



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrado

**CARCINOMA TIROIDEO EN PERROS:
ASPECTOS MOLECULARES**

Paula Pessina

TESIS DE MAESTRIA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2011



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrado

CARCINOMA TIROIDEO EN PERROS:

ASPECTOS MOLECULARES

Paula Pessina

Dra. Ana Meikle
Directora de Tesis

Dr. Víctor Castillo
Co-director

2011

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

2011

ACTA DE DEFENSA DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

“La vida es incertidumbre. Cada momento es un paso hacia una mayor incertidumbre. Es una apuesta en la cual nadie sabe lo que sucederá. Y el hecho de no saber es hermoso en sí. Si la vida fuera previsible, no valdría la pena vivirla...”

OSHO

Hoy me encuentro frente a esta página en blanco y es muy difícil poner en pocas palabras todo lo que siento. Sin duda agradezco a la vida que por ser impredecible, me enfrentó a este gran desafío. Agradezco a mis padres por “todo” y por haberme dado el impulso para retornar a la Facultad después de más de 10 años de haber egresado y agradezco a Dios por haberles permitido estar hoy a mi lado. A mis hijos, Emi y Joaco que junto a Martín, mi esposo sufrieron mis nervios, mi falta de tiempo o dedicación en algunos momentos de este largo camino.

Agradezco muy especialmente a Ana, quien me enseñó muchísimo de lo poco que hoy sé, quien siempre tuvo la mano extendida para ayudarme y enseñó un camino de aprendizaje y esfuerzo. Doy gracias también a la vida por el reencuentro, por lo compartido y lo vivido juntas. Gracias por la paciencia, por valorar mi esfuerzo y por aceptar mis limitaciones.

A Gretel y Andrea con quien comparto todos los días la oficina e hicieron que me sintiera a gusto y juntas hacer de la convivencia una especie de suerte, una amistad compartida, complicidad a veces, gracias “amigas”. A Juan que traerá aire nuevo para refrescar el día a día.

Agradezco muy especialmente a Manu, quien me dió energía y valor para poner a andar metodologías nuevas para ambas, pero que con su risa y compromiso todo resultó más fácil.

No puedo dejar de agradecer a Isa, que se unió a mi esfuerzo y ayudó en todo lo que le fue posible y más. A Gonza por apoyar en silencio pero siempre atento y solidario.

Aunque ya jubilada, Marlene, agradezco tu amistad, tu frescura y devoción por ayudarnos a todos, gracias por haberme hecho sentir en casa.

Al Dr. Victor Castillo, Co-tutor de esta tesis, por haber confiado en nosotros, por sus conocimientos, por haber apoyado académicamente, a mí y a la Facultad de Veterinaria, gracias por haber sugerido el tema de este trabajo y haber ayudado en la realización del mismo.

A Mariana y Paula por ayudarme a resolver dificultades y hacer que el camino fuera más sencillo.

A mis tesistas de grado que con su trabajo fortalecieron el mío.

Agradezco al Dr. Gabriel Semiglia por haber realizado la cirugía a mis pacientes, permitirme asistir a las mismas e intercambiar opiniones; así como también al Dr. Enrique Cueto quien siempre tuvo presente mi trabajo y ayudó a conseguir muchas de las muestras utilizadas.

A la Dra. Alejandra Pirri por la compañía en las pasantías en la UBA, por las charlas de endocrinología que compartimos y por los pacientes compartidos.

Especialmente doy las gracias al Laboratorio de Técnicas Nucleares, que con su soporte económico permitió que se realizara este trabajo.

Por último, GRACIAS a todos por permitirme confirmar que lo que realmente importa en la vida no son las cosas que tengo sino las personas que me rodean.

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----|
| 1. RESUMEN..... | vi |
| 2. SUMMARY..... | vii |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 4. ANTECEDENTES | 2 |
| 4.I. LA GLÁNDULA TIROIDES | 2 |
| 4 I.1. Anatomía..... | 2 |
| 4.I.2. Histología | 3 |
| 4.I.3. Embriología | 4 |
| 4.I.4. Regulación | 5 |
| 4.I.5. Fisiología | 7 |
| 4.I.5.1. Unión de la TSH a su receptor en el tirocito..... | 7 |
| 4.I.5.2. Control de la secreción de hormonas tiroideas por la TSH..... | 8 |
| 4.I.5.3. Regulación de la expresión génica por TSH..... | 10 |
| 4.I.5.4. Regulación del crecimiento de la tiroides..... | 11 |
| 4.II. CÁNCER EN CANINOS | 14 |
| 4.II.1. Carcinoma tiroideo | 15 |
| 4.II.2. Antecedentes y Epidemiología | 15 |
| 4. II.3. Etiología y Factores Asociados | 16 |
| 4.II.4. Tipos Histopatológicos del cáncer de tiroides | 18 |
| 4.II.5. Diagnóstico del carcinoma tiroideo | 18 |
| 4.II.6 Tratamiento del carcinoma tiroideo | 20 |
| 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 23 |
| 6. HIPÓTESIS..... | 25 |
| 7. OBJETIVOS..... | 25 |
| 8. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 26 |
| Estudio 1: Factores asociados a la presentación del tipo de cáncer en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria con énfasis en el carcinoma tiroideo..... | 26 |
| Estudio 2: Carcinoma tiroideo: expresión génica de marcadores moleculares específicos de tiroides: TSH-R, Tg, TPO, TTF-1 y PAX-8..... | 26 |
| 9. RESULTADOS..... | 30 |

| | |
|---|----|
| Estudio 1: Factores asociados a la presentación del tipo de cáncer en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria con énfasis en el carcinoma tiroideo | 30 |
| a) Casuística del cáncer en casos atendidos en la Facultad de Veterinaria 2005 - 2010 | 30 |
| b) Cáncer y Factores asociados | 30 |
| c) Cáncer de tiroides | 32 |
| Estudio 2: Carcinoma tiroideo: expresión génica de marcadores moleculares específicos de tiroides: TSH-R, Tg, TPO, TTF-1 y PAX-8 | 33 |
| a) Efecto del género sobre los transcritos en tiroides de animales sanos.. | 33 |
| b)Expresión de los transcritos en la glándula tiroides en animales sanos, en lóbulo tiroideo carcinomatoso y contralateral..... | 33 |
| c) Análisis de correlaciones..... | 34 |
| 10. DISCUSIÓN..... | 36 |
| Estudio 1 Factores asociados a la presentación del tipo de cáncer en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria con énfasis en el carcinoma tiroideo..... | 36 |
| Estudio 2 Carcinoma tiroideo: expresión génica de marcadores moleculares específicos de tiroides: TSH-R, Tg, TPO, TTF-1 y PAX-8 | 37 |
| 11. CONCLUSIONES | 39 |
| 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 40 |
| 13. ANEXO | 50 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| 1. Regulación del crecimiento de la tiroides. Se resumen los factores más relevantes que afectan la mitosis del tirocito y otras funciones diferenciadas de la tiroides..... | 12 |
| 2. Estadificación Clínica de los Tumores Tiroideos Caninos..... | 19 |
| 3. Descripción del tumor luego del exámen histopatológico y concentraciones de tiroxina libre (fT4) y tirotropina (TSH)..... | 27 |
| 4. Secuencias de los pares de primers usados para PCR en tiempo real..... | 28 |
| 5. Casuística de neoplasias en perros durante el período 2005-2010..... | 30 |
| 6. Número de casos clínicos y distribución porcentual acorde al género para cada tipo de cáncer..... | 31 |
| 7. Distribución del tipo de cáncer acorde a la edad..... | 32 |
| 8. Análisis de correlaciones para Grupo sano y lóbulo contralateral..... | 35 |
| 9. Análisis de correlaciones para el Grupo carcinoma..... | 35 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| 1. Anatomía de la glándula tiroides del perro..... | 2 |
| 2. Representación de las fases iniciales del desarrollo de la tiroides y el tiempo de expresión de los factores de transcripción tiroideo..... | 4 |
| 3. Regulación endócrina del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo..... | 5 |
| 4. Modelo de acción del complejo TSH/TSH-R en el tirocito..... | 7 |
| 5. Esquema de la síntesis de las hormonas tiroideas en el tirocito..... | 9 |
| 6. Esquema de la regulación de la expresión génica por la TSH..... | 11 |
| 7. Esquema de la regulación del crecimiento de la tiroides..... | 13 |
| 8. Ciclos a la línea de base del transcrito RPL19 determinado por PCR en tiempo real en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo tiroideo contralateral..... | 29 |
| 9. Porcentaje de casos acorde al género en el grupo cáncer y grupo control..... | 30 |
| 10. Distribución porcentual de los casos según la edad en el grupo cáncer y control.... | 31 |
| 11. Nivel de expresión de los transcritos (normalizados por RPL19) de TSH-R, Tg, TPO y TTF-1 en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo contralateral..... | 33 |
| 12. Nivel de expresión de los transcritos (normalizados por RPL19) de PAX-8a, PAX-8g, IGF-1 y Er α en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo contralateral..... | 34 |

INDICE DE IMÁGENES

| | |
|---|----|
| 1. Estructura histológica de la tiroides..... | 3 |
| 2. Aspecto microscópico del carcinoma folicular y papilar..... | 18 |
| 3. Hemitiroidectomía canina realizada en el Hospital de la Facultad de Veterinaria... | 21 |

ABREVIATURAS

AMPC: AMP cíclico
CRE: Elemento de respuesta a cAMP
CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP
DIT: Diyodotironina
DUOX: Oxidasa dual
EGF: Factor de crecimiento epidérmico
HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos
TSH: Hormona estimulante del tiroides humana recombinante
IGF-1: Factor de crecimiento similar a insulina-1
IGF-1R: Receptor del factor de crecimiento similar a insulina-1
IRS-1: Sustrato del receptor de insulina-1
MAPK: Proteína kinasa activada por mitógenos
MIT: Monoyodotironina
NIS: Simportador o intercambiador Na⁺/I⁻
NUE: "NIS upstream enhancer"
PAX-8: "Paired box8"
PDE: Fosfodiesterasa
PDS: Pendrina
PI3K: Fosfatidilinositol 3'-kinasa
PKA: Proteína kinasa dependiente de cAMP
PKC: Proteína kinasa C
PLD: Fosfolipasa D
Proteína G: Proteína de unión a nucleótidos de guanina
p53: gen supresor de tumor
Raf: Homólogo del oncogén v-raf del virus del sarcoma murino
Rap: Proteína próxima a Ras
rT3: Triyodotironina reversa
TBG: Thyroid binding globulin
Tg: Tiroglobulina
TPO: Tiroperoxidasa
TSH: Hormona estimulante del tiroides
TSHR: Receptor de la hormona estimulante del tiroides
TTF-1: Factor de transcripción tiroideo-1
T3: Triyodotironina
T4: Tiroxina

1. RESUMEN

Esta tesis incluye dos estudios. El primero tuvo por objetivos conocer la casuística del cáncer en perros en general y estudiar factores asociados al mismo; así como también recabar información clínica y análisis colaterales del carcinoma tiroideo en particular. Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo tomando como base de datos el Hospital de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay en el período 2005-2010 para calcular la casuística del cáncer. En los carcinomas localizados en la zona ventral de cuello se registró además signos clínicos, análisis colaterales, resultado histopatológico y presencia de metástasis. Para el año 2010 se registró la edad, sexo y raza de todos los otros casos clínicos atendidos por el Hospital cuyos diagnósticos excluían el cáncer (Grupo control). La edad se categorizó en 3: 0 a 5 años (jóvenes), 6 a 10 años (mediana edad) y 11 a 20 años (gerontes). La casuística de cáncer en perros atendidos en el Hospital de Facultad de Veterinaria en el período 2005-2010 estuvo entre 0.11 y 0.15. El género afectó la frecuencia de aparición de cáncer, el odds ratio (razón de posibilidades) de que una hembra presente cáncer respecto al macho fue de 2.0. El efecto de la edad resultó un factor determinante en la presencia del cáncer: el odds ratio de que un perro de 6 a 10 años presente cáncer respecto de un perro joven (0 a 5 años) es de 8.1; valor que aumenta a 12.5 para animales gerontes (>10 años). La proporción de casos con cáncer respecto de otros casos clínicos no neoplásicos tendió a estar afectada por la raza, siendo la Bóxer la más afectada. El tipo de cáncer presente estuvo afectado por la edad, ya que si bien la mayoría de los cánceres fueron más frecuentes en animales de mediana a avanzada edad (> 5 años), los tumores venéreos transmisibles fueron más frecuentes en animales jóvenes, los óseos se distribuyeron equitativamente entre las 3 categorías etarias y los linfáticos fueron más frecuentes en animales jóvenes y gerontes.

