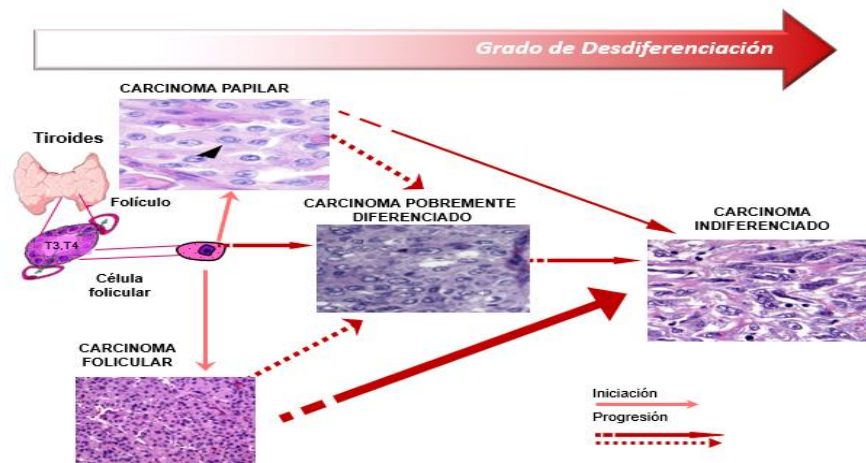


Figura 1: Esquema de la clasificación y progresión de los carcinomas de tiroides del epitelio folicular.

- ✿ Carcinomas medulares, derivados de las células C, el número de casos es mucho menor (3%). Su agresividad es menor que en el caso de los anaplásicos y pobremente diferenciados pero mayor que en los papilares. Pueden generar metástasis linfáticas y en menor medida a distancia ⁴

2.2 CARCINOMA ANAPLÁSICO DE TIROIDES (ATCs)

Los ATCs son un tipo de neoplasia endocrina cuyas opciones terapéuticas tienen una efectividad limitada, en contraste con las neoplasias malignas más comunes del epitelio folicular tiroideo que tienen una tasa de supervivencia mucho mayor. El pronóstico de los pacientes con ATC es prácticamente letal teniendo una supervivencia media de 3 a 5 meses. Los ATCs son altamente proliferativos, invaden fácilmente la tráquea y son capaces de metastatizar a órganos distantes. Normalmente estos tumores son resistentes al yodo radiactivo y a la quimioterapia que junto con la

intervención quirúrgica son los principales tratamientos de los carcinomas tiroideos⁵. Aproximadamente el 20-25% de los pacientes que tienen ATCs tienen antecedentes de un carcinoma tiroideo bien diferenciado anterior y un 20-30% adicional tiene este tipo de carcinomas de forma coexistente. Los ATCs pueden aparecer *de novo* o ser el resultado de una progresión de los carcinomas bien diferenciados.

El análisis genético de los ATCs ha revelado frecuentes mutaciones somáticas en *BRAF* y *RAS* que también están mutados en los carcinomas bien diferenciados, lo que podría indicar una vía tumorigénica inicial común⁶. Otros genes característicos de los ATCs no están presentes en las etapas iniciales de la carcinogénesis folicular tiroidea y se asocian con desdiferenciación y agresividad. También es frecuente encontrar en estos tumores ganancias en el número de copias e inestabilidad genómica estructural.

El bajo número de pacientes diagnosticados de ATC y el hecho de que el tamaño de las biopsias es muchas veces pequeño hace que sea difícil identificar biomarcadores asociados a dicho histotipo. Muchos de los mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo de los ATCs y que gobiernan su comportamiento, curso clínico siguen siendo hoy día desconocidos⁷.

En la actualidad se están llevando a cabo diferentes ensayos clínicos en ATCs con fármacos dirigidos, pero los resultados no supuestos una gran mejora.

3. MECANISMOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Se conoce como expresión génica al conjunto de procesos por los cuales los seres vivos son capaces de codificar la información existente en sus ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para la realización de las diferentes funciones del organismo. En el mecanismo de este proceso están incluidos pasos tan importantes como la transcripción o la traducción del ADN⁸.

3.1 LA TRADUCCIÓN Y EL PAPEL MOLECULAR DE *EIF1AX*

Una vez generada la hebra de ARNm monocatenaria se inicia la biosíntesis de proteínas en un proceso denominado traducción que tiene lugar en el citoplasma y el retículo endoplásmico rugoso, donde se encuentran los ribosomas, encargados de la lectura del ARNm y capaces de sintetizar un polipéptido. La información en el ARNm se encuentra codificada en nucleótidos; cada tres nucleótidos conforman un triplete o codón que codifica para un aminoácido. El inicio de la traducción es un proceso complejo en el que las subunidades ribosómicas 40S y 60S se ensamblan junto con la enzima aminoacil-ARNt-sintetasa y el ARN transferente (ARNt), mediante factores de iniciación eucarióticos (eIF) en un ribosoma 80S activo en el codón de inicio del ARNm. El gen *EIF1AX* codifica en una proteína (eiF1A) perteneciente al complejo de iniciación de la traducción del factor 1A en eucariotas y está ligado al cromosoma X.

eiF1A, también llamado eiF-4C, codifica una proteína que media la transferencia la metionina con la ARNt de la subunidad ribosómica 40S para formar el complejo de preiniciación (PIC) o complejo 43S (subunidad 40S, eIF2/GTP/ARNt metilado y eIF3) de la traducción de las proteínas⁹.

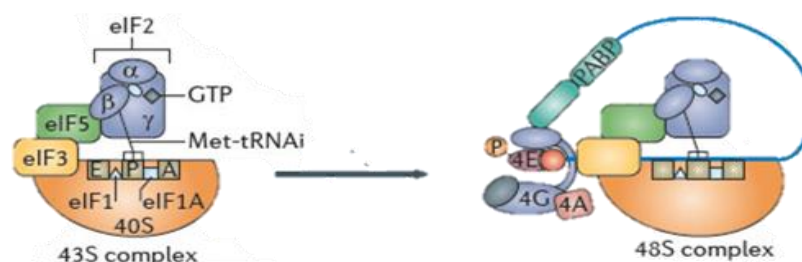


Figura 2: Proceso de iniciación de la traducción en eucariotas en el que interviene EIF1A. Adaptado de *Nature Microbiology*¹⁰

En la iniciación el primer paso implica la unión de GTP y el ARNt con la metionina al factor de iniciación 2 (eIF2) y forman un complejo que se transfiere al a subunidad ribosómica 40S, esta reacción está estimulada por eIF1A que forma el PIC. Existe cierto debate en cuanto a esta función ya que existen autores que defienden que este papel es llevado a cabo por eIF3¹¹. En la actualidad se la hipótesis más aceptada es que son los factores eIF1A y eIF3 los que estimulan la formación del PIC¹². eIF1A es necesario para la transferencia del ARNt iniciador metilado (Met-tRNAi) junto con eIF2 y el GTP a la subunidad 40S, mientras que la función de eIF3 es junto con eIF1A estabilizar el PIC¹³.

Este complejo se une al extremo 5' del ARNm con la caperuza (nucleótido de guanina unido al ARNm que interviene en varios procesos de expresión génica, evitando la degradación y promoviendo el *splicing* y la traducción) gracias a otros eIFs y comienza a leer el ARNm hasta que llega al codón AUG formándose así el complejo de iniciación. A continuación, el complejo eIF5 interactúa con el complejo de iniciación 48S provocando la hidrólisis de GTP unido a la subunidad 40S para formar el complejo funcional 80S. El ribosoma está en conformación activa y puede leer la información codificada en el ARNm¹⁴.

3.3 EIF1AX Y EL CÁNCER

EIF1AX está formado por una cola N- terminal (NTT), un dominio de unión al ARN, el dominio helicoidal y por último la cola C- terminal (CTT). Las colas terminales regulan las conformaciones abierta y cerrada de la subunidad 40S y aseguran la selección efectiva del codón de inicio.

Las principales mutaciones en el gen *EIF1AX* se han encontrado en los exones 1,2 y en el intrón 5 aguas arriba del sitio de corte y empalme del exón 6¹⁵⁻¹⁸.

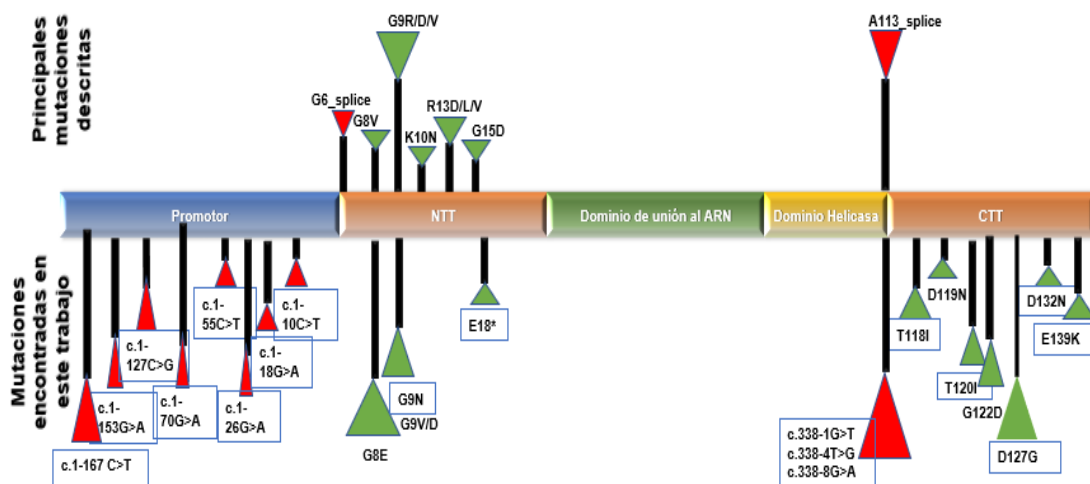


Figura 3: Gen *EIF1AX* con las mutaciones descritas más frecuentes en la parte de arriba. En la parte de abajo del gen las mutaciones encontradas en este trabajo de fin de Máster. Las que están encuadradas en azul es porque no estaban descritas con anterioridad. Las representadas con color verde son cambios en zonas de exones y en rojo cambios en zonas que no se transcriben

Las mutaciones localizadas en *EIF1AX* hacen que la capacidad de localización del codón AUG sea mucho menor si se encuentran en el extremo N-terminal. Es frecuente que se produzca un “*leaky scanning*”, es decir, el ribosoma no lee desde el primer codón de iniciación, se une a un AUG posterior, haciendo que el marco de lectura pueda cambiar, de forma que las proteínas sintetizadas también lo hagan, teniendo consecuencias patológicas en la célula¹⁹.