En el segundo estudio se investigó la expresión de genes específicos de tiroides en la glándula sana, en la glándula carcinomatosa y en el lóbulo tiroideo contralateral (CL). Se determinaron los transcritos del receptor de tirotropina (*TSH-R*), tiroglobulina (*Tg*), tiroperoxidasa (*TPO*), factor de transcripción tiroideo 1 (*TTF-1*), gen pareado box 8 (*PAX-8*), factor de crecimiento similar a insulina 1 (*IGF-1*) y receptor de estrógeno alfa (*ER α*) por PCR en tiempo real en carcinomas caninos, en el CL y en glándulas tiroideas sanas. Las concentraciones de mRNA del *TSH-R*, *PAX-8*, *IGF-1* y *ER α* no fueron diferentes entre grupos. El grupo carcinoma tuvo un nivel de expresión de mRNA menor para *Tg* y *TPO* que el grupo sano y contralateral, no encontrándose diferencias entre estos dos últimos grupos; lo que sugiere que el tejido carcinomatoso tendría alterada la capacidad para sintetizar hormonas tiroideas. La expresión del *TTF-1* fue mayor en el grupo CL con respecto a las glándulas tiroideas sanas y carcinomatosas que no difirieron entre sí. Teniendo en cuenta que los resultados de los transcritos de *Tg* y *TPO* en la glándula carcinomatosa reflejan una actividad de síntesis de hormonas tiroideas alterada y que el *TTF-1* promueve la proliferación de los tirocitos, se puede sugerir que el aumento de este factor en el CL podría implicar un mecanismo compensatorio para mantener la condición de eutiroideo encontrada en la mayoría de los perros incluidos en el ensayo.

2. SUMMARY

This thesis includes two studies. The objectives of the first study were to determine the prevalence of cancer in dogs and to study the factors associated to it; besides it aimed to register clinical information and colateral studies of thyroid carcinoma. A retrospective study was performed using the data base of the Hospital of Veterinary Faculty, Montevideo, Uruguay during 2005-2010 to estimate prevalence. In the neoplasias in the ventral region of the neck, clinical data, colateral analysis, histopathological examinations and presence of metastasis were registered. In the year 2010, age, sex and breed of all clinical cases that were attended in the Hospital which diagnosis excluded cancer were also registered (Control Group). Age was assigned to 3 categories: 0 to 5 years (young), 6 to 10 years (middle age) y 11 to 20 years (old). Cancer prevalence in dogs in the Hospital from 2005 to 2010 ranged from 0.11 to 0.15. Sex affected the frequency of cancer, the odds ratio from a bitch to have cancer respect a male was 2.0. The effect of age was a determinant factor for the presence of cancer: the odds ratio of a dog of 6 to 10 years to present cancer respect a young dog (0 to 5 years) was 8.1; value that increased to 12.5 for old dogs (>10 years). The proportion of cases with cancer respect other clinical cases excluding cancer was affected by breed, being the Boxer the most affected. The type of cancer was affected by the age, even if most cancers were more frequent in medium to old dogs (> 5 years), transmissible veneral tumors were more frequent in young animals, the bone tumors were equally distributed in the 3 categories and lymphatics tumors were more frequent in young and old dogs.

In the second study, the expression of specific thyroid genes in the healthy gland, carcinoma gland and contralateral healthy lobule were investigated. Thyrotropin receptor (*TSH-R*), thyroglobulin (*Tg*), thyroperoxidase (*TPO*), thyroid specific transcription factor-1 (*TTF-1*), paired box 8 transcription factor (*PAX-8*), insulin like growth factor (*IGF-1*) and estrogen receptor alpha (*ER α*) transcripts were determined by real-time PCR in follicular carcinoma and contra-lateral (CL) lobes, and healthy thyroid canine glands. Concentrations of *TSH-R*, *PAX-8*, *IGF-1* and *ER α* mRNA were not different between groups. The carcinoma group had lower *Tg* and *TPO* mRNA than the healthy and CL groups, while no differences were found among these latter groups, suggesting that the carcinoma tissue has an altered capacity to synthesize thyroid hormones. The transcription factor that promotes thyrocytes proliferation, *TTF-1*, presented a greater mRNA expression in the CL group than in the other groups, which did not differ, suggesting that the CL lobe may function in a compensatory state to maintain the euthyroid state found in the majority of the dogs included in the study.

3. INTRODUCCIÓN

Los tumores son proliferaciones anormales de los tejidos que se inician de manera aparentemente espontánea, de crecimiento progresivo, sin capacidad de llegar a un límite definido, carente de finalidad y regulado por leyes propias más o menos independientes del organismo (Withrow y Vail, 2007). El cáncer es una de las causas de muerte más comunes en perros geriátricos, reportándose que un 45% de los perros que vivieron 10 años o más, murieron de cáncer (Bronson, 1982; Egenvall y col., 2000). Además de la edad, diferentes factores pueden predisponer a la aparición de cáncer. El sexo está asociado a la presencia de determinado tipo de cánceres; el cáncer de mama, el linfoma maligno y el de vejiga son más frecuentes en hembras y el tumor de glándulas perineales más frecuente en machos (Flores, 1986). Existen razas de alto riesgo frente a ciertos tumores; la raza Bóxer presenta predisposición a todo tipo de tumores (Withrow y Vail, 2007). Se deben considerar también factores como falta de pigmentación, el tamaño y el peso corporal que predispondrían a la aparición de determinadas neoplasias en caninos (Flores, 1986). Según Reif (2009) la comprensión de factores de riesgo para el cáncer es crítica para el desarrollo de estrategias dirigidas a la prevención del mismo.

Los tumores de tiroides representan solo el 1 a 2% de las neoplasias reportadas en perros (Brodey y Kelly, 1968; Birchard y Roesel, 1981; Harari y col., 1986). A pesar de esta baja incidencia, tienen gran trascendencia en endocrinología, ya que es la neoplasia maligna más común del sistema endocrino. Tanto en humanos como caninos, las estadísticas indican que su incidencia ha aumentado en particular en el último decenio y algunos países han llegado a quintuplicar el número de casos respecto a décadas precedentes (Instituto Nacional de Cáncer, 2004; Castillo 2010, comunicación personal). En perros, generalmente los carcinomas de tiroides son unilaterales, no funcionales y la mayoría de los perros se describen clínicamente como eutiroides (Liptak, 2007). La sintomatología de los perros con tumores incluye tos, disfagia, disfonía y disnea (Birchard y Roesel, 1981; Harari y col., 1986). Es frecuente que el único motivo de consulta sea la presencia de una masa en el área anatómica de la tiroides. El pronóstico del carcinoma tiroideo depende del tamaño, la agresividad del tumor y de la presencia de metástasis (Barber, 2007).

El avance del conocimiento respecto a las bases moleculares de la función tiroidea normal y carcinomatosa en humanos en los últimos años ha sido relevante (Pisarev y Juvenal 2010). En humanos, los carcinomas diferenciados retienen en parte las características biológicas de las células tiroideas normales (Rossella y col., 1994). De forma similar, en los perros, la unión de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en los carcinomas de tiroides no difirió de la observada en el tejido tiroideo normal (Verschuere y col., 1992), y los autores sugirieron que la TSH puede continuar actuando como un factor de crecimiento del tumor. Varios factores mitogénicos se han vinculado al crecimiento y diferenciación tumoral en humanos (Deleu y col., 1999; Manole y col., 2001; Francis-Lang y col., 1992; Zannini y col., 1992), siendo la información en caninos muy escasa.

4. ANTECEDENTES

4..I. LA GLÁNDULA TIROIDEA

4.I.1. ANATOMÍA

La glándula tiroidea recibe este nombre por su similitud con un escudo (del griego *thyreos*: escudo), ya que se pensaba constituía un auténtico escudo para la laringe, de la misma forma que lo constituye el cartílago tiroides (Cian y col., 2004). Es una glándula endocrina típica de los vertebrados que, en el perro constituye la mayor de las glándulas de secreción interna. Es un órgano de origen endodérmico impar y simétrico, formado por dos lóbulos definidos, ubicados en sentido lateral y algo en ventral respecto del quinto al octavo anillo traqueal (Scavelli y Peterson, 1992). A diferencia que en el hombre, el istmo que conecta ambos lóbulos es indefinido en perros adultos, siendo a veces la excepción razas grandes o braquicéfalas (Venzke, 1982; Belshaw, 1989). El tamaño es variable, en perros adultos cada lóbulo tiene aproximadamente 5 cm de largo y 1,5 cm de ancho (Evans, 1993; Scavelli y Peterson, 1992) y el volumen tiroideo oscila entre 0,2 a 1,5 cm³ según el tamaño del animal (Peterson y Ferguson, 1992). Los lóbulos son proporcionalmente más grandes en perros inmaduros y razas braquicéfalas.

La tiroides es una glándula hipervascularizada y la mayor parte de su irrigación está dada por dos vasos: la arteria tiroidea anterior que proviene de una rama de la carótida común y la arteria tiroidea posterior que tiene origen en la arteria cefálica. El drenaje venoso de la tiroides se realiza con las venas tiroideas anterior y posterior, en los correspondientes polos de cada lóbulo. La inervación de la glándula tiroides es de dos tipos, simpática (nervio simpático cervical) y parasimpática (nervio laríngeo superior y laríngeo recurrente, ambos procedentes del nervio vago). Estas estructuras deben ser respetadas al momento de realizar una hemitiroidectomía o tiroidectomía total, de lo contrario aparecerán complicaciones post quirúrgicas como parálisis facial y ronquera permanente.

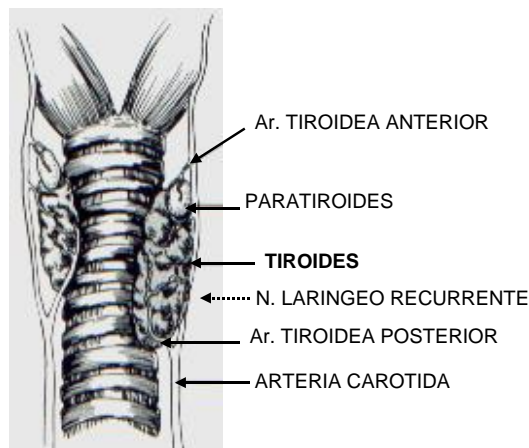


Figura 1. Anatomía de la glándula tiroides del perro (tomado de Graves y col., 1994).