El segmento CTT contiene repeticiones de 10 aminoácidos, denominadas repeticiones SE, que promueven la conformación abierta del PIC que facilita que se continúe la lectura del ARNm cuando el complejo se ha unido a un codón que no sea AUG. La mutación A113_splice afecta al *splicing* de las transcripciones de genes en el límite del dominio helicoidal. Provocando errores en la síntesis del segmento CTT y, por lo tanto, produciendo que este no realice bien su función²⁰.

II. OBJETIVOS

Recientemente varios grupos han reportado la existencia de mutaciones en ***EIF1AX*** en cáncer de tiroides ^{7,16,17,21}. No obstante, los estudios publicados son escasos y los datos que aportan resultan cuando menos controvertidos. En unas series las mutaciones de *EIF1AX* se asocian con los histotipos de cáncer de tiroides más agresivos (carcinomas pobremente diferenciados y carcinomas anaplásicos)^{16,17} y en otras se describen en lesiones benignas como hiperplasias tiroideas o adenomas²². La prevalencia de mutaciones también varía mucho de unas series a otras. Tampoco está claro si *EIF1AX* juega realmente un papel en progresión, dediferenciación tumoral pues solo hay un estudio de hace un mes en el que se analizan en 16 Carcinomas Pobremente Diferenciados (PDCs) y Anaplásicos (ATCs) áreas concurrentes mejor diferenciadas presentes dentro del tumor primario diagnosticado como carcinoma pobremente diferenciado o carcinoma anaplásico²¹. De igual forma, mientras que en algunos estudios se encuentra una asociación significativa entre las mutaciones de *EIF1AX* y las mutaciones en *RAS* en otros no se observa dicha asociación.

En un intento de clarificar la controversia existente en relación con las mutaciones de *EIF1AX* en cáncer de tiroides, en mi TFM he empezado a caracterizar una de las series más grandes de carcinomas agresivos de tiroides que existen (PDCs y ATCs). Únicamente voy a presentar los resultados en ATCs pues el estudio está prácticamente acabado y en los PDCs está en curso

LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL TRABAJO DE FIN DE MASTER SON:

- 1) Analizar la prevalencia de mutaciones en los exones 1, 2 y 6 del gen *EIF1AX* en una cohorte de 64 muestras de carcinomas anaplásicos correspondientes a 35 pacientes diagnosticados de ATC.**
- 2) Determinar la naturaleza clonal o subclonal de las mutaciones encontradas en *EIF1AX* y la existencia o no de heterogeneidad intra-tumoral.**
- 3) Analizar el papel que juega *EIF1AX* en la progresión, des-diferenciación de los carcinomas de tiroides.**
- 4) Evaluar si las mutaciones en *EIF1AX* coexisten con otros eventos oncogénicos frecuentes en los ATCs (mutaciones en *RAS*, *BRAF* y región promotora de *TERT*...).**

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

En el estudio se ha analizado una cohorte de 65 muestras, embebidas en parafina y fijadas con formaldehído, obtenidas de 35 pacientes diagnosticados de carcinoma de tiroides anaplásico.

Las muestras tisulares seleccionadas para el estudio en los 35 casos genotipados, se obtuvieron después de un examen microscópico exhaustivo, por parte de la tutora del proyecto (Médico especialista en Anatomía Patológica), de todos los bloques de parafina existentes de cada caso, en los archivos de los Departamentos de Anatomía Patológica de diferentes Hospitales.

El estadiaje tumoral pre-quirúrgico y post-quirúrgico de todos los pacientes investigados se realizó de acuerdo con los criterios establecidos por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC). Los pacientes fueron tratados siguiendo protocolos médico-quirúrgicos estandarizados. Después de una revisión de la Historia Clínica y del examen microscópico exhaustivo de todas las muestras tisulares existentes en cada uno de los casos genotipados, disponemos de información clínico-patológica y de seguimiento de relevancia pronóstica en el manejo clínico de los pacientes con ATCs (sexo, edad al diagnóstico, tamaño del tumor, subtipo histológico, presencia de extensión extratiroidea, invasión vascular, metástasis en ganglios linfáticos y/ o a distancia al diagnóstico y/o durante el seguimiento, desarrollo de recurrencias, estadio tumoral al diagnóstico y estatus del paciente en el momento de revisión de la historia clínica), información que vamos a correlacionar, una vez completemos el estudio de *EIF1AX* en los PDCs, con los resultados del estudio genómico en los exones 1, 2 y 6 de *EIF1AX*, *BRAF*, *N-*, *K-*, *H-RAS* y promotor de *TERT*

2. METODOLOGÍA

Para determinar la prevalencia de mutaciones en los exones 1, 2 y 6 de *EIF1AX*, su carácter clonal o subclonal y su papel en progresión, desdiferenciación en pacientes con carcinomas anaplásicos he analizado las muestras anteriormente expuestas mediante PCR y secuenciación directa tipo Sanger. También he realizado el análisis de mutaciones puntuales en *BRAF* en el exón 15 y *N-RAS* exones 1 y 2, *K-* y *H-RAS* exón 1, mediante PCR–“Single Strand Conformational Polymorphism” (SSCP) y secuenciación de los cambios de movilidad en 35 casos.

2.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Las 65 muestras tumorales fueron teñidas en hematoxilina-eosina y divididas en secciones al microscopio para determinar el porcentaje de células tumorales y las características del tejido y su desdiferenciación. Este trabajo lo realizó la Dra. García-Rostán, anatomopatóloga. En aquellos casos en los que había tiroides tumoral u otros contaminantes (tejido linfoide, fibrosis, etc.), que podían introducir un sesgo en los resultados, se rehicieron los bloques para separar componentes e incrementar el número de células tumorales en el área a genotipar. El porcentaje de células tumorales presente en las áreas analizadas ha sido en todos los casos del 85-90%. En función de las características de las muestras se cortaron con un microtomo HM355S (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) las micras necesarias (30-150µm) para extraer el ADN suficiente.

El tejido se recogió en tubos de 2 mL, cierre seguro y baja retención de ADN (Sarstedt, Hildesheim, Germany). Para desparafinar el tejido se realizó un protocolo que consiste en:

1. Un lavado con xileno (Química Clínica Aplicada S.A., España) a 65°C
2. Después se echa una solución de etanol 80%-xileno 20%
3. Por último, etanol 100% (Ethanol Absolute Molecular Biology Grade, MerckMillipore, Germany).
4. Se deja secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 90 minutos para que se evapore el alcohol.

A continuación, las muestras fueron procesadas con el kit comercial “GeneJET FFPE DNA Purification kit” (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se realiza una incubación con el buffer de digestión y proteinasa K, y se deja en agitación a 10 rpm y 65°C, durante el tiempo necesario para que se digiera el tejido.
2. Se introducen las muestras en un bloque térmico a 90°C durante 40 minutos para evitar los posibles entrecruzamientos del ADN por el formaldehído utilizado en la fijación por los Servicios de Anatomía Patológica de los Hospitales para diagnóstico del paciente.
3. Echamos 10 µL de RNasa para digerir el ARN presente en la muestra.
4. Se transfiere la muestra ya digerida, junto con el buffer de unión a la columna comercial. Esta solución permite la unión del ADN a la membrana de la columna.
5. Lavado de la membrana con dos soluciones (buffers de lavado 1 y 2), que contienen principalmente etanol. Ese paso permite eliminar restos que pudieran contaminar el ADN de la muestra.
6. Un último lavado con el buffer de elución que permite extraer el ADN atrapado en la membrana. Este buffer es principalmente agua.

2.2 CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ADN GENÓMICO

Para poder amplificar las muestras es necesario saber la cantidad y calidad del ADN que hemos obtenido para poder posteriormente realizar diluciones. Si utilizamos el ADN sin conocer su concentración o de mala calidad puede producir problemas en la posterior PCR. El ADN extraído fue evaluado mediante dos métodos diferentes y posteriormente congelado a -26°C hasta su uso

2.2.1 ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

La espectrometría nos permite analizar absorbancia de las muestras basándose en la Ley de Lambert-Beer. Para conocer la concentración de los ADNs y su absorbancia de luz ultravioleta A260/280 y A260/230, indicativos de la pureza del ADN, se utilizó un espectrofotómetro (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Cada ratio representa una información diferente sobre la muestra: el ratio A260/280 mide el grado de contaminación de proteínas y ARN y el ratio A260/230 indica la cantidad de sales.

2.2.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%

La otra técnica utilizada fueron electroforesis en geles de agarosa al 1% (Seakem LE Agarose, Lonza, Portsmouth, NH, USA), con TBE 1X (dilución 1:10 de solución tampón 10X filtrada, estéril, libre de DNAsas, RNAsas y proteasas, compuesta por 1M Tris, 0.9M Acido Borico y 0.01 M EDTA - Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y teñidos con bromuro de etidio al 5% (Ethidium Bromide Solution 10 mg/mL, Invitrogen - Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Se cargaron 3 µL de cada muestra junto con 2 µL de un colorante comercial (6X Orange DNA Loading Dye, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Compuesto por dos colorantes (Orange G señala a las 40-50 bp y Xylene Cyanol a las 3.030 bp en TBE), que nos permite observar la migración de las muestras.

Esta técnica nos permite medir principalmente el grado de degradación del ADN de las muestras. Para definir el tamaño de los fragmentos se procedió a cargar también un marcador molecular de 100 bp-1Kb (100 bp DNA ladder, exACTGene Fisher BioReagents, Wilmington, DE, USA).

Se dejan correr las muestras en electroforesis (Owl™ A5 Large Gel System with Built-In Recirculation, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) con TBE 1X a 80V (Fuente de alimentación Owl™ EC-300XL, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) durante 3 horas. Después se visualizan los geles en el Gel Doc™ XR (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), gracias a la luz UV. El bromuro de etidio es un agente intercalante, se introduce entre las bases nitrogenadas del ADN y emite fluorescencia con la luz UV.

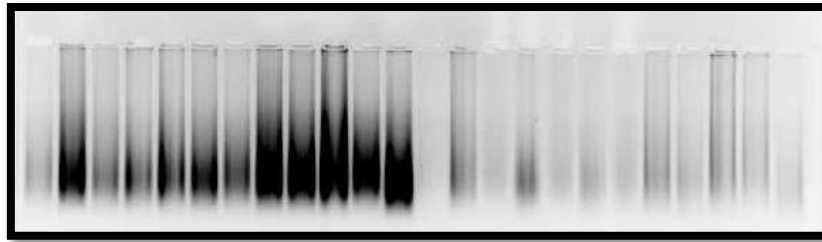


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN extraído de ATCs.

2.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la síntesis de ácidos nucleicos *in vitro*, esta técnica nos permite aumentar exponencialmente la cantidad de ADN de un segmento en concreto. Por cada ciclo de amplificación se consigue el doble de cantidad de ADN que se ha sintetizado en el ciclo previo, de manera que el resultado final es una acumulación exponencial del fragmento (se obtienen 2^n moléculas, siendo n el número de ciclos de amplificación)²³. La técnica requiere cebadores que flanquean al fragmento de ADN que se quiere amplificar, y repetidos ciclos llevados a cabo por un termociclador (Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) con un programa específico dependiendo del gen y del exón, que consta de las siguientes etapas:

1. Una fase inicial de desnaturalización (95°C durante 10 minutos): a alta temperatura la doble cadena de ADN se separa y da lugar a dos cadenas simples.
2. Una serie de entre 35 a 45 ciclos (en función de la cantidad de ADN que necesitamos y de la calidad del ADN de partida): consisten en una primera fase de finalización de la desnaturalización de las moléculas de ADN molde (95°C durante 1 minuto), una segunda en la que se produce el anillamiento de los cebadores forward (en sentido 5'-3') y reverse (en sentido 3'-5') a las secuencias complementarias (la temperatura de este paso varía en función de los *primers* que utilicemos como se explica en el punto 2.3.1 y dura 1 minuto), y por último, una fase de extensión gracias a la ADN polimerasa (72°C durante 1 minuto).

La eficiencia de la amplificación de ADN de muestras mantenidas en parafina es menor que la de ADN obtenido de otro tipo como congelación y por ello se incrementa el número de ciclos con respecto al del protocolo tradicional.

3. Elongación del ADN (72°C durante 10 minutos): en esta fase las cadenas sintetizadas terminan la replicación.

La reacción de PCR tiene lugar en tubos de PCR de 0.2 mL (Tubos de pared delgada, estériles, libres de RNasas, DNasas, DNA y pirógenos, Molecular BioProducts, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), en ellos se realiza una mezcla de los siguientes reactivos, en un volumen final de 30 μ L:

- Buffer de reacción 10X libre de MgCl₂ [75 mM Tris HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 20mM (NH₄)₂SO₄] (Biotools, B & M Labs, España) diluido a 1X. Regula el pH de la reacción, afectando a la actividad y fidelidad de la enzima.
- Cloruro de magnesio 50 mM (Biotools, B & M Labs, España). Potencia el funcionamiento de la enzima Taq ADN polimerasa. Su carencia puede inactivar la enzima y su exceso disminuye la efectividad de esta, pudiendo incrementar las uniones inespecíficas.
- Cebadores forward y reverse (Sigma Aldrich Biotechnology, Gillingham, UK). Consisten en oligonucleótidos con un tamaño entre 18 y 30 pb, los cuales se unen al ADN molde. Su concentración es de 0.25-0.5 μ M.
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs, 100mM, Fermentas, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Son los nucleótidos que va a ir incorporando la ADN polimerasa a las cadenas de ácido nucleico, por lo que los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) deben estar equilibrados. La concentración óptima de dNTPs es de 0,2 mM.

- ADN Taq polimerasa 1U/μL (Biotools, B & M Labs, España). Enzima que cataliza la síntesis del ADN. Su concentración es de 40mU/μL.
- Diluciones de cada ADN madre, con una concentración de ácido nucleico de entre 20-50 ng/μL.
- Agua libre de nucleasas (Ambion™ Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)- Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), hasta completar el volumen final de reacción.

En cada PCR introducimos dos controles negativos, con todos los reactivos que se utilizan en la reacción menos el ADN. El primer control se cierra justo después de repartir la mix con todos los reactivos de la reacción y antes de echar el ADN en los tubos; nos permite saber que nuestros reactivos no están contaminados. El segundo control negativo se cierra justo después de haber cerrado todos los tubos al haber echado ya el ADN, si hubiera contaminación en este control podría ser por dos razones: la primera si también está contaminado el primer control es debido a una contaminación en los reactivos y la segunda si solamente está contaminado este control puede ser por una contaminación cruzada al cerrar los tubos y podríamos haber contaminado también otras muestras de ADN. Después se introducen los tubos en el termociclador.

En este trabajo se ha amplificado mediante PCR los exones 1, 2 y 6 de *EIF1AX* de 310, 167 y 268 pares de bases, respectivamente, que incluyen las zonas calientes de mutaciones. Los *primers* utilizados para cada exón fueron diseñados por la Directora del Proyecto.

Mediante electroforesis en geles de agarosa (Seakem LE Agarose, Lonza, Portsmouth, NH, USA) preparados al 3% con tampón TBE 1X y teñidos con bromuro de etidio comprobamos el grado de eficiencia de la amplificación de la PCR. Cargamos 3μL de la muestra junto con 1 μL de Loding Dye y se dejaron correr durante 30 minutos en electroforesis (Owl™ A5 Large Gel System with Built-In Recirculation, Thermo Fisher Scientific) con TBE 1X a 125V (Fuente de alimentación Owl™ EC-300XL, Thermo Scientific). Después se visualizó el gel de agarosa en el Gel Doc™ XR (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Para comprobar que el tamaño de los segmentos de ADN amplificados se correspondía con el deseado, utilizamos un marcador de tamaño de peso molecular (O'GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, Ready-to-use, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

La electroforesis nos permitía saber si nuestra PCR estaba contaminada ya que cargamos 10 μL de los dos controles y observábamos si había ADN pudiendo significar que los reactivos estaban contaminados o bien que al cerrar los tubos podía haber contaminación cruzada entre las muestras.

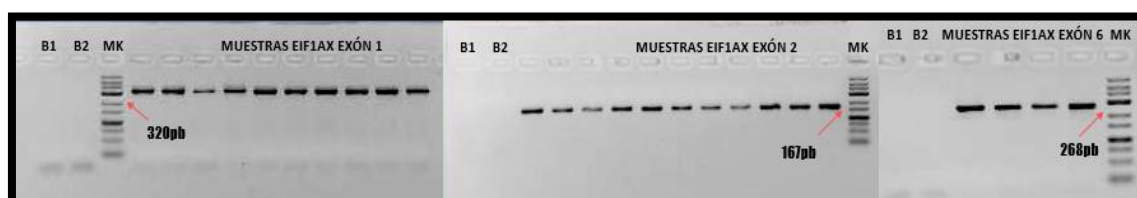


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al 3% para comprobar la eficiencia de amplificación del exón 1 (320 pb), exón 2 (167 pb) y exón 6 (268 pb) de *EIF1AX* en un grupo de muestras. MK: marcador de peso molecular; B1 y B2 controles negativos.

2.4 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR

El gradiente de optimización de la reacción de PCR, tiene como fin de establecer c condiciones con mayor eficiencia de reacción cuando utilizamos unos *primers* nuevos. El protocolo consiste en amplificar la misma muestra de ADN combinando diferentes condiciones de la reacción:

- ✓ Temperatura de anillamiento: se evalúan las temperaturas de 55°C a 65°C, para saber cuál produce un anillamiento de los primers más idóneo.
- ✓ Concentración de MgCl₂: se varía la concentración entre 1.5mM y 4.0mM, buscando la concentración que hace más efectiva a la polimerasa.
- ✓ Concentración de *primers*: se utilizan dos concentraciones de cebadores: 0.25μM y 0.5μM.

Se realizaron las reacciones de PCR necesarias para todas las combinaciones posibles de estos factores y se corrieron en un gel de agarosa al 3% igual que el de las comprobaciones de efectividad de las PCRs. Se seleccionan las condiciones de reacción que generan el mejor producto.

Las condiciones para el proceso de PCR de BRAF exón-15 y H-, K- y N- Ras exones 1 y 2 y de *EIF1AX* en los exones 1, 2 y 6 son las siguientes:

Gen y región	Secuencia de los primers	Tamaño Ampliación pb	Tª anillamiento °C	[primers] uM	[ClMg ₂] mM
BRAF Exón 15	[+]5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' [-]5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3'	226	60	0,25	1,5
H-RAS Exón 1	[+]5'-CAGGCCCTGAGGAGCGATG-3' [-]5'-TTCGTCCACAAAATGGTTCT-3'	110	60	0,5	1,75
K-RAS Exón 1*	[+]5'-GACTGAATATAAACTTGTGG-3' [-]5'-CTGTATCAAAGAATGGTCCT-3'	163	55	0,5	2,5
N-RAS Exón 1	[+]5'-GACTGAGTACAACTGGTGG-3' [-]5'-GGGCCTCACCTCTATGGTG-3'	118	58	0,25	2,5
N-RAS Exón 2*	[+]5'-GGTGAAACCTGTTTGTGGGA-3' [-]5'-ATACACAGAGGAAGCCTTCG-3'	103	55	0,25	4
MED12 Exón 2	[+]5'-GTAACGATCTGTTCTACACGG-3' [-]5'-TGGCAGAGTTGTCTCACCTT-3'	254	60	0,25	2
EIF1AX Exón 1	[+]5'-CGCTACCCGGAAAGAAGTCA-3' [-]5'-TGACCTGCAATCTACGGGCA-3'	320	60	0,25	3
EIF1AX Exón 2	[+]5'-AATGTCATTACCTCCTTTCTTTT-3' [-]5'-GAAAGGATGTTATTTTAAAAAGCGTAA-3'	167	58	0,25	3
EIF1AX Exón 6	[+]5'-AATGCTCTTATGATGAAACTTTG-3' [-]5'-CCTTATTTAAGTGTCCCATGTT-3'	268	58	0,5	3

Tabla1: Condiciones de PCRs para cada exón y gen estudiado.

*En este caso como amplifican en general muy bien se pueden utilizar 40 ciclos de amplificación en lugar de 45.

Realicé la puesta a punto de las condiciones de los tres exones de *EIF1AX* y *MED12*, ya que las de *RAS* y *BRAF* ya se habían utilizado con anterioridad en otros experimentos del laboratorio.