El tejido tiroideo ectópico se presenta en muchos perros y gatos, éste puede residir en cualquier punto desde la base de la lengua hasta la base cardíaca, ya que guarda relación

con el desarrollo de la tiroides en la etapa embrionaria (Belshaw, 1989; Peterson y Ferguson, 1992) (ver sección Embriología de la tiroides en esta tesis). El tejido ectópico es significativo, por cuanto la tiroidectomía quirúrgica no lo eliminará, lo cual lleva a su hiperplasia y finalmente reaparición del funcionamiento glandular (Belshaw, 1989; Dellmann, 1984).

4.1.2. HISTOLOGÍA

Desde el punto de vista histológico la glándula está formada por la agrupación de folículos, cuya estructura es única entre las glándulas endócrinas. El folículo es la unidad funcional, tiene una apariencia más o menos esférica con una cavidad central, normalmente ocupada por una sustancia coloide y rodeada de una monocapa de células epiteliales cuboides, de 15-150 μm de diámetro, el tirocito (Mayayo y col., 2000) (Imagen 1). Cuando las células están en reposo tienen una apariencia plana, cuando están estimuladas aumentan en altura, tomando una apariencia columnar y disminuye el volumen ocupado por el coloide. La célula folicular tiroidea mantiene además un potencial propio tanto de crecimiento como de función, por lo que diversos folículos pueden responder de forma distinta ante un mismo estímulo, pudiéndose encontrar en una misma glándula folículos en muy diversos estados de estimulación.

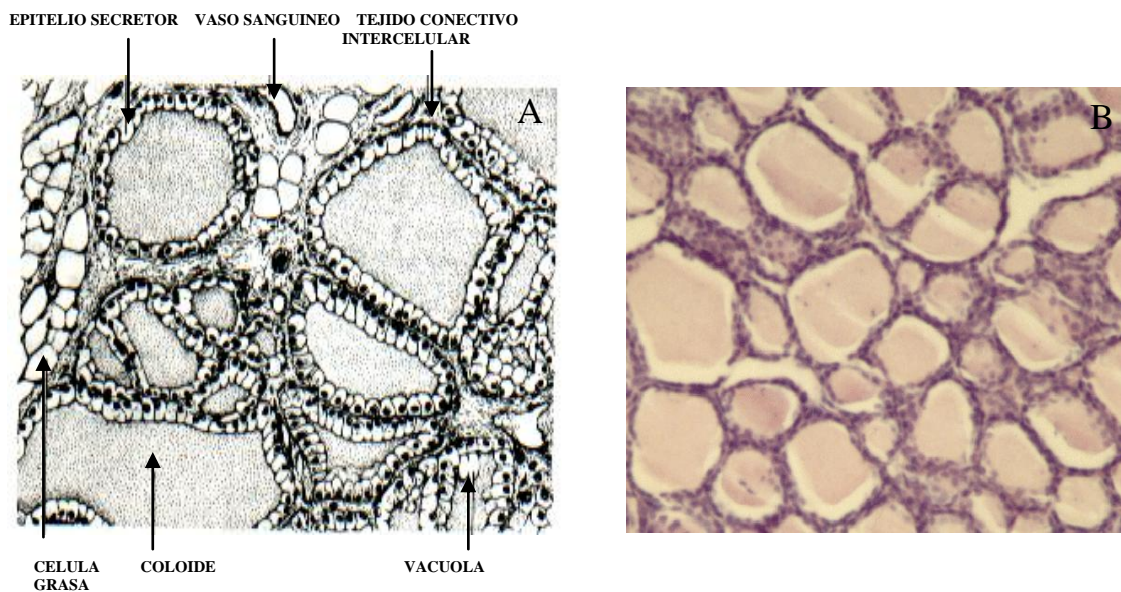


Imagen 1. Estructura histológica de la tiroides. En A se muestra esquematizada la estructura de la glándula (Cunningham; Fisiología Veterinaria). En B se observa un corte histológico de una tiroides de perro normal (100x, tinción hematoxilina-eosina).

La cara del tirocito en contacto con el coloide o cara apical está constituida por una membrana festoneada de microvellosidades. La cara opuesta o basal está orientada hacia el exterior del folículo y esta delimitada por una membrana basal gruesa en contacto con los capilares sanguíneos fenestrados. Las caras celulares laterales están unidas por desmosomas a las caras laterales de otros tirocitos. En los folículos se produce la síntesis de las hormonas T4 (tiroxina), T3 (3,5,3'-triyodotironina) y rT3 (T3 reversa),

(biológicamente inactiva) (Pocock y Richards, 2005). Entre los folículos encontramos también otro tipo de células, las parafoliculares o células C, en donde se produce la calcitonina. El coloide constituye el reservorio de la proteína específica de la célula epitelial tiroidea, la Tiroglobulina (Tg).

4.1.3. EMBRIOLOGÍA DE LA GLÁNDULA TIROIDES

La tiroides es la primer glándula endócrina que aparece en el desarrollo embrionario de los mamíferos (Mansberger y Wei, 1993). El origen de esta glándula es endodérmico y se forma como un apéndice en la cuarta y quinta bolsas faríngeas. En otras especies incluye también el cuerpo ultimobranquial del que derivan las células C o parafoliculares y las glándulas paratiroides. El primordio tiroideo migra hacia abajo hasta alcanzar su destino final a ambos lados de la tráquea. El desarrollo de la tiroides empieza por un engrosamiento medio en el suelo de la faringe primitiva que acaba siendo un divertículo que se expande caudalmente. Las células tiroideas están al final del divertículo o conducto tirogloso. Luego la glándula se torna bilobulada, va creciendo y descendiendo, el conducto tirogloso adelgaza, se elonga y degenera. Después de fracturarse el tirogloso, la tiroides alcanza su localización anatómica definitiva.

Las células tiroideas se van diferenciando y comienzan a expresarse los genes que son esenciales para la síntesis de hormonas tiroideas: TSH-R, Tg, TPO, NIS. Desde el punto de vista molecular, se han descrito 3 genes que codifican para proteínas que regulan la normal morfogénesis y migración de la tiroides embrionaria: TTF-1, TTF-2 y PAX-8. Se propone que TTF-1 y PAX-8 tienen un papel importante en la determinación del tipo celular tiroideo y en la vida del tirocito (Zanini y col., 1992; Javaux y col., 1992) (ver Regulación de la expresión génica en esta tesis). El TTF-2 actúa regulando la migración de la tiroides. Posteriormente se expresa el receptor de TSH (R-TSH) y por último la Tg, TPO y NIS, tal como se muestra en la Figura 2.

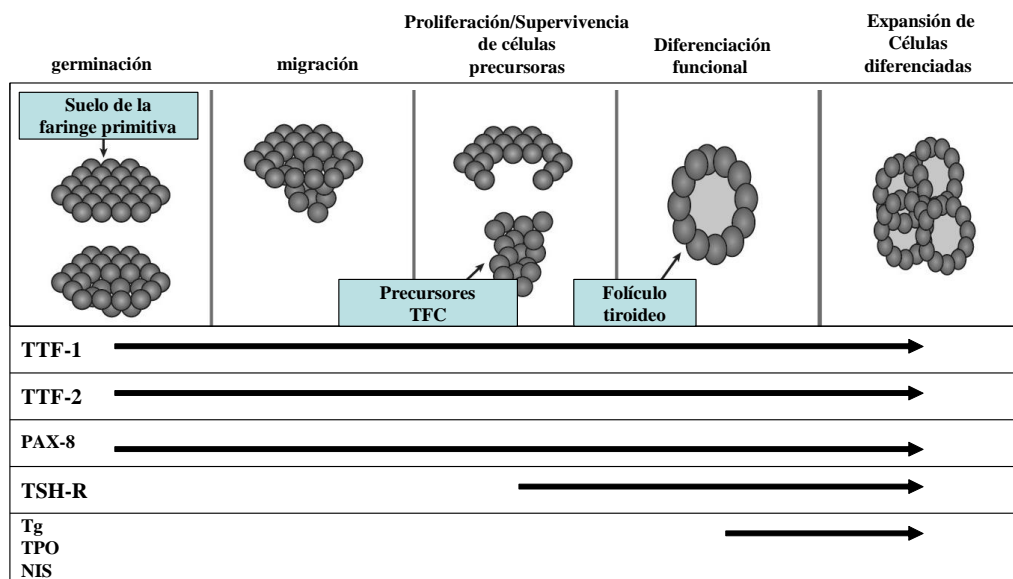


Figura 2. Representación de las fases iniciales del desarrollo de la tiroides y el tiempo de expresión de los factores de transcripción tiroideo. (Modificado de Pilar Santisteban)

en Mecanismos moleculares implicados en la función tiroidea: control de procesos fisiológicos y alteraciones patológicas, 2006).

4.1.4. REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN TIROIDEA

La función tiroidea está finamente regulada fundamentalmente por la hormona estimulante de la tiroides (TSH), secretada por la hipófisis, que se encuentra a su vez bajo el control hipotalámico (Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides) (Figura 3)

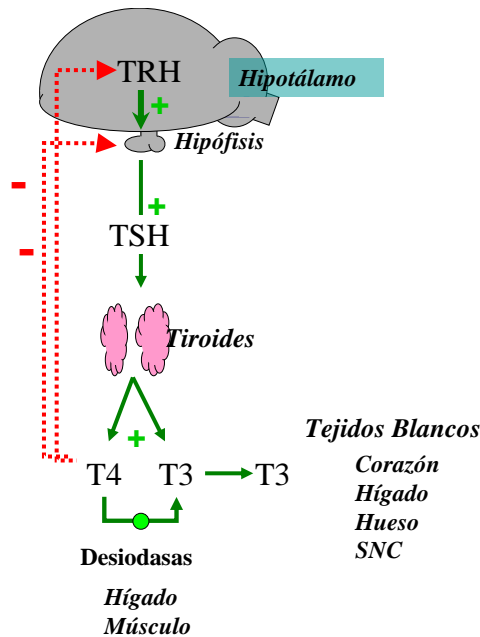


Figura 3. Regulación endócrina del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo.

La **TRH**, hormona liberadora de tirotrópica, sintetizada en el hipotálamo en las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventriculares, es quien regula a la TSH. El TRH es un tripéptido compuesto por histidina, glutamina y prolina. La producción y liberación hipotalámica de TRH está controlada por rutas neurales desde centros cerebrales superiores (Chastain y Ganjman, 1990). Una vez producido es llevado por el sistema porta-hipofisario hasta las células de la adenohipófisis donde interactúa con su receptor de membrana. El TRH -a través de la cascada Ca^{++} /fosfatidil-inositol- tiene dos acciones principales sobre las células tirotrópicas, por un lado produce la liberación al torrente sanguíneo de la TSH ya sintetizada y almacenada en los gránulos de secreción, pero a su vez activa la síntesis de TSH.

La **TSH**, segregada por la hipófisis, en las células tirotrópicas adenohipofisarias, es una glucoproteína con un peso molecular de 28000 D que contiene un 10% de carbohidratos en su molécula. Está compuesta de dos cadenas, α y β , que deben estar unidas para que la molécula tenga actividad biológica. La cadena α es idéntica a la cadena α de otras trofinas hipofisarias (LH, FSH), en tanto que la cadena β es la que confiere especificidad funcional, ya que es la que es reconocida por su receptor en la membrana del tirocito. Ambas son sintetizadas en forma independiente por sus respectivos ARNm (Pierce y Parson, 1981; Shupnik y col., 1989). En condiciones fisiológicas la síntesis de

la cadena α se produce en exceso respecto a la β , cuya biosíntesis es el factor limitante para la producción de hormona nativa (Pierce y Parson, 1981; Thorner y col., 1998). Una vez sintetizada la TSH es almacenada en los gránulos secretorios y liberada a la circulación por acción de la TRH como se mencionó anteriormente. La vida media sérica de la TSH es relativamente corta, aproximadamente 10 a 15 minutos. La interacción de la TSH con su receptor localizado en la membrana basal del tirocito, (ver Fisiología de la tiroides), aumenta la síntesis de las hormonas tiroideas (T4 y T3) en los folículos, puesto que participa en todos los pasos biosintéticos además de estimular la liberación de T4 y T3 hacia la circulación sistémica.

Una vez en el suero, las **hormonas tiroideas** se unen a proteínas de transporte, como la globulina ligadora de hormona tiroidea, albúmina y prealbúmina ligadora tiroidea. Solo una pequeña cantidad de la hormona permanece libre, sin ligar; esta fracción es la biológicamente activa y se encuentra disponible para actuar a nivel tisular (Kaptein y col., 1994). Aproximadamente el 0.1% de la T4 y el 1% de la T3 se encuentran libres en suero (Scavelli y Peterson, 1992; Kaptein y col., 1994). Toda la T4 normalmente es elaborada en la tiroides, mientras que la mayor parte de la T3 se forma mediante la desyodinación extratiroidea de la T4, en los tejidos periféricos (hígado, músculo, riñones) por la acción de la enzima desyodasa tipo I.

Los niveles circulantes de T4 y T3 regulan la secreción tanto de TRH como de TSH a través de una retroalimentación negativa (Figura 3). La molécula efectora de dicha retroalimentación negativa es la T3 y aunque ésta puede entrar directamente desde el plasma a la célula tirotrófica, tiene más importancia aquella generada localmente, dentro de hipófisis, por la monodesyodación de la T4 por acción de la enzima desyodasa tipo II. A nivel de la pituitaria, la T3 inhibe la liberación de TSH inducida por TRH y la expresión de los genes de TSH α y β (Dieguéz y Aguilar, 1997). A nivel hipotalámico existen receptores para T3 y esta hormona inhibe la expresión del gen de TRH así como su síntesis. La T3 reduce aún más la liberación de TSH al disminuir el número de receptores de TRH. La T4 puede también sufrir desactivación a través de otra enzima, desyodasa tipo III, presente en cerebro, placenta y vasos sanguíneos que la convierte en T3 reversa (T3r), inactiva biológicamente. La proporción de conversión de T4 a T3 o T3r depende del estado metabólico del organismo (Engler y Burger, 1984; Larsen y Berry, 1994)).

La secreción de TSH está regulada también por catecolaminas, sobre todo por dopamina. La dopamina actúa directamente sobre las células tirotrópicas a través de receptores D2 inhibiendo la secreción y probablemente la síntesis de TSH. Se ha discutido también que la TSH puede ser inhibida por la somatostatina hipotalámica (Arce, 2006)

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

4.1.5. FISIOLOGÍA DE LA TIROIDES

Como en el presente trabajo de tesis se estudia la expresión génica de proteínas que participan en la biosíntesis de las hormonas tiroideas, en la siguiente sección se describen los pasos más relevantes y conocidos de la síntesis de las hormonas tiroideas, haciendo énfasis además en el rol del complejo TSH – TSH-R en el control de la expresión génica y crecimiento tiroideo.

4.1.5.1. Unión de la TSH a su receptor en el tirocito

La TSH controla la función y el crecimiento de la tiroides a través de su unión al receptor específico (TSH-R) en la superficie celular y regulando los niveles intracelulares de un segundo mensajero, el AMPc (Rivolta y col., 2005). El TSH-R es una cadena glicoproteica de 744 aminoácidos localizada en la membrana basolateral de la célula tiroidea; tiene siete dominios transmembrana, una larga porción aminoterminal que es extracelular y otra más corta citoplasmática. El TSH-R es miembro de una superfamilia de receptores acoplados a la proteína Gs (Parmentier y col., 1989).

La unión de la TSH al receptor en la membrana Figura 4, (1) promueve un cambio conformacional en el dominio intracelular del receptor que afecta su interacción con una proteína Gs estimuladora heterotrimérica (trímero de proteínas **Gs α** , Gs β , Gs γ) que une GTP, en la cara citosólica de la membrana plasmática (2). Es sabido que cuando GTP está unido a **Gs α** , ésta se desplaza en el plano de la membrana desde el receptor a una molécula cercana de adenilciclase (3). La adenilciclase estimulada provoca un aumento del AMPc (4) que a su vez activa múltiples vías de señalización, -siendo la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) su principal efector- (5) que regulan la proliferación, la diferenciación y la función de la tiroides (Medina y Santisteban, 2000; Kimura y col., 2001).

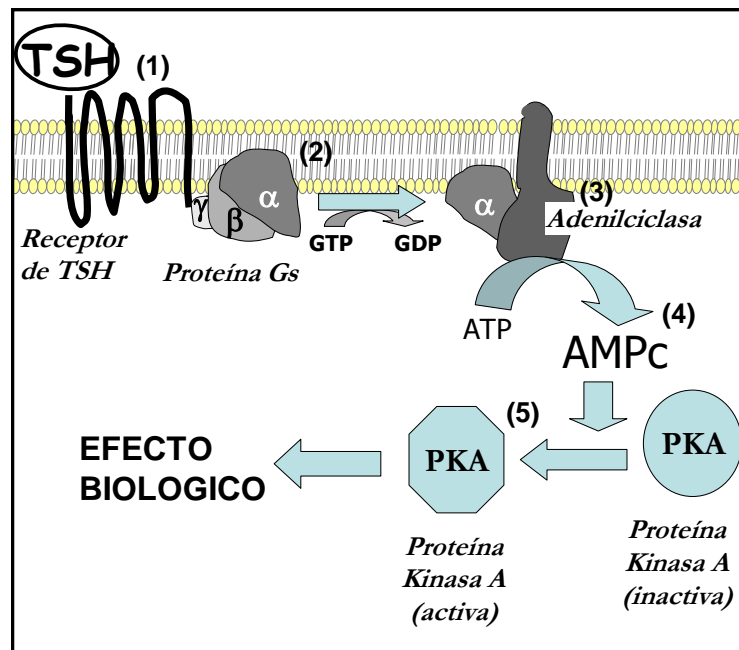


Figura 4. Modelo de acción del complejo TSH-RTSH en el tirocito.

La activación de PKA en células tiroideas es necesaria (Kimura y col., 2001), pero no es suficiente (Dremier y col., 1997) para reproducir los efectos del AMPc. En este sentido

se han descrito nuevas dianas que se activan en respuesta a AMPc (factores de intercambio de GTP activados por AMPc, que funciona acelerando el intercambio de GDP por GTP y activan a GTPasas como Raf y Ras (Dremier y col., 2000). La activación de Ras es particularmente importante, ya que puede activar importantes rutas de señalización como la de la fosfatidilinositol 3'-kinasa (PI3K) (Cass y Mienkoth, 2000), y se ha demostrado que la activación de Ras es necesaria para la mitogénesis de las células tiroideas inducidas por TSH (al-Alawi y col., 1995). La TSH también activa algunas fosfodiesterasas que proporcionan un mecanismo de regulación negativa para la finalización de la señal del AMPc (MacKenzie y col., 2002). Dada la enorme variedad de efectores del AMPc, esta compleja ruta de señalización necesitará de numerosos estudios para ser entendida en detalle.

4.1.5.2. Control de la secreción de las hormonas tiroideas por la TSH

La biosíntesis de las hormonas tiroideas (T3 y T4) se realiza sobre una proteína estructural que es la tiroglobulina (Tg) con la intervención de una enzima microsomal, la tiroperoxidasa (TPO) y en presencia de una fuente de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en la interfase célula-coloide (Medeiros-Neto y col., 2002). En el proceso de biosíntesis de hormonas tiroideas el yodo es un oligoelemento esencial. La principal fuente de yodo proviene de los alimentos y del agua, constituyendo éste el factor limitante para la síntesis hormonal en condiciones fisiológicas. Los requerimientos diarios de yodo en el perro oscilan alrededor de 100-150µg/día (Belshaw, 1989; Edney, 1992). El yodo (I) ingerido en la dieta alcanza la circulación en forma de yoduro (I⁻) y se absorbe como tal en el tracto gastrointestinal.

En la Figura 5, se esquematizan los pasos secuenciales más relevantes de la síntesis de las hormonas tiroideas. El yoduro ingresa al citoplasma celular a través del transportador Na⁺/I⁻ Symporter (NIS) ubicado en la membrana basolateral del tirocito (1) y un segundo transportador ubicado en la membrana apical y denominado pendrina (PDS), lleva el yoduro hacia la interfase célula-coloide. El yoduro para alcanzar su forma activa debe ser oxidado; este proceso es catalizado por una enzima, la tiroperoxidasa (TPO) (2). La TPO es una hemoproteína glicosilada específica de la tiroides, ubicada en la membrana apical del tirocito donde cataliza la unión del yoduro activo a los residuos tirosílicos de la tiroglobulina (Tg) (3).

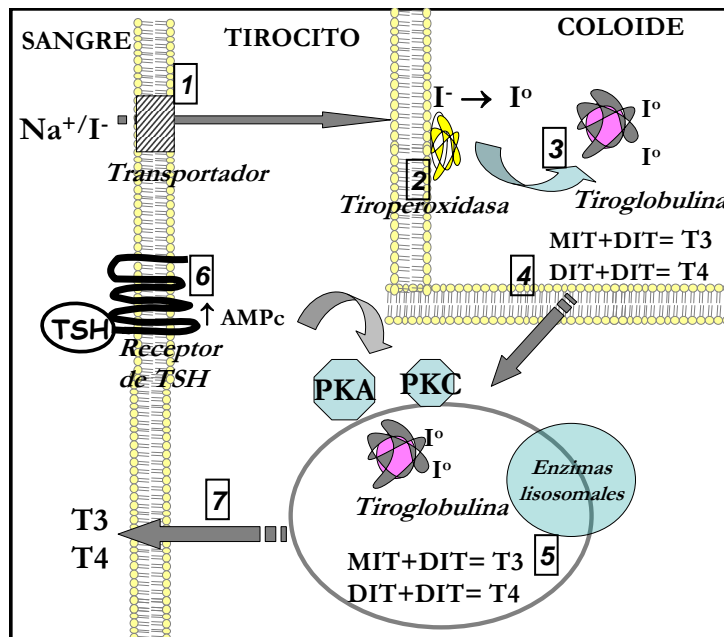


Figura 5. Esquema de la síntesis de las hormonas tiroideas en el tirocito.