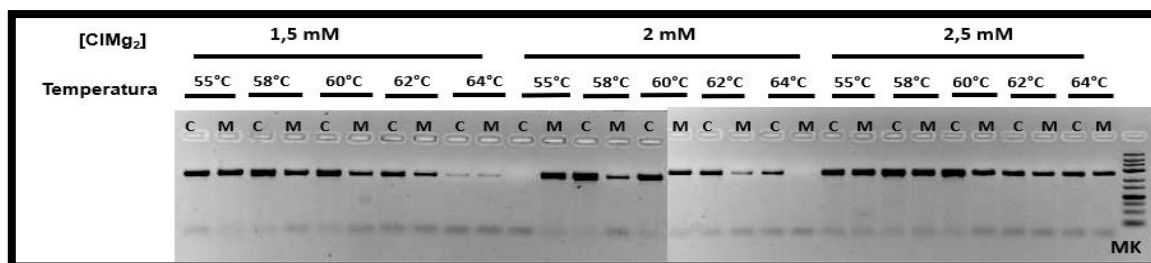


Figura 6: Parte del gradiente de optimización del exón 2 de MED12 (254 pb). Se puede observar como la máxima eficiencia de la reacción se alcanza con 0,5 uM de primers, 2,5 mM de Cloruro de Magnesio y 58°C de anillamiento

2.5 PURIFICACIÓN DE ADN

Después de amplificar el ADN se realiza un paso de purificación para eliminar todos los reactivos de la PCR y obtener el material genético lo más puro posible.

Este proceso se realiza mediante un kit comercial (Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit", GE Healthcare Life Sciences, Pittsburg, PA, USA), siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Seakem LE Agarose, Lonza, Portsmouth, NH, USA) de los productos de PCR durante, como mínimo 30 minutos, para separar las amplificaciones de productos inespecíficos y los oligos que se han producido en la PCR.
2. Observamos el gel en el transiluminador y cuando los oligos y las bandas inespecíficas se han separado lo suficiente del ADN de interés lo cortamos con un bisturí.
3. Se introduce la banda de agarosa en un tubo y se echan 500 µL Capture Buffer (fundamentalmente isopropanol), se sella el tubo con Parafilm y se deja durante 30 minutos en un bloque térmico (Grant QBD2, Grant Instruments, Cambridge, England) a 60°C. Damos un vórtex

(Vortex Mixer, Labnet International, Edison, NJ) al tubo a los 0,15 y 30 minutos para separar bien la agarosa y que no interfiera en la reacción de secuenciación.

4. Damos un pulso a la muestra en la centrifuga (Spectrocentrifuge 24D, Labnet International, Edison, NJ) 0,5 minutos a 5.000 rpm y transferimos la muestra con el Capture Buffer a la columna de purificación. Se deja incubar un minuto a temperatura ambiente y se centrifuga a 13.000 rpm 1 minuto para que se produzca la unión del ADN a la membrana.

5. Decantamos todo el volumen que ha pasado por la membrana y se ha quedado en el fondo del tubo y realizamos un lavado del ADN con Washing Buffer (etanol). Este paso nos permite eliminar lo que no se ha unido a la membrana, el resto de los reactivos de la reacción de PCR, menos el ADN. Se hacen dos centrifugaciones una de 2 minutos a 13.000 rpm y otra en seco de 0,5 minutos a las mismas revoluciones.

6. Por último, se introduce la columna en un tubo nuevo de 2mL (Sarstedt, Hildesheim, Germany), se añade tampón de elución a la membrana (diferentes volúmenes de H₂O dependiendo de la cantidad de ADN que contuviera el producto de PCR para que esté lo suficientemente concentrado, entre 15 y 30 µL) y se centrifuga a 13000 rpm 1 minuto.

Después de la purificación se realiza una última comprobación para ver que el ADN está lo suficientemente concentrado como para mandarlo a secuenciar. Consiste en un gel de agarosa al 2%, se cargan 3 µL de las muestras purificadas junto con el colorante y se deja correr por electroforesis durante 30 minutos. Si la muestra está lo suficientemente concentrada está lista para ser mandada a secuenciar.

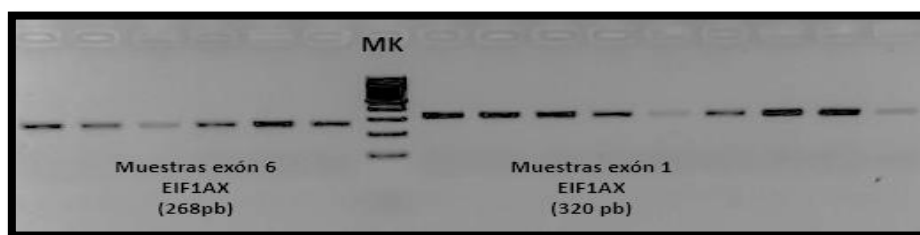


Figura 7: Gel de agarosa al 2% con un marcador de peso molecular (MK) en el centro. A la izquierda un grupo de muestras purificadas del exón 6 de EIF1AX y a la derecha del exón 1 de EIF1AX

2.6 SSCP (SINGLE STRAND CONFORMATION POLIMORPHISM)

Esta técnica está basada en que bajo condiciones no desnaturizantes la molécula de ADN monocatenaria se encuentra plegada determinada por las interacciones moleculares, es decir, por su secuencia de nucleótidos y las uniones que hay entre ellos. Por ello las hebras de cadena sencilla que difieran en al menos un nucleótido adquieren una estructura secundaria diferente a la wild type en este tipo de geles²⁴.

El protocolo para SSCP, una vez que tenemos los productos de PCR amplificados es el siguiente:

1. Se realiza un gel con acrilamida MDE (Mutation Detection Enhancement gel matrix, Lonza, Rockland, ME, USA) que es muy sensible en la detección de cambios conformacionales en el ADN. Los geles miden 18 x 16 cm de longitud y 0,75 mm de grosor. El stock de MDE está a una concentración 2X y se diluye en agua desionizada y TBE 5X para alcanzar la concentración final deseada (0.8X o 1X dependiendo del gen y exón que fuésemos a estudiar). Echamos además persulfato amónico (PSA) al 10% y TEMED (Tetrametil-etilendiamida, Acros Organics, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Y lo dejamos en un soporte vertical polimerizando.

2. En función de la cantidad del producto obtenido en la PCR seleccionamos un volumen (entre 2 y 10 µL aproximadamente) de las muestras que se va a utilizar en la SSCP y al volumen del ADN le añadimos 2.5 volúmenes de stop solution (100% formamida, 5.0M NaOH, 1% azul de bromofenol y 1% xilen-cianol).

3. Se introducen las muestras en el bloque térmico a 95°C durante 8 minutos para que se produzca la desnaturalización de las hebras de ADN
4. Se introducen rápidamente las muestras en hielo para provocar la generación de estructuras secundarias de cadena única plegadas, es decir, estructuras tridimensionales que dependen de la secuencia primaria de los ácidos nucleicos, que migran a diferente velocidad al ser sometidas a una electroforesis en gel no desnaturalizante de acrilamida.
5. Se cargan las muestras en el gel de acrilamida cuando está polimerizado. Y se realiza la electroforesis en cubeta vertical (SE 600 Ruby Standard Dual cooled vertical unit – GE Healthcare) con unas condiciones de temperatura y voltaje específicos para cada gen y exón que se regula mediante un re-circularizador (GRANT LTC2). La cubeta de electroforesis se rellena con TBE 0.5X.
6. Tinción de los geles en oscuridad con el colorante SYBR Gold (SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain 10,000X Concentrate in DMSO – Invitrogen - life technologies, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) diluido 1:10000 en TE 1X (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA pH 7.5).
7. Se visualizan los geles en el Gel Doc™ XR (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) y cortamos las bandas que presentan un patrón de migración diferente al wild type y se resuspenden en tampón TE 1X en aproximadamente 50 µL.
9. Amplificamos el ADN de las bandas mediante PCR y purificamos el producto para enviar a secuenciar como se ha explicado con anterioridad.

Todas las muestras fueron corridas por duplicado y de dos productos de PCR diferentes. La concentración del gel, el voltaje, temperatura y tiempo de la electroforesis se establece, para cada región del genoma a analizar, comparando el patrón de migración de una muestra de ADN “wild type” y una muestra mutada.

En la Tabla, a continuación, se incluyen condiciones de SSCP de BRAF exón 15, H-, K- RAS exón 1 y N-RAS exones 1 y 2.

Gen y exón	MDE gel concentración	Voltaje (V)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
<i>BRAF Exón 15</i>	0,8X	180	10	10:30
<i>H-RAS Exón 1</i>	1X	300	18	6:45
<i>K-RAS Exón 1</i>	0,8X	400	18	4
<i>N-RAS Exón 1</i>	0,8X	300	10	4:30
<i>N-RAS Exón 2</i>	0,8X	400	18	5

Tabla 2: Condiciones de las SSCP para BRAF y RAS

2.7 SECUENCIACIÓN DIRECTA POR SANGER

El método de secuenciación de Sanger se basa en desoxinucleótidos marcados con fluoróforos que carecen de cebadores (grupo –OH en el carbono 3'), los cuales sirven como terminadores de la reacción. Cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a la cadena de ADN que se está polimerizando, se detiene la elongación y se emite una luz característica dependiendo del nucleótido que se haya unido a la cadena²⁵.

Esta reacción se resuelve mediante electroforesis capilar. Para la reacción de secuenciación se emplearon los productos de PCR purificados, y el oligonucleótido correspondiente. Las reacciones de secuenciación, llevadas a cabo por la empresa portuguesa StabVida, se realizaron con el kit “ABI Prism BigDye Terminator” (PerkinElmer), y los fragmentos fueron cargados en un analizador genético ABI Prism 3700 (PerkinElmer). El resultado es un cromatograma de la secuenciación que se analizó mediante el programa Finch TV (Geospiza Inc.).

Todas las mutaciones fueron confirmadas por al menos dos secuencias correspondientes a productos de PCR distintos.