La Tg, precursor de las hormonas tiroideas, es una glicoproteína homodimérica de 660 kDa. El anillo tirosílico de la Tg puede incorporar una molécula de yoduro dando lugar a la monoyodotirosina (MIT) o dos moléculas de yoduro formando diyodotirosina (DIT). Si se acoplan dos residuos DIT o un DIT y un MIT tiene lugar la formación de T4 y T3 respectivamente, quedando incorporados a la molécula de Tg (4). Esta reacción de acoplamiento así como la incorporación de yoduro son catalizadas por la enzima TPO. En todo este proceso se requiere además una fuente de H_2O_2 , aportada por enzimas tiroideas localizadas en la membrana apical del tirocito (NADPH oxidasas (De Deken y col., 2000; Morand y col., 2004)). La Tg más antigua se localiza en la zona central del lumen y en la zona próxima al borde apical la yodada más recientemente. Cuando el tirocito es estimulado por la TSH (por aumento de los requerimientos orgánicos) aparecen pseudópodos en la membrana apical que engloban pequeñas porciones de coloide del lumen folicular y esas gotas de coloide entran al citoplasma por un proceso de endocitosis. Una vez en el citoplasma los lisosomas migran hacia esas gotas de coloide, se fusionan y las proteasas lisosomales van hidrolizando la Tg yodada hasta la liberación de todos sus aminoácidos, incluidos los yodados, las yodotirosinas MIT y DIT y las yodotironinas T4 y T3 (5). La TSH a través de la unión con su receptor y el aumento del AMPc (6) es responsable de estimular todos los procesos mencionados anteriormente: aumenta la captación de yodo y la síntesis de Tg, su yodación y la reacción de acoplamiento, la endocitosis de la Tg yodada y su proteólisis con liberación de las hormonas tiroideas en forma de yodoaminoácidos libres. Finalmente las hormonas tiroideas pasan a la circulación y actúan en los tejidos blanco (7).

Las acciones de las hormonas tiroideas en el organismo son múltiples y ejercen complejos e importantes efectos sobre el metabolismo de proteínas (efecto anabólico), lípidos (efecto lipolítico, estimulan la β -oxidación de los ácidos grasos, lo que contribuye a su efecto termogénico) e hidratos de carbono (aumentan la absorción intestinal de glucosa, estimulan la glucogenolisis y la glucogenogénesis hepática). Las hormonas tiroideas tienen un rol decisivo en el desarrollo fetal, particularmente de los sistemas neurológico y esquelético (Arce, 2006). Tienen además marcados efectos

cronotrópicos e inotrópicos sobre el corazón; son necesarias para la estimulación hipóxica e hipercapnica normal de los centros respiratorios; estimulan la eritropoyesis; y promueven el recambio óseo aumentando la resorción esquelética. En esencia, ningún tejido u órgano escapa a los efectos del exceso o insuficiencia de hormona tiroidea (Coates, 1997).

4.1.5.3. Regulación de la expresión génica por la TSH

La TSH no solo controla la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas por medio de acciones no genómicas, sino que también afecta la expresión génica. Como es bien sabido, solamente en la tiroides se sintetizan las hormonas tiroideas y esto es debido a que en esta glándula se expresan específicamente proteínas esenciales para su síntesis: NIS, Tg, TPO y TSH-R (ver revisión Pilar Santisteban, 2006). Se ha demostrado en distintas especies que estas proteínas solo se expresan en tejido tiroideo, con excepción del NIS y TSH-R que también lo hacen en otros tejidos, como lo son los ovarios y el páncreas.

La regulación de la expresión génica puede tener lugar a diferentes niveles siendo el control transcripcional uno de los más estudiados. Ese control depende de secuencias específicas de ADN localizadas generalmente en el extremo 5' flanqueante de los genes delante del sitio de inicio de la transcripción. A estas secuencias de ADN se unen proteínas nucleares específicas denominadas factores de transcripción. La transcripción de un gen además de ser tejido específica está regulada por estímulos externos como hormonas, factores de crecimiento, etc. (Lehninger, 2000) (ver Regulación del crecimiento de la tiroides en esta tesis).

El complejo TSH/TSH-R tras provocar el aumento de AMPc intracelular, activa la PKA, la cual es responsable de activar factores de transcripción tras la fosforilación de los mismos. La vía clásica es la activación del factor CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP), que promueve la expresión de genes implicados en la diferenciación y proliferación celular tiroidea. La PKA fosforila a CREB en el residuo de Ser133 y lo activa para estimular la transcripción de multitud de genes de respuesta a AMPc, mediante su unión a las secuencias CRE presentes en sus promotores (Alberts y col., 1994). De esta forma se cree que se regula la expresión únicamente del TSH-R, no se han descrito elementos CRE para los genes tiroideos como Tg, TPO y NIS (Pilar Santisteban, 2006).

Aunque se desconoce el mecanismo, ha sido claramente demostrado es que la TSH regula los niveles de ARNm de algunos genes específicos de la tiroides como Tg y TPO (Mitchell y Tjian, 1989; Gerard y col., 1989b; Zarrilli y col., 1990), ver Figura 6. La participación de factores de transcripción que se unen a regiones promotoras de los genes de Tg y TPO es considerada como el factor principal para regular la expresión de estos genes (Mitchell y Tjian, 1989). No hemos encontrado información que explique como una vez activado el TSH-R, con el consecuente aumento de AMPc, se produce la activación de factores de transcripción que estimulen la expresión de Tg y TPO. Más aún, en perros la información respecto a la regulación de la expresión génica mediada por TSH es casi inexistente. En los seres humanos, dos factores de transcripción que tienen un rol clave en la morfogénesis tiroidea (ver sección Embriología), el TTF-1 y PAX-8 se unen a la secuencia de los promotores de Tg y TPO y son capaces de activar la transcripción de estos genes (Francis-Lang y col., 1992; Zannini y col., 1992). Los

factores de transcripción TTF-1 y PAX-8 tienen una función destacada sobre el control de la diferenciación celular tiroidea. Se ha demostrado que PAX-8 es necesario tanto para la morfogénesis de la glándula tiroidea como para el mantenimiento del fenotipo celular tiroideo. Distintos trabajos han mostrado evidencias de la importancia de PAX-8 en el mantenimiento de la diferenciación tiroidea: activa la expresión de todos los genes marcadores de diferenciación tiroidea excepto del TSH-R (Ohno, 1999; Zanini, 1992). Además se ha descrito la interacción física y funcional entre PAX-8 y TTF-1 *in vivo*, mediante la cual ambos factores aumentan sinérgicamente la transcripción de Tg y TPO en la glándula tiroidea en humanos (Katoh y col., 2000; Espinoza y col., 2001; Di Palma, 2003).

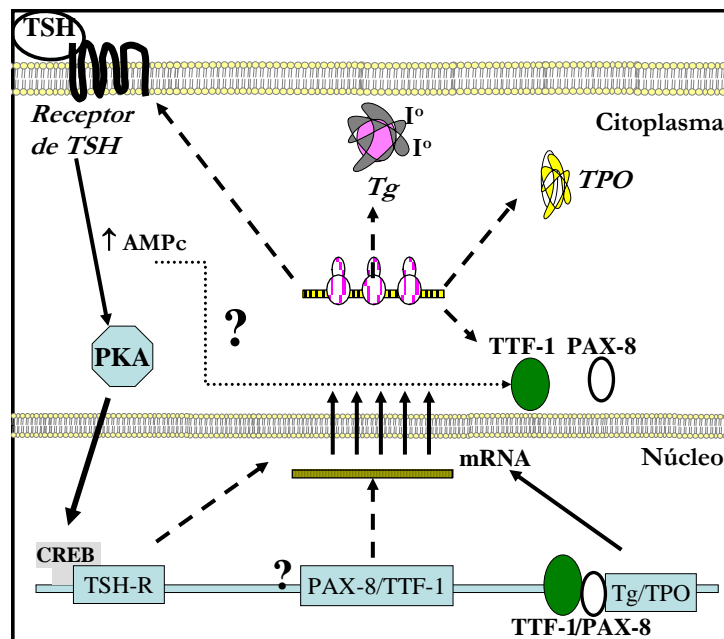


Figura 6. Esquema de la regulación de la expresión génica por la TSH

Estos factores de transcripción tiroideos, PAX-8 y TTF-1, se unen no solo en regiones promotoras sino también en regiones más distantes del sitio de inicio de la transcripción. El factor de transcripción PAX-8 pertenece a una familia de genes con dominio de unión al ADN denominado paired-box. Se identificó inicialmente en riñón pero se vio que su función es crucial en tiroides, siendo responsable de la formación de los folículos tiroideos. El TTF-1 pertenece a una familia de factores de transcripción con un dominio de unión al DNA (homeodominio o gen homeobox). Inicialmente se identificó como específico de tiroides pero se vio luego que estaba también en pulmón e hipófisis. Se ha definido a TTF-1 como responsable de la especificación tiroidea, expresándose tanto en células foliculares como parafoliculares.

4.1.5.4. Regulación del crecimiento de la tiroides

El ciclo celular comprende diferentes etapas y en cada una de ellas intervienen una serie de ciclinas que condicionan el avance del mismo hasta culminar con la división y generación de dos células hijas (Pisarev y Juvenal, 2010). La síntesis de ciclinas están reguladas por señales extracelulares tales como los factores de crecimiento y citoquinas

(inductores de la división celular). Los factores de crecimiento además de desencadenar la fosforilación de factores de transcripción vinculados a la mitosis celular, promueven su síntesis. Estas proteínas nucleares promueven la síntesis de un conjunto de productos génicos, incluidas las ciclinas y varias enzimas esenciales en la síntesis de DNA, lo que permite a las células entrar en la fase S (Lehninger, 2000).

Además de los factores propios del ciclo celular existen otros factores capaces de regular la proliferación. La Tabla 1 resume dichos factores (Pisarev y Juvenal, 2010). La mayor parte de estos factores actúan en numerosos tejidos, este es el caso de IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo-1), TGF- β (factor de crecimiento transformador β), EGF (factor de crecimiento epidérmico), otros como la TSH y el yodo son específicos de la tiroides.

Tabla 1. Regulación del crecimiento de la tiroides. Se resumen los factores más relevantes que afectan la mitosis del tirocito y otras funciones diferenciadas de la tiroides (Modificada de Pisarev y Juvenal, 2010).

| Factor | Proliferación | Funciones diferenciadas |
|-------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| TSH vía AMPc | estimula | estimula |
| TSH vía PKC | estimula | inhibe |
| EGF | estimula | inhibe |
| IGF-1 | estimula | estimula |
| TGF-β | inhibe | inhibe |
| Exceso de yodo | inhibe | inhibe |
| Catecolaminas | inhibe | inhibe |

La TSH vía AMPc promueve el crecimiento del tirocito directamente a través de la unión a su receptor e indirectamente estimulando la secreción de factores de crecimiento o de receptores de factores de crecimiento. A pesar del papel central del AMPc en la regulación de los procesos biológicos de las células tiroideas, la cooperación con otras vías de señalización es necesaria para que los tirocitos desarrollen una actividad mitogénica completa en respuesta a TSH (Kimura, 2001; Medina, 2000a). En este sentido, la PI3K tiene una función destacada en el control de la proliferación y de la diferenciación tiroidea. Se ha reportado que el tratamiento con inhibidores de PI3K provoca la parada del ciclo celular en la fase G1 de células tiroideas de rata estimuladas con TSH (Cass, 2000; Medina, 2000b).

Esta vía de señalización es activada en células tiroideas por varios factores de crecimiento tales como la insulina/IGF-1, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Kimura, 2001). El más importante en el metabolismo tiroideo es el IGF-1. Los efectos biológicos de la insulina y del IGF-1 son medidos por la activación de sus receptores de membrana con actividad tirosina kinasa,

(Figura 7). La unión de sus respectivos ligandos induce su dimerización y autofosforilación en residuos específicos de tirosina (Tyr), seguida de la fosforilación de residuos serina (Ser) presentes en el dominio C-terminal. Esta serie de fosforilaciones permite la unión de moléculas adaptadoras, como por ejemplo el sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1), que comunican al receptor con diversas rutas de señalización implicadas en procesos como el crecimiento, la transformación, la diferenciación o la supervivencia (Baserga, 1997; Pollak, 2004). La mayoría de los efectos de la insulina/IGF-1 son mediados por la PI3K que es atraída a las inmediaciones de la membrana plasmática tras la fosforilación del IRS-1 por el receptor activado.