2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

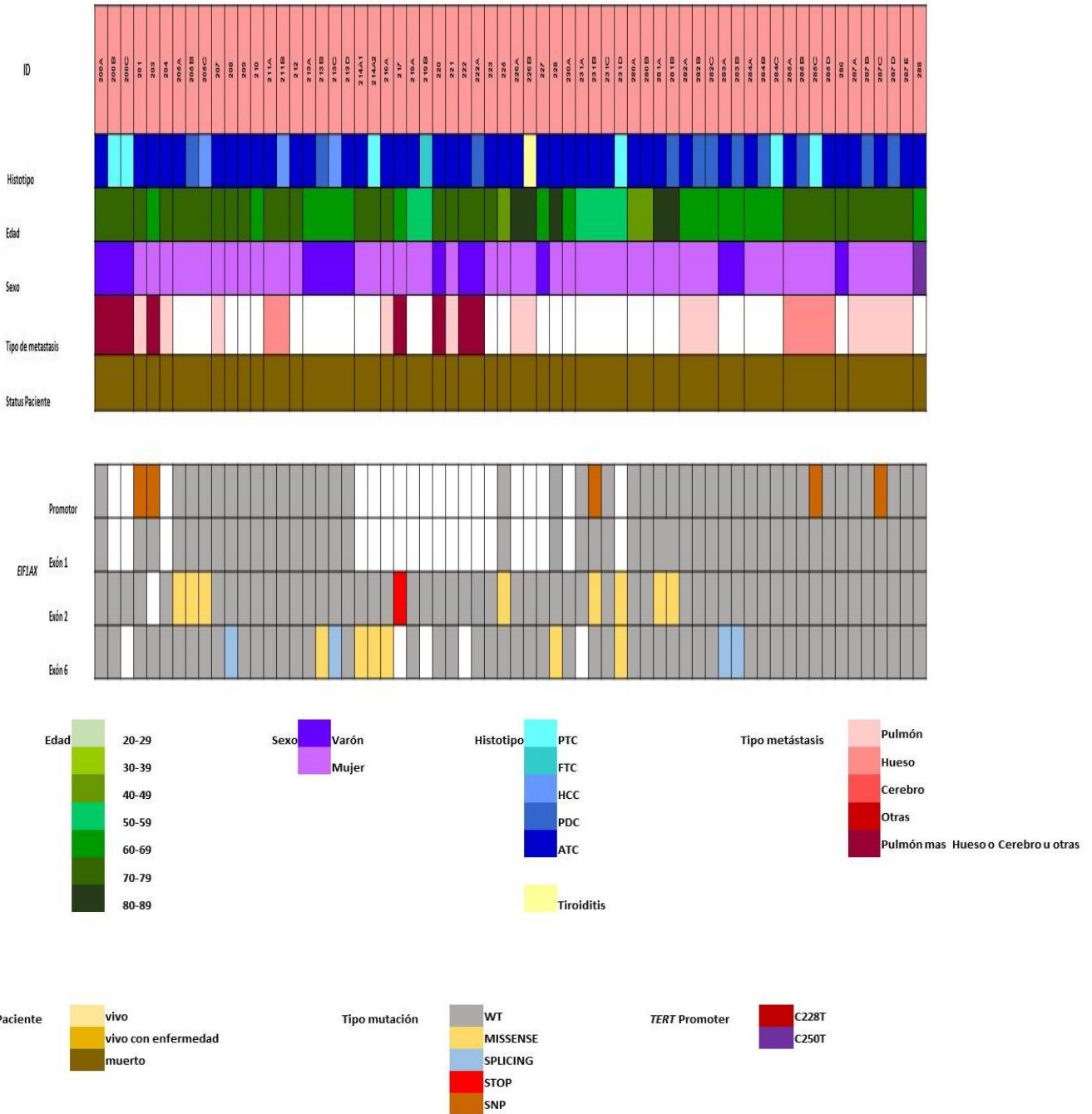
Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SPSS versión 25.0. Las mutaciones en los diferentes genes se codificaron como 0 (wild-type) y 1 (mutado) para analizar los datos.

Se ha realizado el test de Fisher de dos colas y el test de Chi-cuadrado para calcular las asociaciones entre las mutaciones de *EIF1AX* con el resto de los eventos oncogénicos descritos. Los valores debían tener una $p \leq 0.05$ para ser considerados significativos.

IV. RESULTADOS

1. PREVALENCIA DE MUTACIONES EN LOS EXONES 1, 2 Y 6 DE EIF1AX

Al analizar la frecuencia de mutaciones encontradas en el gen **EIF1AX** obtuvimos una prevalencia del **43%** (15 de 35 pacientes). Las mutaciones pueden localizarse tanto en un único exón (10 casos – 67%) o región promotora (4 casos – 27%) como coexistir en varios exones y promotor (1 caso – 7%). Si consideramos únicamente las mutaciones observadas en la región codificante la prevalencia es ligeramente inferior (31%). La tabla siguiente nos muestra la distribución de mutaciones en los 35 casos.



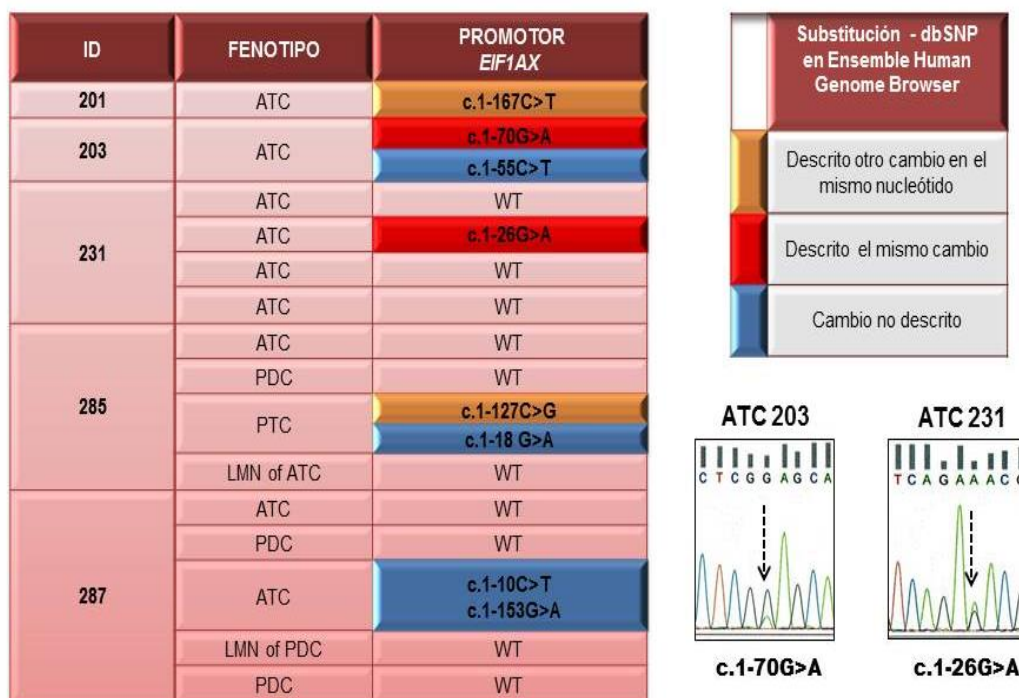
1.1 PROMOTOR Y EXÓN 1 DE *EIF1AX*

El amplicón diseñado (320 pb) para amplificar el exón 1 incluye toda la región promotora del gen lo que ha posibilitado el que pueda evaluar en paralelo tanto la existencia de mutaciones en el exón 1 como la existencia de cambios puntuales en los nucleótidos que conforman el promotor.

Por falta de tiempo sólo ha sido posible completar el genotipado del promotor y exón 1 en 22 de los 35 casos incluidos en el estudio (44 de las 65 áreas que integran la serie).

Ninguno de los 22 casos analizados resultó estar mutado en el exón 1.

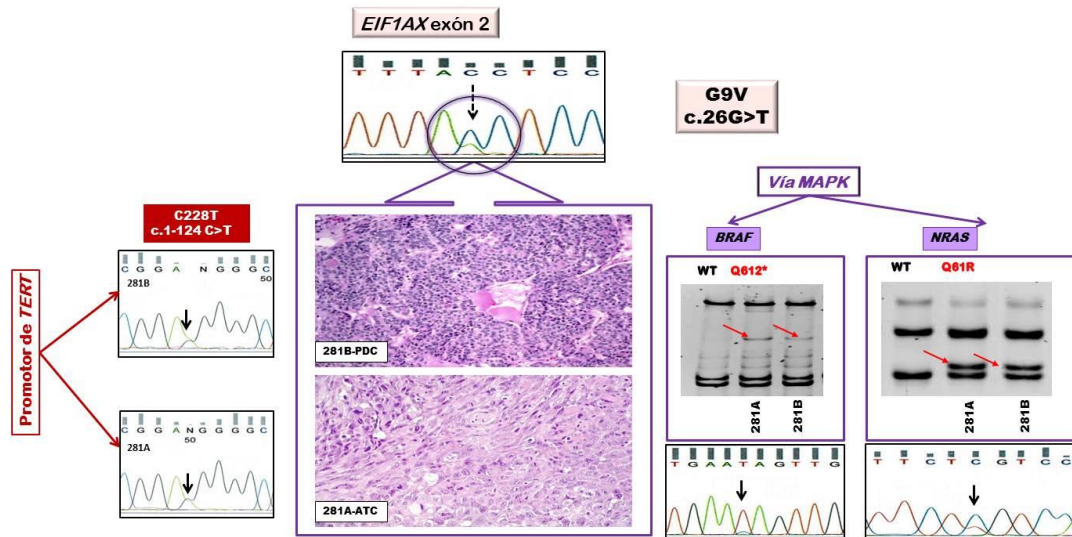
En el caso del promotor encontramos 5 casos con sustituciones de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) (**23%**). Ver casos y cambios encontrados en la **Figura 8** que se muestra a continuación.



Como se puede apreciar en la Figura 8 más arriba el fenotipo mayoritario de las áreas en las que se encontró algún SNP es de carcinoma anaplásico (4/5 – **80%**). En los tres casos en los que se analizó más de un área tumoral [231, 285 y 287] el cambio resultó ser subclonal.