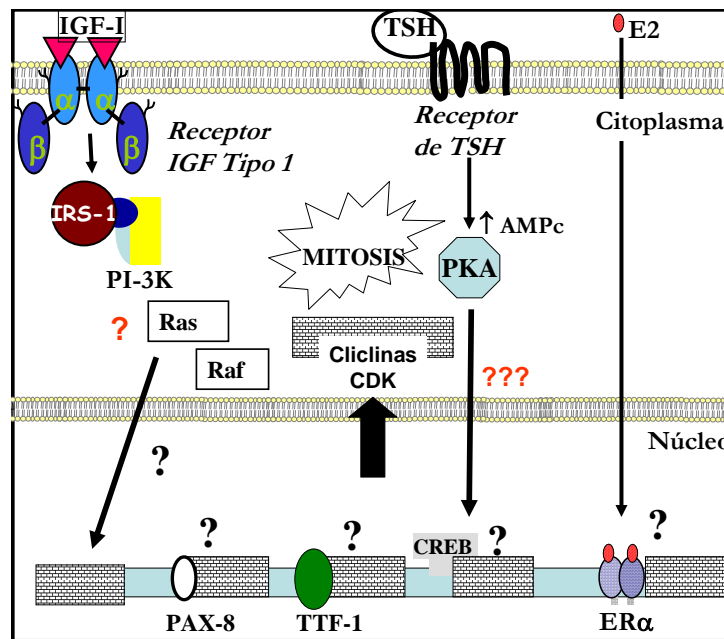


Figura 7. Esquema de la Regulación del crecimiento de la tiroides

En células tiroideas caninas el IGF-1 permite el efecto mitogénico de la TSH y estimula por sí mismo la síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Deleu y col., 1999). La insulina actúa a través del receptor de IGF-1, siendo por tanto este factor el funcional. La insulina y el IGF-1 cooperan con la TSH en la regulación de la expresión de los genes marcadores de diferenciación tiroidea. Se ha demostrado que tanto insulina como IGF-1 estimulan la expresión de mRNA de Tg y TPO. La transcripción del TSH-R también es inducida por el tratamiento con insulina/IGF-1. Sin embargo, y al contrario del resto de los genes marcadores de la diferenciación tiroidea, la transcripción de NIS inducida por la TSH, es inhibida por el IGF-1 (García y Santisteban, 2002).

Por otro lado como se mencionó anteriormente, la activación del factor CREB- a través de la PKA- estimula la expresión de genes implicados en la diferenciación y proliferación celular tiroidea. Otro potente factor mitogénico en tiroides es el receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$), (Manole y col., 2001). Se ha propuesto que los estrógenos activan la vía de PI3K (Antico Arciuch y col., 2010). Además se ha demostrado en otros tejidos que el IGF-1 estimula la función del $ER\alpha$ de una forma que es independiente al ligando (Flint y col., 2002), por lo que se puede pensar en una conversación entre ambas vías de señalización.

En resumen, la TSH es considerada el principal regulador de la diferenciación y la proliferación del tirocito (Rivas y Santisteban, 2003). Se ha propuesto que en tejido tiroideo no funcional (en términos de síntesis de hormonas tiroideas) se mantiene el efecto mitogénico de la TSH - ya que el receptor de TSH se mantiene funcional - (Verschueren y col., 1992a) y por lo tanto ésta podría ser la causante de la hiperplasia glandular y consecuente desarrollo del cáncer. Es por esta razón que varios autores sugirieron que la TSH puede continuar actuando como un factor de crecimiento tumoral (Verschueren y col., 1992)

4.II. CÁNCER EN CANINOS

Los tumores o neoplasias son proliferaciones anormales de los tejidos que se inician de manera aparentemente espontánea, de crecimiento progresivo, sin capacidad de llegar a un límite definido, carente de finalidad y regulado por leyes propias más o menos independientes del organismo (Withrow y Vail, 2007). Las neoplasias pueden desarrollarse a partir de cualquier sitio anatómico y tejido del cuerpo y pueden comprometer cualquier tipo de célula (Schreiderman y Levin, 1980).

Desde el punto de vista epidemiológico el cáncer no puede considerarse como una simple enfermedad, sino más bien como una familia de desórdenes relacionados con ciertas características biológicas comunes, a saber: una población de células transformadas, con crecimiento relativamente incontrolado, invasión de tejidos normales adyacentes y diseminación a otras partes del organismo. El cáncer es una enfermedad de origen genético; se han identificado en humanos varios cientos de genes que pueden actuar como oncogenes o genes supresores de tumores (Vogelstein y Kinzler, 2004). La predisposición genética del cáncer está modulada claramente por factores hereditarios, como lo demuestra la existencia de síndromes tumorales hereditarios bien definidos (Fearon, 1997). En perros se ha descrito al menos un síndrome de cáncer hereditario, el carcinoma renal y la dermatofibrosis nodular del Pastor Alemán (Lingaas y col., 2003).

El cáncer es una de las causas de muerte más comunes en perros geriátricos y desafortunadamente la casuística sigue aumentando. Hay estudios que revelan que un 45% de los perros que vivieron 10 años o más, murieron de cáncer (Bronson, 1982).

El riesgo de morbilidad debido a neoplasias en caninos es de un 2,1 % (Egenvall y col., 2000). En nuestro país, no hemos encontrado ningún tipo de información respecto de la incidencia de los tipos de cáncer en perros, los datos que se encuentran son en general de origen europeo o estadounidense (Dorn y col., 1968). Además de la edad, diferentes factores pueden predisponer a la aparición de cáncer.

El género es otro factor a tener en cuenta: el riesgo tumoral en hembras y machos parecería ser similar, exceptuando el cáncer de mama, el linfoma maligno y el de vejiga que son mas frecuentes en hembras y el tumor de glándulas perineales en machos (Flores, 1986).

La participación de factores genéticos como la raza determinarían la aparición de cáncer. Existen razas de alto riesgo frente a ciertos tumores; la raza Boxer presenta propensión a todo tipo de tumores así como la raza Beagle es la menos afectada por

neoplasias (Withrow y Vail, 2007). Se deben considerar también factores como falta de pigmentación (carcinoma espino celular) y el tamaño y peso corporal (osteosarcoma en Gran Danés) que predispondrían a la aparición de neoplasias en caninos (Flores, 1986). Otro tipo de factores de riesgo que han sido mejor estudiados en humanos, son los de tipo extrínseco, todos aquellos que se encuentran en el medio ambiente y que podrían tener un efecto cancerigénico (pesticidas, humo de tabaco, luz solar, ciclofosfamida, radiaciones).

4.II.1. CARCINOMA TIROIDEO

Las patologías de la glándula tiroidea son variadas, tanto en su etiopatogenia, como en su severidad, pronóstico y tratamiento. Estas patologías incluyen alteraciones en el desarrollo, cambios degenerativos, inflamación, hiperplasia y neoplasias tiroideas (Capen, 1993; Rosai, 1996). Cabe señalar que en el perro la endocrinopatía tiroidea más frecuentemente diagnosticada es el hipotiroidismo seguida del carcinoma de tiroides. Las masas neoplásicas que se encuentran en la tiroides derivan de las células foliculares tiroideas, de vestigios del conducto tirogloso, de las células parafoliculares (células C) o de células de la paratiroides (Capen, 2002).

Los tumores de tiroides representan solo el 1 a 2% de las neoplasias reportadas en perros (Brodey y Kelly, 1968; Birchard y Roesel, 1981; Harari y col., 1986). A pesar de su baja incidencia, tiene gran trascendencia en endocrinología, ya que es la neoplasia maligna más común del sistema endocrino (Barber, 2007). En caninos en los últimos años la incidencia ha ido en aumento. En el mismo sentido en humanos algunas estadísticas indican que su incidencia ha aumentado en particular en el último decenio, y algunos países han llegado a quintuplicar el número de casos respecto a décadas precedentes (Instituto Nacional de Cáncer, 2004).

4.II.2. ANTECEDENTES y EPIDEMIOLOGIA

La presentación clínica y el comportamiento biológico de los tumores tiroideos pueden variar ampliamente entre perros, gatos y humanos. La mayoría de los tumores detectados en la clínica son carcinomas y generalmente se originan en las células epiteliales de los folículos tiroideos. Los tumores de tiroides en general se presentan en perros de mediana a edad avanzada (9 a 10 años) (Brodey, 1968; Leav, 1976; Patnaik y Lieberman, 1991; Turrel y col., 2006). No se ha encontrado una predilección sexual franca en caninos (Harari y col., 1986), a diferencia de lo reportado en humanos en que la mujer tienen una probabilidad mayor (4:1) de desarrollar cáncer de tiroides que el hombre (Henderson y col., 1982; Bukhari y col., 2010). Algunos estudios consideran que ciertas razas caninas (Bóxer, Beagle, y el Golden Retriever) tienen mayor riesgo de desarrollar carcinoma de tiroides (Barber, 2007).

El carcinoma tiroideo en caninos por lo general, es una masa voluminosa, afuncional, unilateral y localmente invasiva (tráquea, músculos cervicales, esófago, laringe y vasos sanguíneos). Estos tumores pueden residir en cualquier parte, desde la base de la lengua hasta la base cardíaca, pero con mayor frecuencia se desarrollan en la región cervical. Los signos clínicos presentes en perros con tumores de tiroides benignos o malignos

son similares. La presentación clínica más común es una masa indolora en la región cervical y los signos clínicos son generalmente el resultado de la invasión y compresión de estructuras vecinas: disfagia, tos, disfonía, disnea, pérdida de peso y anorexia (Birchard y col., 1981; Harari y col., 1986). El carcinoma tiroideo tiene un pronóstico reservado, dependiendo en parte del tamaño, la movilidad y la presencia o ausencia de metástasis (Ogilvie, 1996; Scott-Moncrieff y Nelson, 1998).

4.II.3. ETIOLOGIA Y FACTORES ASOCIADOS

Como en muchas otras condiciones neoplásicas, se desconoce la etiología exacta de los tumores tiroideos. En caninos, la etiología de la neoplasia de tiroides es en general desconocida (Bailey y Page, 2009). Si bien en humanos, la información al respecto es muy amplia, tampoco se conocen del todo los mecanismos que conducen al desarrollo del cáncer. No obstante es un hecho demostrado que se produce por la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumores y alteraciones en la expresión génica. Todos los genotipos tumorales comparten disfunciones de la fisiología celular que conducen a la malignidad: autosuficiencia en generar sus propios factores de crecimiento, insensibilidad a los factores inhibitorios de crecimiento, resistencia a la apoptosis, capacidad replicativa ilimitada e inmortalización, angiogénesis continua, e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). La transformación de las células del tejido tiroideo normal en células tumorales, en las etapas más tempranas, implica la activación o expresión de factores proliferativos: RAS, BRAF, RET, NTRK, cMYC, GSP, y TSH-R (Moretti y Pontecorvi., 2000), la inhibición de factores que controlan el ciclo celular como son los genes supresores de tumores p21, p53, Pax8/TTF-1 y los genes reguladores de la apoptosis como PTEN, MDM2, y finalmente la disrupción en la interacción célula-célula y la inmortalización celular (Segev y col., 2003). La patogénesis molecular de la neoplasia tiroidea está mejor definida en las personas (Schlumberger, 1998; Fraker y King, 2001; Pisarev y Juvenal, 2010).