1.2 EXÓN 2 DE *EIF1AX*

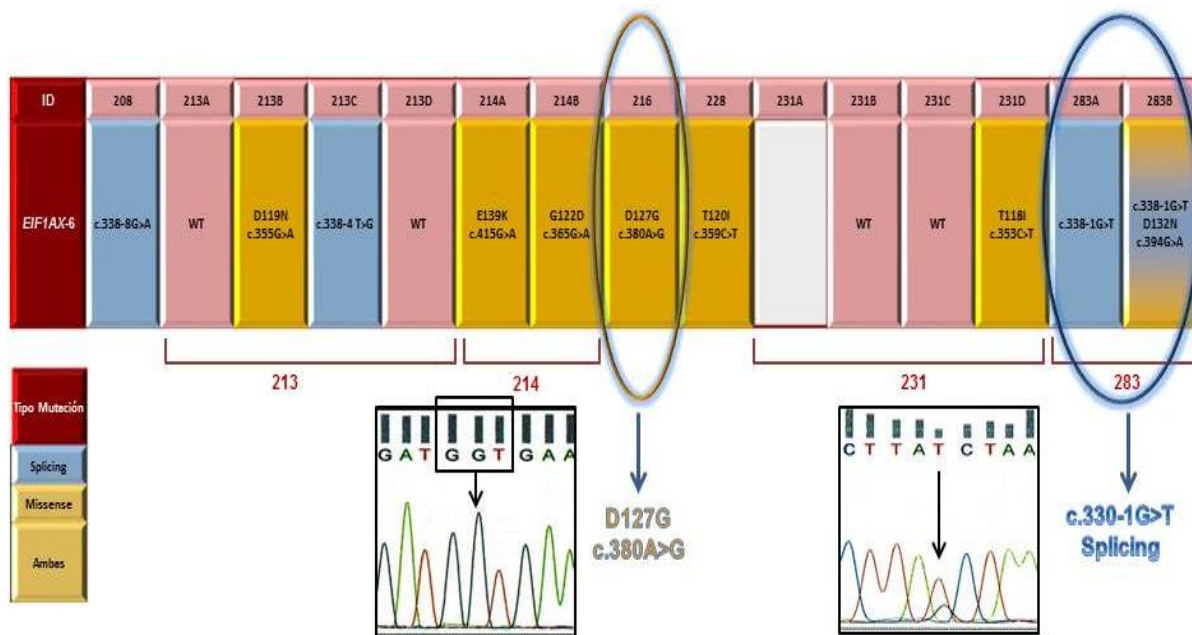
Disponemos de resultados en 64 de las 65 muestras incluidas en el estudio [34 de los 35 casos]. Cinco de los 34 casos analizados resultaron estar mutados (**15%**). Dos de los casos [205 y 281] presentaban la misma mutación [G9V→ c.26G>T] y en uno de los casos [231] coexistían dos mutaciones diferentes [G9D→ c.26G>A y G8V→ c.23G>A] en la zona considerada como caliente (alta prevalencia de mutaciones) en melanomas [codones 8, 9, 13 y 15]. Los otros dos casos mutados en el exón 2 presentaban una mutación truncante [caso 217: E18*→ c.52G>T] y una mutación missense [caso 225: G9N→c.25-26 GG>AA]. Tres de las 5 mutaciones observadas en esta serie aparecen descritas en COSMIC, en estudios realizados en otros tumores, generalmente melanomas [G9V; G9D y G8V] (60%). La **Figura 9** muestra unos de los casos mutados [281] en el exón 2 de *EIF1AX* [G9V] que, además, presentaba también mutaciones en el dominio / loop de activación de *BRAF* [Q612*], en el dominio GTPasa de *NRAS* [Q61R] y en la región promotora de *TERT* [C228T→c.1-124G>T].



En dos de los 3 casos [67%; casos 205 y 281] mutados en los que se analizó más de un área, la mutación encontrada tenía carácter clonal.

1.3 EXÓN 6 DE EIF1AX

En el exón 6 se completó el estudio en 33 casos (60 áreas), presentando mutaciones 7 (21%). La **Figura 10** a continuación muestra las mutaciones observadas [7 missense, y 3 splicings]



Dos [D119N y G122D] de las 7 mutaciones missense aparecen en COSMIC. Los codones 127 y 139 también aparecen mutados en COSMIC pero el cambio de aminoácido que muestra la base de datos es diferente. Tres de las mutaciones missense encontradas [T120I, T118I y D132N] no están recogidas en COSMIC.

De los 3 cambios susceptibles de generar un splicing alternativo sólo el cambio c.338-1G>T aparece en COSMIC, aunque el cambio de nucleótido en nuestro caso es diferente.

En los 4 casos mutados, en los que se analizaron diferentes áreas, los cambios encontrados resultaron ser subclonales. Sólo la mutación c.338-1G>T reveló ser clonal, detectándose tanto en el área PDC como en el área ATC del caso 283.

2. CLONALIDAD SUBCLONALIDAD DE LAS MUTACIONES EN *EIF1AX*.

Como se refleja en el diseño del estudio en el 46% de los casos estudiados (16/35) se analizó más de un área tumoral con el objeto de determinar si las mutaciones que pudiéramos encontrar:

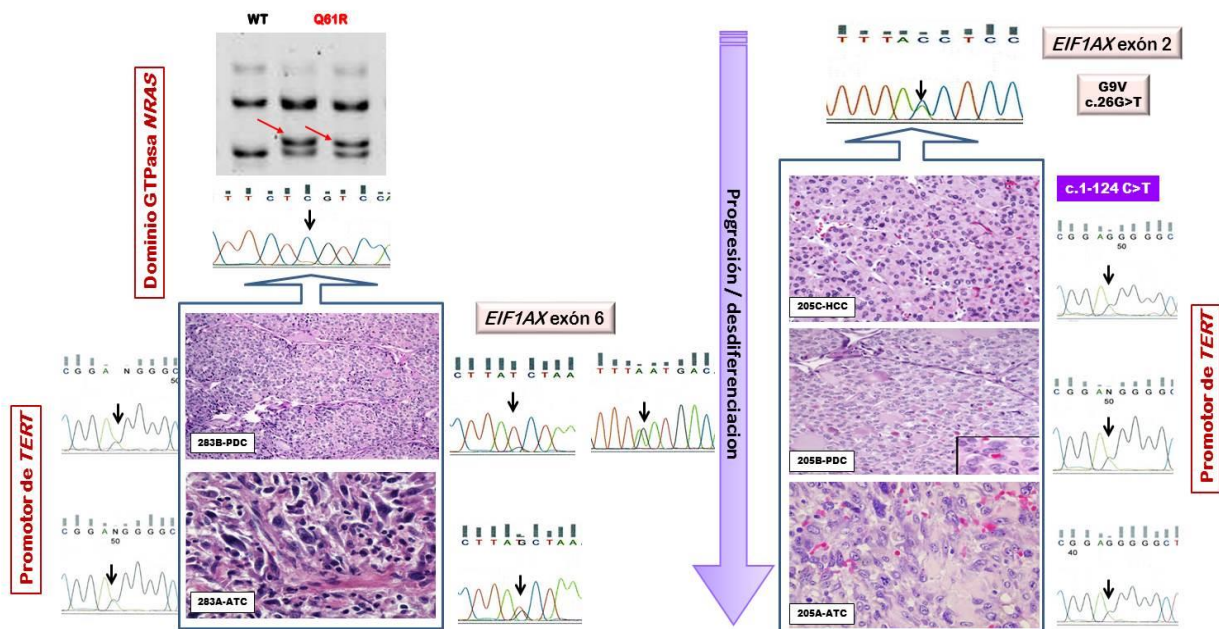
- tenían carácter clonal o subclonal
- segregaban con la progresión y des-diferenciación tumoral

En los 14 casos en los que fue posible analizar áreas de carcinoma tiroideo mejor diferenciado [PTC, FTC, HCC, PDC] dentro de la misma biopsia de carcinoma anaplásico (ATC) observamos lo siguiente:

- en 7 casos (50%) todas las áreas genotipadas resultaron ser WT.
- en 3 casos (21,4%) la mutación estaba presente en todas las áreas analizadas independientemente del grado de diferenciación de las mismas. En uno de ellos [283], el área pobremente diferenciada presentaba una mutación puntual de tipo missense a mayores de la mutación tipo *splicing* presente en el área de ATC (Ver **figura10** en apartado anterior).
- en 4 casos (28,5%) la mutación estaba presente sólo en alguna de las áreas

Si consideramos únicamente aquellos casos mutados en los que se analizaron áreas concurrentes mejor diferenciadas, en el 43% de los casos (3/7) la mutación de *EIF1AX* era clonal y en el 57% de los casos (4/7) subclonal. El 50% de las mutaciones de tipo missense y el 50% de las mutaciones capaces de desencadenar un *splicing* alternativo eran clonales. En el caso del promotor todos los cambios encontrados resultaron ser subclonales.

En el 43% de los casos mutados (3/7) en los que se analizaron áreas de carcinoma tiroideo mejor diferenciado [PTC, FTC, HCC, PDC] dentro de la misma biopsia de carcinoma anaplásico (ATC) observamos que la mutación segregaba con la progresión desdiferenciación tumoral (ver **Figura 11** a continuación y **Figura 9** caso 281 – pag. anterior)



En 6 casos se analizó más de un área de ATC con diferente apariencia microscópica (epiteliode, sarcomatoide), bien dentro del tumor primario o en ganglios linfáticos metastatizados. El 67%(4/6) presentaba algún tipo de mutación, que en el 100% de los casos era subclonal. Las áreas de ATC en ganglios linfáticos [caso 213 y caso 285] no estaban mutadas en ninguno de los exones.

3. COEXISTENCIA DE MUTACIONES EN *EIF1AX* CON OTROS EVENTOS ONCOGÉNICOS EN ATCs

Como se ha expuesto con anterioridad los carcinomas anaplásicos además poder acumular mutaciones en un mismo gen en diferentes exones o incluso en el mismo exón (e.j. *EIF1AX*, *RAS*, *BRAF*, ...), también muestran en un gran número de casos mutaciones sincronas o metacronas en diferentes genes. Exhiben una gran heterogeneidad molecular intratumoral.

Para determinar si coexisten clones celulares mutados en *EIF1AX* con clones mutados en *BRAF*, *RAS* y/o región promotora de *TERT*, eventos de naturaleza oncogénica muy frecuentes en los ATCs, hemos evaluado la existencia de mutaciones en el dominio de activación de *BRAF*, los dominios GTP-Binding y GTPasa de los 3 genes *RAS* y la región promotora de *TERT* en las mismas 65 muestras (35 pacientes) en las que se ha genotipado *EIF1AX*. El estudio de la región promotora de *TERT* se ha llevado a cabo mediante PCR seguida de secuenciación directa y el estudio de *BRAF* y *RAS* mediante PCR-SSCP-secuenciación directa.

3.1 MUTACIONES EN GENES DE LA FAMILIA DE *RAS*

El 29% (10/35) de los casos analizados estaban mutados en *RAS*

No se encontraron mutaciones en el dominio GTP-binding de *HRAS* y *NRAS*.

El 17% (6/35) de los casos estaban mutados en el dominio GTPasa de *NRAS*. Todos ellos presentaban la mutación Q61R (c.182A>G), que conlleva el cambio de Glutamina por Arginina en el codón 61. En los 3 casos en los que se analizaron áreas concurrentes de carcinoma mejor diferenciado la mutación demostró ser clonal y segregar con la progresión, desdiferenciación tumoral.

El 11.4% (4/35) de los casos estaban mutados en el dominio GTP-binding de *KRAS*. Todos ellos presentaban la mutación G12D (c.35G>A), que conlleva el cambio de Glycina por Aspártico en el codón 12. En 3 de los casos se analizaron áreas concurrentes de carcinoma mejor diferenciado y se comprobó que la mutación segregaba con la progresión, desdiferenciación.

3.2 MUTACIONES EN *BRAF*

El 31% (11/35) de los casos analizados estaban mutados en el dominio de activación de *BRAF* (exón 15). Al igual que en *RAS* las mutaciones eran clonales, estaban presentes en todas las áreas analizadas dentro de un mismo tumor.

En 7 casos (64%) la mutación encontrada conllevaba el cambio de Valina por Glutámico en el codón 600 (V600E→ c.1799T>A). En el 57% (4/7) de los casos la mutación segregaba con la desdiferenciación progresión tumoral.

En 2 casos (18%) se observó una mutación truncante en el aminoácido 612 que determinaba la substitución de Glutamina por un codón Stop (Q612*→c.1834C>T). Al igual que la mutación V600E segregaba con la progresión de PDC a ATC.

En 1 caso (9%) se encontró una mutación que ocasionaba el cambio de Leucina por Glutamina en el codón 597 como consecuencia de una transversión (T>A) en el nucleótido 1790.

En 1 caso (9%) se encontró otra mutación puntual consistente en una transición (G>A) en el nucleótido 1844 que conllevaba la substitución de Glicina por Glutámico en el codón 615.

3.3. MUTACIONES EN EL PROMOTOR DEL GEN *TERT*

Los resultados de este gen se obtuvieron en un estudio realizado con anterioridad en el laboratorio, en las mismas muestras en las que se ha analizado *EIF1AX*.

El 63% (22/35) de los casos presentaba una de las dos mutaciones puntuales más comúnmente observadas en diferentes tipos de tumores [C228T→c.1-124C>T o C250T→c.1-146C>T]. La

mutación C250T (c.1-146C>T) se encontró en únicamente 3 casos (14%). Los restantes 19 casos (86%) mostraban la mutación C228T (c.1-124C>T).

En el 82% (9/11) de los casos en los que se analizaron áreas concurrentes mejor diferenciadas presentes dentro de los ATC, la mutación era clonal y segregaba con la progresión, desdiferenciación tumoral.

3.4 COEXISTENCIA DE MUTACIONES EN DIFERENTES GENES- HETEROGENEIDAD MOLECULAR INTRATUMORAL

El 33% (5/15) de los casos mutados en *EIF1AX* mostraban activación oncogénica de alguno de los tres genes *RAS* ($p=0.45$ Fisher de dos colas). En un 60% (3/5) de los casos coexistía con la mutación Q61R (c.182G>A) en *N-RAS* y en un 40% (2/5) con la mutación G12D (c.35G>A) en *K-RAS*.

El 27% (4/15) de los casos mutados en *EIF1AX* estaban también mutados en *BRAF* ($p=0.721$ Fisher de dos colas). En un 75% (3/4) de los casos coexistía con la mutación V600E (c.1799T>A) y en 25% (1/4) con la mutación Q612* (c. 1834C>T).

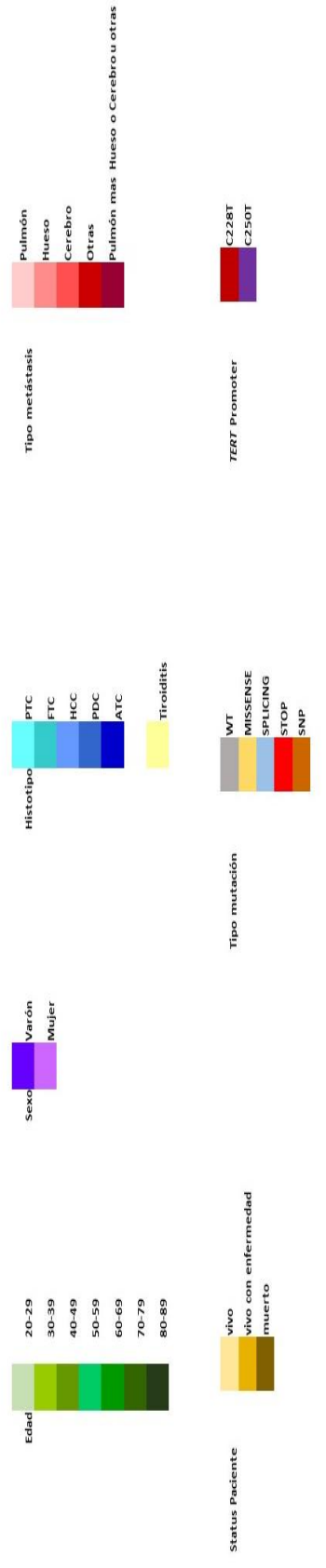
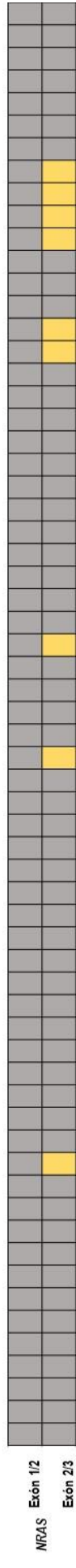
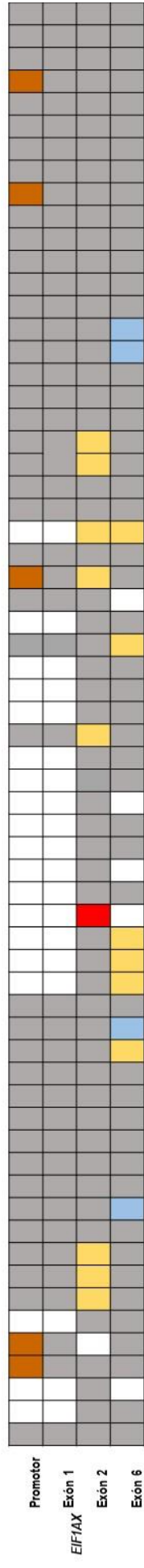
El 73% (11/15) de los casos mutados en *EIF1AX* presentaban mutaciones concurrentes en el promotor de *TERT* ($p=0.312$ Fisher de dos colas). En todos los casos menos en uno (91% - 10/11) la mutación observada fue C228T (c.1-124C>T).

Cuando analizamos la concurrencia de mutaciones en *EIF1AX* y mutaciones en cualquiera de los eventos oncogénicos estudiados observamos que solamente en dos casos (13%) *EIF1AX* no se asocia con ninguna otra mutación. Lo más frecuente es que aparezcan mutaciones en al menos 2 de los genes estudiados, existiendo un caso en los que todas las rutas estudiadas estaban mutadas (6,6%). La tabla que se incluye a continuación nos muestra los 15 casos mutados en *EIF1AX*, 13 de ellos mutados también en algunos de los genes estudiados (*N*-, *K*- *H-RAS*, *BRAF* y *TERT*).

ID	Fenotipo	Estatus genético			
		EIF1AX	RAS	BRAF	TERT
201	ATC	c.1-167C>T	WT	WT	WT
203	ATC	c.1-70G>A + c.1-55C>T	WT	WT	C228T
205	ATC	G9V	WT	WT	C228T
	PDC	G9V	WT	WT	C228T
	WD-HCC	G9V	WT	WT	C228T
208	ATC	c.338-8G>A	WT	V600E	C228T
213	ATC	WT	WT	WT	C228T
	PDC	D119N	WT	WT	C228T
	WD-HCC	c.338-4 T>G	WT	WT	C228T
	LMN ATC	WT	WT	WT	C228T
214	ATC	E139K	WT	WT	WT
	PTC	G122D	WT	WT	WT
216	ATC	D112G	G12D(K-RAS)	V600E	WT
217	ATC	E18*	G12D(K-RAS)	V600E	WT
225	ATC	G9N	WT	WT	C228T
228	ATC	T120I	Q61R (N-RAS)	WT	C228T
231	ATC	WT	WT	WT	C228T
	ATC	c.1-26G>A+ G9D+G8E	WT	WT	WT
	ATC	WT	WT	WT	C228T
	ATC	G9D+G8E	WT	WT	C228T
281	ATC	G9V	Q61R (N-RAS)	Q612*	C228T
	PDC	G9V	Q61R (N-RAS)	Q612*	C228T
283	ATC	c.338-1G>T	Q61R (N-RAS)	WT	C228T
	PDC	c.338-1G>T + D132N	Q61R (N-RAS)	WT	C228T
285	ATC	WT	Q61R (N-RAS)	WT	C228T
	PDC	WT	Q61R (N-RAS)	WT	C228T
	PTC	c.1-127C>G + C.1-18 G>A	Q61R (N-RAS)	WT	C228T
	LMN of ATC	WT	Q61R (N-RAS)	WT	C228T
287	ATC	WT	WT	WT	C250T
	PDC	WT	WT	WT	C250T
	ATC	c.1-10C>T + c.1-153G>A	WT	WT	C250T
	LMN of PDC	WT	WT	WT	C250T
	PDC	WT	WT	WT	C250T

Tabla 3: Mutaciones encontradas en 15 pacientes de *EIF1AX* con ATCs Comparación con la coexistencia de otros eventos oncogénicos. Abreviaturas: WT, wild-type, LMN, metástasis en ganglios linfáticos, WD: well diferenciated

En la **Figura 12** a continuación se muestran de forma esquemática las mutaciones encontradas en *EIF1AX*, *BRAF* y *RAS* en los 35 casos caracterizados. En el panel superior aparecen algunos parámetros clínico- patológicos de los pacientes (edad, sexo, status del paciente, histotipo del área analizada, tipo de metástasis y tipo de mutación). Los códigos de colores asignados a cada dato aparecen en el panel inferior



V. DISCUSSION

1. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES EN *EIF1AX* EN ATCs

Las mutaciones en el gen *EIF1AX* han sido descritas en diferentes tipos de tumores de tiroides con diferente agresividad y comportamiento. En algunos estudios se las relaciona con hiperplasias y adenomas²² y en otros con los histotipos más agresivos (PDCs y ATCs)¹⁶. Su frecuencia difiere de unos estudios a otros.