Diferentes factores como los mencionados anteriormente pueden contribuir al desarrollo del cáncer de tiroides y aquellos que estimulan la proliferación celular aumentan la probabilidad de generar una mutación que lo desencadene. Por ejemplo alteraciones en el receptor de TSH o de EGF llevan a la llamada activación constitutiva del mismo (Pisarev y Juvenal, 2010). Estos receptores mutados no requieren de la unión de la respectiva hormona para estimularse y generan una proliferación descontrolada. Cuando por cualquier mecanismo se produce aumento de la división celular, la probabilidad de generar una mutación también aumenta (Pisarev y Juvenal, 2010). En humanos, se ha asociado diferentes mutaciones con determinadas formas histopatológicas de cáncer de tiroides y si bien algunas de ellas muestran una preferente asociación, no se ha detectado hasta ahora una mutación que se presente en el 100% de un tipo particular de cáncer (Pisarev y Juvenal, 2010). En tumores humanos se han observado mutaciones somáticas en los miembros de la familia de oncogenes RAS, además varias deleciones cromosómicas se han detectado en carcinomas foliculares de tiroides en humanos, que apoyan el rol que juegan varios genes supresores de tumores en el desarrollo de estas neoplasias (Larimore y Moley, 2004).

En perros los reportes al respecto son escasos. Devilee y col., (1994) identificó una única mutación del p53 (gen supresor de tumor, que detiene el ciclo celular en la fase G1, lo que permite la reparación del ADN dañado o la inducción de la apoptosis si el daño es irreparable), en 23 casos de carcinoma de tiroides. Otro reporte confirmó una trisomía 18 en un adenoma tiroideo canino (Reimann y col., 1996).

Si bien el cáncer es una enfermedad de base genética, numerosos estudios sugieren una asociación entre neoplasia tiroidea y 1) deficiencia o exceso de yodo, 2) radiación ionizante, 3) hipersecreción crónica de TSH (Feldman y Nelson, 2007). En perros se desconoce si la concentración de yodo en la dieta afecta el desarrollo del cáncer de tiroides; sin embargo, se ha visto que desde que se generalizó el consumo de alimento balanceado las patologías tiroideas han ido en aumento (Castillo, comunicación personal). En cachorros se vio que el exceso de yodo proveniente del alimento balanceado comercial afectaba la función y morfología tiroidea (Castillo y col., 2001; Castillo y col., 2003). En humanos, hay estudios que sugieren que el contenido de yodo en la dieta puede influir en la aparición del cáncer de tiroides. Las ingestas muy altas o muy bajas incrementan el riesgo de este tipo de cáncer, asociándose la deficiencia de yodo a la variante folicular y los niveles excesivos a la variedad papilar (Ferris y Berbel, 2001). La información experimental y experiencia clínica en perros no ha rechazado ni afirmado estas tendencias (Feldman y Nelson, 2007).

La relación entre radiaciones ionizantes y cáncer de tiroides se ha reconocido en las personas desde fines de los años 40 y comienzo de los 50. El efecto causal del yodo radioactivo sobre el desarrollo del cáncer de tiroides también fue sustanciado por su elevada incidencia en zonas de escapes nucleares. Los perros han sido utilizados como modelo para investigar la dosis y el tiempo de exposición a la radiaciones capaces de desarrollar neoplasias de tiroides y otros cánceres en humanos (Benjamin, 1997) y Verschueren (1992a) demostró que la irradiación puede ser causa de neoplasia tiroidea en el perro.

Como se mencionó anteriormente (ver sección Regulación del crecimiento de la tiroides) el factor primario responsable del mantenimiento de la función celular folicular tiroidea es la TSH (Roger y Dumont, 1982). Se ha demostrado que la TSH promueve la angiogénesis en líneas celulares de cáncer de tiroides a través de la inducción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Soh y col., 1996). En el mismo sentido Verschueren y col. (1992) demostraron que la afinidad y concentración de los receptores (ensayos de unión) así como también la respuesta funcional a la TSH en caninos con carcinomas de tiroides no diferían significativamente con los tejidos tiroideos normales, lo cual sugiere que la TSH continúa actuando como factor de crecimiento en los tumores tiroideos caninos. Benjamin y col. (1996) reportaron que el hipotiroidismo espontáneo causado por tiroiditis linfocítica se asoció al desarrollo de tumor en una colonia de perros de raza Beagle; apoyando la teoría de que exposición crónica de las células foliculares tiroideas a la TSH - debido a los bajos niveles de hormonas tiroideas circulantes - puede actuar como un promotor del crecimiento neoplásico.

4.II.4. TIPOS HISTOPATOLÓGICOS DEL CÁNCER DE TIROIDES

Más del 90% de los tumores tiroideos clínicamente detectables en perros son carcinomas y un porcentaje significativo de éstos son grandes, invasores, palpables y clínicamente inquietantes (Lurye y Behrend, 2001). Los tumores tiroideos pueden clasificarse de diferentes maneras pero utilizando una clasificación sencilla podemos mencionar dos formas de cáncer, el *diferenciado* y el *indiferenciado* o *anaplásico*. En caninos, la mayoría de los tumores tiroideos están bien o moderadamente diferenciados (Brodey y Kelly, 1968; Leav y col., 1976; Harari y col., 1986; Mitchell y Tjian, 1989; Klein y col., 1995), se originan del epitelio folicular y por lo general son subclassificados como *foliculares*, *compactos (sólido)*, *papilares* y *compacto-foliculares*. Estas formas representan aproximadamente las tres cuartas partes de las neoplasias de tiroides en perros (Mitchell y Tjian, 1989; Klein y col., 1995; Worth y col., 2005). Los carcinomas diferenciados se caracterizan por conservar las funciones propias de la glándula, como la captación de yodo, la biosíntesis hormonal, la de Tg, TPO y NIS (Pisarev y Juvenal, 2010). Todos los subgrupos se tiñen positivamente con tiroglobulina y factor I de transcripción nuclear tiroideo. Su pronóstico no es tan severo como el indiferenciado, que es muy agresivo, no concentra el yodo y produce tempranamente metástasis (Pisarev y Juvenal, 2010). El carcinoma *papilar*, si bien es el cáncer de tiroides más común en los seres humanos (70 a 90% de los casos), se presenta en forma esporádica en perros (Leav y col., 1976; Worth y col., 2005). Otros tumores tiroideos de muy baja incidencia en caninos son aquellos que asientan en las *Células parafoliculares* (Carcinoma medular) y los de origen no epitelial (linfoma, sarcoma, etc.).

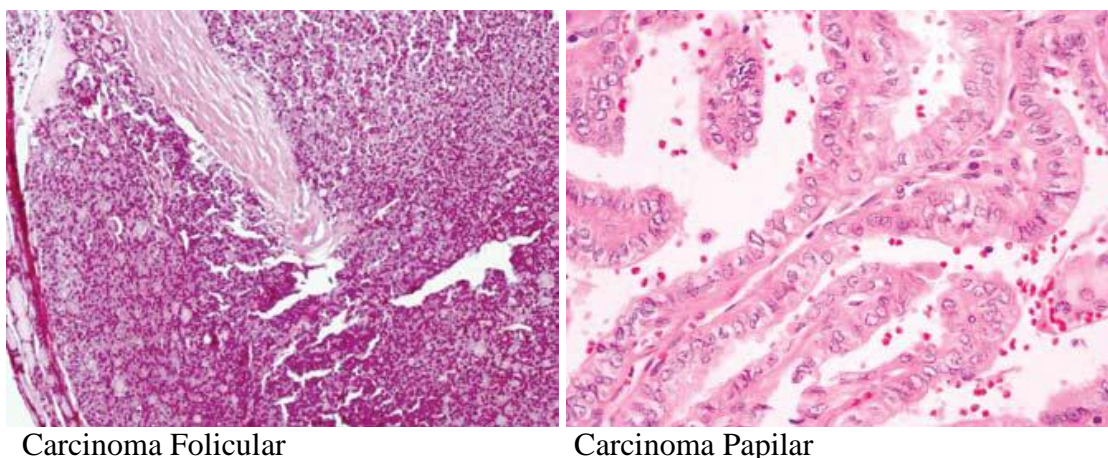


Imagen 2. Aspecto microscópico del carcinoma folicular y papilar. Tomado de Aspectos Histológicos del cáncer diferenciado de Tiroides, Cano Valdez, 2009).

4.II.5. DIAGNÓSTICO DEL CARCINOMA TIROIDEO

La estadificación rutinaria en caninos con carcinoma de tiroides consta de una evaluación de la salud general que incluya análisis de laboratorio (hematología, bioquímica y urianalisis), radiografía de tórax y evaluación citológica e histopatológica de los nódulos linfáticos regionales, la ecografía cervical también puede usarse para confirmar que la masa sea de origen tiroideo y para evaluar invasividad y vascularidad.

Generalmente es el dueño quien detecta la presencia de una masa cervical en su perro (Sullivan y Pead, 1987; Klein y col., 1995; Worth y col., 2005) y el tiempo que transcurre entre este hallazgo y el diagnóstico es en promedio 1 a 2 meses pudiendo llegar a 1 a 2 años. Estas masas tienden a ser firmes y no dolorosas, pueden estar bien circunscriptas, ser móviles o fijas. El descubrimiento incidental de una masa cervical en el examen físico de rutina es poco común, quizá esto se deba a que la palpación cuidadosa no forma parte del examen físico de rutina de muchos veterinarios (Barber, 2007).

Signos clínicos

La mayoría de los perros se presenta a la consulta por una masa palpable en la región ventral del cuello. Los signos clínicos están a menudo relacionados con la compresión o invasión de estructuras vecinas y son generalmente el motivo de consulta, incluyendo tos, disfagia, disfonía (y disnea como consecuencia de compresión traqueal o parálisis laríngea Brodey y Kelly, 1968; Birchard y Roesel, 1981; Harari y col., 1986; Carver y col., 1995).

Evaluación de la masa cervical (TNM = Tumor, Nódulos linfáticos, Metástasis)

Los oncólogos veterinarios utilizan un sistema de estadificación clínica de los tumores, inicialmente desarrollado por la Organización Mundial de la Salud (Tabla 2)

Tabla 2. Estadificación Clínica de los Tumores Tiroideos Caninos (tomada de Withrow, 2009).

| |
|--|
| T: Tumor primario |
| T0 Sin evidencia de tumor |
| T1 Tumor <2cm diámetro máximo: T1a - no fijo, T1b- fijo |
| T2 Tumor 2-5cm diámetro máximo: T2a - no fijo, T2b- fijo |
| T3 Tumor >5cm diámetro máximo: T3a - no fijo, T3b- fijo |
| N: Ganglios linfáticos regionales (RLN)* |
| N0 Sin evidencia de afección RLN |
| N1 RLN ipsilateral afectado: N1a - no fijo, N1b – fijo |
| N2 RLN bilateral afectado: N2a - no fijo, N2b – fijo |
| M: Metástasis a distancia |
| M0 Sin evidencia de metástasis a distancia |
| M1 Detección de metástasis a distancia |

* RLN= ganglios linfáticos mandibular y cervical superficial.