En nuestro caso hemos encontrado una prevalencia global de mutaciones del 43%, que es considerablemente superior a la reportada hasta el momento en ATCs [9% - 25%]^{16,17}. A diferencia de estudios previos en cáncer de tiroides y en particular en ATCs, en nuestra serie no hemos observado una zona caliente de mutación. La única mutación que se repite es G9V (c.26G>T) en el exón 2. En muchos de los estudios previos las mutaciones tienden por el contrario a concentrarse en los 2-3 nucleótidos que preceden a la secuencia del exón 6, que por la localización provocan splicings alternativos. De acuerdo con los datos reportados por otros grupos, en nuestra serie ninguno de los casos analizados presentaba mutaciones en el exon1.

El 60% de las mutaciones encontradas en el exón 2 y el 30% de las mutaciones observadas en el exón 6 aparecen en COSMIC y sabemos que resultan patogénicas. Desconocemos el significado de los cambios observados en el promotor.

2. NATURALEZA CLONAL O SUBCLONAL DE LAS MUTACIONES DE *EIF1AX*

No existen datos en la literatura relativos al carácter clonal o subclonal de las mutaciones en *EIF1AX*. Este es el primer estudio que tiene en consideración dicho aspecto en su ejecución. A diferencia de otros eventos oncogénicos frecuentes en los carcinomas anaplásicos, como las mutaciones de *BRAF*, *RAS* y *TERT*, que tienden a ser clonales en la mayoría de los casos, solo el 43% de las mutaciones encontradas en *EIF1AX* mostraban carácter clonal. El 50% de las mutaciones de tipo missense y el 50% de las mutaciones capaces de desencadenar un splicing alternativo eran clonales.

3. ASOCIACION DE *EIF1AX* CON DESDIFERENCIACION, PROGRESION TUMORAL.

Como en el caso de la clonalidad no existen datos fiables que nos permitan determinar si *EIF1AX* juega un papel en la desdiferenciación, progresión tumoral. Sólo hay un estudio de Julio de 2018 en el que se analizan en 16 Carcinomas Pobremente Diferenciados (PDCs) y Anaplásicos (ATCs) áreas concurrentes mejor diferenciadas presentes dentro del tumor primario diagnosticado en unos casos como carcinoma pobremente diferenciado y en otros como carcinoma anaplásico²¹. Los resultados del estudio parecen sugerir que *EIF1AX* no es relevante en progresión desdiferenciación tumoral. En nuestro caso, en el 43% de los casos mutados en los que se analizaron áreas de carcinoma tiroideo mejor diferenciado [PTC, FTC, HCC, PDC] dentro de la misma biopsia, observamos que la mutación segregaba con la progresión desdiferenciación tumoral.

4. COEXISTENCIA DE LAS MUTACIONES DE *EIF1AX* CON OTROS EVENTOS ONCOGÉNICOS DESCRITOS EN ATCS

En estudios previos en ATCs se ha observado una asociación estadísticamente significativa entre las mutaciones en *EIF1AX* y las mutaciones en *RAS*, concretamente en *NRAS*²⁶. En nuestro caso aunque el 33% de los ATCs mutados en *EIF1AX* presentaba mutaciones concurrentes en *NRAS*, la

asociación entre ambos eventos no llega a ser estadísticamente significativa ($p=0.45$ Fisher de dos colas).

Al igual que en estudios previos nosotros tampoco hemos encontrado asociación entre las mutaciones en *EIF1AX* y las mutaciones en *BRAF*. El 27% de los ATCs mutados en *EIF1AX* estaba también mutado en *BRAF* ($p=0.721$ Fisher de dos colas).

Por lo que respecta a la asociación o no entre mutaciones en *EIF1AX* y las mutaciones en el promotor de *TERT* no sabemos de ningún estudio que haya correlacionado ambos eventos y que haya encontrado una asociación estadísticamente significativa. En nuestro caso el 73% de los casos mutados en *EIF1AX* presentaban mutaciones concurrentes en el promotor de *TERT* ($p=0.312$ Fisher de dos colas).

De acuerdo con la inestabilidad genómica que caracteriza a los ATCs el 87% de los casos mutados en *EIF1AX* presentaba mutaciones en algunos de los eventos oncogénicos analizados (*BRAF*, *RAS* y/o *TERT*).

5. PERSPECTIVAS FUTURAS DE *EIF1AX*

Completar el estudio iniciado en los carcinomas pobremente diferenciados y correlacionar los resultados de *EIF1AX* en PDCs, ATCs y carcinomas papilares agresivos (analizados por otro componente del grupo) con parámetros clínico patológicos de relevancia pronóstica en el manejo clínico de los pacientes con cáncer de tiroides (sexo, edad al diagnóstico, tamaño del tumor, subtipo histológico, presencia de extensión extratiroidea, invasión vascular, metástasis en ganglios linfáticos y/ o a distancia al diagnóstico y/o durante el seguimiento, desarrollo de recurrencias, estadio tumoral al diagnóstico y estatus del paciente en el momento de revisión de la historia clínica).

VI. CONCLUSIONES

En vista a los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir:

1. *EIF1AX* aparece frecuentemente mutado en los ATCs (43%). Una prevalencia considerablemente superior a la reportada hasta el momento en los ATCs que oscila entre el 9% y el 25 %
2. Las mutaciones pueden localizarse en un único exón (67%), afectar a la región promotora (27%) o coexistir en varios exones y promotor (7%). A diferencia de estudios previos en ATCs en nuestro caso no existe una zona caliente de mutaciones
3. El 60% de las mutaciones encontradas en el exón 2 y el 30% de las mutaciones observadas en el exón 6 aparecen en COSMIC y sabemos que resultan patogénicas
4. Desconocemos el significado de los cambios observados en el promotor. Ningún estudio previo en ATCs u otro tipo de cáncer de tiroides o cáncer en general ha descrito sustituciones nucleotídicas puntuales en la región promotora de *EIF1AX*.
5. A diferencia de otros eventos oncogénicos frecuentes en los ATCs, las mutaciones de *EIF1AX* tienden a ser eventos subclonales. Sólo el 43% de las mutaciones encontradas en *EIF1AX* mostraban carácter clonal.
6. *EIF1AX* no parece ser condición necesaria para la progresión y desdiferenciación de los carcinomas de tiroides. En el 43% de los casos en los que se analizó algún área mejor diferenciada la mutación segregaba con el proceso de desdiferenciación.
7. *EIF1AX* no parece ser relevante en el desarrollo por parte de los ATCs de metástasis locales o a distancia.
8. No existe una asociación estadísticamente significativa entre las mutaciones de *EIF1AX* y otros eventos oncogénicos frecuentes en los ATCs, como las mutaciones de *RAS*, *BRAF* y promotor de *TERT*. En nuestro caso cabe destacar que el 73% de los casos mutados en *EIF1AX* presentaban mutaciones concurrentes en el promotor de *TERT*

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Carling, T. & Udelsman, R. Thyroid cancer. *Annu. Rev. Med.* **65**, 125–137 (2014).
4. Kondo, T., Ezzat, S. & Asa, S. L. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 292–306 (2006).
5. Xu, B. & Ghossein, R. Genomic Landscape of poorly Differentiated and Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Endocr. Pathol.* **27**, 205–212 (2016).
6. Xing, M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 184–199 (2013).
7. Kunstman, J. W. *et al.* Characterization of the mutational landscape of anaplastic thyroid cancer via whole-exome sequencing. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2318–2329 (2015).
8. David L. Nelson, M. M. C. *Lehninger Principles of Biochemistry*.
9. Agrawal, N. *et al.* Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell* **159**, 676–690 (2014).
10. Walsh, D. & Mohr, I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 860–875 (2011).
11. Chaudhuri, J., Chowdhury, D. & Maitra, U. Distinct Functions of Eukaryotic Translation Initiation Factors eIF1A and eIF3 in the Formation of the 40 S Ribosomal Preinitiation Complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 17975–17980 (1999).
12. Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P. & Sonenberg, N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* **352**, 1413–1416 (2016).
13. Chaudhuri, J., Si, K. & Maitra, U. Function of Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A (eIF1A) (Formerly Called eIF-4C) in Initiation of Protein Synthesis. *J. Biol. Chem.* **272**, 7883–7891 (1997).
14. Roll-Mecak, A., Shin, B.-S., Dever, T. E. & Burley, S. K. Engaging the ribosome: universal IFs of translation. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 705–709 (2001).
15. Martin, M. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in *EIF1AX* and *SF3B1* in uveal melanoma with disomy 3. *Nat. Genet.* **45**, 933–936 (2013).
16. Landa, I. *et al.* Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J. Clin. Invest.* **126**, 1052–1066 (2016).
17. Karunamurthy, A. *et al.* Prevalence and phenotypic correlations of EIF1AX mutations in thyroid nodules. *Endocr. Relat. Cancer* **23**, 295–301 (2016).
18. Ewens, K. G. *et al.* Chromosome 3 status combined with BAP1 and EIF1AX mutation profiles are associated with metastasis in uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 5160–5167 (2014).
19. Kozak, M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**, 187–208 (1999).
20. Saini, A. K., Nanda, J. S., Lorsch, J. R. & Hinnebusch, A. G. Regulatory elements in eIF1A control the fidelity of start codon selection by modulating tRNA^{iMet} binding to the ribosome. *Genes Dev.* **24**, 97–110 (2010).
21. Simões-Pereira, J. *et al.* The role of EIF1AX in thyroid cancer tumorigenesis and progression. *J. Endocrinol. Invest.* (2018). doi:10.1007/s40618-018-0919-8

22. Jung, S.-H. *et al.* Mutational burdens and evolutionary ages of thyroid follicular adenoma are comparable to those of follicular carcinoma. *Oncotarget* **7**, 69638–69648 (2016).
23. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335–350 (1987).
24. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. & Sekiya, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 2766–2770 (1989).
25. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–5467 (1977).
26. Etemadmoghadam, D. *et al.* EIF1AX and NRAS Mutations Co-occur and Cooperate in Low-Grade Serous Ovarian Carcinomas. *Cancer Res.* **77**, 4268–4278 (2017).

ANEXO I. ABREVIATURAS

- **UV:** Ultravioleta
- **PTCs:** Carcinomas tiroideos papilares
- **FTCs:** Carcinomas tiroideos foliculares
- **PDCs:** Carcinomas tiroideos pobremente diferenciados
- **ATCs:** Carcinomas tiroideos anaplásicos
- **ARNm:** ARN mensajero
- **ARNt:** ARN transferente
- **eIF:** Factores de iniciación eucarióticos
- **PIC:** Complejo de preiniciación
- **NTT:** Cola N-terminal
- **CTT:** Cola C-terminal
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **SSCP:** *Single strand conformation polymorphism*, conformación de polimorfismos de cadena única.
- **COSMIC:** Cataloge of Somatic Mutations in Cancer