Estatus Hormonal tiroideo

La mayoría de los perros con carcinoma de tiroides no muestran signos de función tiroidea alterada manifestándose como eutiroides (70%) frente a los distintos test utilizados para evaluar la función de la glándula tiroides (medición de T4, TSH). No obstante un 25% presentan hipotiroidismo y solo en un 5% se observó hipertiroidismo. La hipofunción del lóbulo sano se debe a la liberación por parte del tumor de citoquinas y óxido nítrico que tienen un efecto inhibitor de la función tiroidea (Dumont y col., 1991; Cocks y col., 2000; Kimura y col., 2001). Además, conforme la célula tiroidea se

va indiferenciando más, va perdiendo sus características funcionales, siendo la última en perderse la captación de yodo. En el caso de los hipertiroideos, habría una activación persistente de la adenilato ciclasa, estando la vía sintética de hormonas exacerbada, pudiendo ser la causa de esto una mutación en el TSH-R o menos frecuentemente en el gen de la proteína G α como ha sido reportado en humanos (Palos –Paz y col. 2008).

Ultrasonografía cervical / Tomografía computerizada / Resonancia magnética

La ultrasonografía es un procedimiento simple, no invasivo, accesible y no más costoso que las radiografías o patología clínica. El uso rutinario de esta herramienta modificará la frecuencia del diagnóstico de este tipo de lesiones en el perro. La tomografía computerizada (CT) y particularmente de la resonancia magnética (MRI) aporta mayor información en cuanto a grado de invasión de la masa tiroidea sobre estructuras vecinas. La escintigrafía con pertecnato de tecnecio-99m (Tc^{99m}) o menos frecuentemente yodo radioactivo (I¹³¹) se usa sobretodo para identificar enfermedad local residual después de la cirugía, tumores ectópicos o enfermedad metastásica.

Biopsia y citología

En humanos, la citología tiroidea es muy precisa para identificar los tumores tiroideos y distinguir entre tipos malignos y benignos (Schlumberger, 1998; Fraker y King, 2001). Sin embargo, la precisión de la citología en perros con masas tiroideas no es buena, solo la mitad de las veces confirma que la masa es de origen tiroideo y a menudo no es posible reconocer un tumor maligno de forma definitiva (Harari y col., 1986; Feldman y Nelson, 2004). Dado que los tumores tiroideos malignos tienen una densidad vascular mayor que el tejido tiroideo normal y los tumores benignos (Kent y col., 2002), la hemodilución es un problema común en la citología.

4.II.6. TRATAMIENTO DEL CARCINOMA TIROIDEO

El tratamiento del carcinoma tiroideo canino está en función del tamaño tumoral, la extensión, la invasión y la presencia de enfermedad metastásica macroscópica (Barber, 2007). La escisión quirúrgica produce el mejor resultado con la menor morbilidad cuando el tumor se mueve libremente sin invasión de tejidos profundos (Carver y col., 1995; Panciera y col., 2004) (Imagen 3). La cirugía no se recomienda cuando la masa tumoral invade estructuras adyacentes que incluyen la vasculatura, los nervios laríngeos recurrentes, el tronco vago simpático, las glándulas paratiroides y en ocasiones la laringe y la tráquea. Se estima que solo entre el 25 y el 50 % de los carcinomas tiroideos son susceptibles de cirugía en el momento del diagnóstico inicial (Carver y col., 1995; Klein y col., 1995).

Las neoplasias tiroideas no operables se pueden manejar con radioterapia. La radioterapia externa es la utilizada con mayor frecuencia. Si bien hay reportes que sostienen que los tumores de tiroides son relativamente resistentes a la irradiación, estudios recientes han demostrado que la radiación externa ayuda en el control local del tumor en aquellos casos en que la recesión quirúrgica no es total (Brearley y col., 1999; Theon y col., 2000; Pack y col., 2001).

En humanos con carcinoma tiroideo bien diferenciado, se administra en forma rutinaria I^{131} postoperatoriamente para destruir carcinoma microscópico local oculto o metastático (Schlumberger, 1998; Fraker y col., 2001). En perros la experiencia es limitada pero la administración de I^{131} parece ser efectiva cuando los tumores son capaces de atrapar y organificar el yodo (Adams y col., 1995; Panciera y col., 2004; Worth y col., 2005).



Imagen 3. Hemitiroidectomía canina realizada en el Hospital de Facultad de Veterinaria.

El rol de la quimioterapia en el manejo de tumores tiroideos en perros no está del todo aclarado, los estudios publicados son pocos y con un bajo número de animales. De los perros tratados con doxorubicina o cisplatino, el 30-50% mostraron una respuesta parcial (reducción del volumen mayor al 50%) (Jeglum y Wreat, 1983; Ogilvie y col.,

1989). La quimioterapia se puede considerar en pacientes con grandes tumores no operables y/o con metástasis macroscópicas.

El uso fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) se ha ido generalizando en el tratamiento de ciertos carcinomas en medicina humana y veterinaria. Su mecanismo de acción consiste en bloquear la ciclooxigenasa (COX), que ha sido implicada en la progresión del tumor a través de una variedad de mecanismos, incluyendo la inducción de VEGF y otros componentes de la cascada angiogénica. Muchos tejidos neoplásicos sobreexpresan la isoforma inducible de la enzima COX-2, en particular los carcinomas de tiroides folicular y medular (Ito y col., 2003; Casey y col., 2004; García-González y col., 2005). La evidencia sugiere que esta enzima puede jugar un importante papel en la progresión tumoral de la tiroides de benigno a maligno (Casey y col., 2004) y que mayor expresión COX-2 se pueden correlacionar con una mayor recurrencia del tumor y muerte (Haynik y Prayson, 2005). En caninos el uso de AINES en el tratamiento de carcinoma tiroideo necesita una mayor investigación.

El suplemento con hormona tiroidea se ha propuesto como un tratamiento para los tumores de la tiroides. La intención de esta terapia es la inhibición por retroalimentación intrínseca de la liberación de TSH, ya que esta hormona actuaría como un factor de crecimiento de los tumores que mantienen sitios de unión ávidos por TSH. Hasta la fecha, ningún estudio ha examinado la eficacia de este tratamiento en la inhibición del crecimiento del tumor primario o metástasis en los perros (Barber, 2007).

Avances relativamente recientes en biología molecular han hecho posible el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, siendo los genes tiroideos el blanco de los mismos. Dentro de este grupo tenemos: 1) la terapia génica que consiste en la transferencia de ácidos nucleicos dentro de la célula tumoral para reemplazar genes defectuosos o introducir genes suicidas o inmunomoduladores. Los genes candidatos para la terapia génica en cáncer de tiroides indiferenciado serían: TTF-1, PAX8 y NIS como mediadores de la rediferenciación y el p53 como regulador del crecimiento tumoral 2) agentes de rediferenciación que han demostrado ser efectivos sobre la célula tiroidea como: el ácido retinoico (AR) entre otros. El AR, un derivado de la vitamina A biológicamente activo, ejerce sus efectos modulando la expresión de genes, actuando sobre dos tipos de receptores nucleares (receptor de ácido retinoico y receptor retinoicoX), los cuales actúan como factores de transcripción. La acción del AR sobre la célula tiroidea tumoral provocaría cambios en las propiedades celulares y en la expresión de genes relevantes involucrados en el crecimiento, diferenciación y función tiroidea específica (Frascaroli, 2007). El tratamiento con AR está siendo utilizado en caninos para el tratamiento del adenoma productor de ACTH (corticotropinoma) (Castillo y col., 2006) y se está estudiando actualmente su utilidad en el carcinoma de tiroides.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las causas de muerte más comunes en perros geriátricos; se ha reportado que el 45% de los perros que vivieron 10 años o más, murieron de cáncer (Bronson, 1982; Egenvall y col., 2000). El estado actual del conocimiento respecto a cuales son los factores de riesgo de los diferentes tipos de cánceres en caninos es escaso a nivel mundial (Harari y col., 1986) e inexistente en Uruguay. Se ha reportado que el linfoma maligno y el de vejiga que son más frecuentes en hembras y el tumor de glándulas perineales más frecuente en machos (Flores, 1986). Algunas razas se consideran de alto riesgo frente a ciertos tumores (Withrow y Vail, 2007). La generación de información respecto a la relevancia de factores como la edad, la raza y/o el sexo sobre la probabilidad de aparición del cáncer contribuirá a un mejor diagnóstico del mismo. Según Reif (2009) la comprensión de factores de riesgo para el cáncer es crítica para el desarrollo de estrategias preventivas.

El carcinoma de tiroides es reportado como una forma común de neoplasia endocrina en perros (Barber, 2007; Cano Valdez, 2009), y representa aproximadamente el 6% de las patologías endocrinas (Castillo, 2006). La edad media de presentación es de 9 a 10 años en la mayoría de los estudios (Brodey y col., 1968; Leav y col., 1976; Patnaik y col., 1991; Carver y col., 1995; Turrel y col., 2006). En caninos no se encontró predisposición de sexo (Bukhari y col., 2010; Leav y col., 1976; Wucherer y Wilke, 2010), a diferencia de lo reportado en humanos donde el cáncer de tiroides es más común en las mujeres (Henderson y col., 1982). Generalmente los carcinomas de tiroides son unilaterales, no funcionales y la mayoría de los perros se describen clínicamente como eutiroides (Liptak, 2007). La sintomatología de los perros con tumores tiroideos benignos o malignos es similar: los signos clínicos son generalmente el resultado de la alteración de las estructuras circundantes: tos, disfagia, disfonía y disnea (Birchard y col., 1981; Harari y col., 1986). Es frecuente que el único motivo de consulta sea la presencia de una masa en el área anatómica de la tiroides descubierta por los propietarios. El pronóstico y las estrategias de tratamiento del carcinoma de tiroides canino dependen en gran medida del tamaño y la agresividad del tumor, así como de la presencia de metástasis (Barber, 2007).

Los carcinomas de la glándula tiroides en perros por lo general se originan de las células epiteliales que recubren los folículos que pueden clasificarse según el grado de diferenciación. En los seres humanos, los carcinomas diferenciados como el papilar y el folicular, retienen en parte las características biológicas de las células tiroideas normales (Rossella y col., 1994). De forma similar, en los perros, la unión de la tirotropina (TSH) en los carcinomas de tiroides no difirió de la de tejido tiroideo normal (Vershueren y col., 1992), y los autores sugirieron que la TSH puede continuar actuando como un factor de crecimiento del tumor. En células tiroideas caninas, el factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I) permite el efecto mitogénico de la TSH y estimula por sí mismo la síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Deleu y col., 1999). Otro potente factor mitogénico que se ha relacionado con el crecimiento del tumor de tiroides humana es el receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$), (Manole y col., 2001), pudiendo este explicar la mayor incidencia de cáncer en mujeres que en hombres (Henderson y col., 1982). Además de que la TSH es el principal regulador de la diferenciación y la proliferación del tirocito (Rivas and Santisteban, 2003), regula los niveles de ARNm de

algunos genes específicos de la tiroides como tiroglobulina (Tg) y tiroperoxidasa (TPO) (Avvedimento y col., 1984; Gerard y col., 1989b; Zarrilli y col., 1990).

El mecanismo molecular por el cual la TSH controla la expresión de los genes de Tg y TPO, y la participación de factores de transcripción que se sabe se unen a las regiones promotoras de estos genes no ha sido dilucidado. La actividad de factores de transcripción es considerada como el interruptor principal para regular la expresión de genes (Mitchell y Tjian, 1989). En los seres humanos, dos factores de transcripción, el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF-1) y el gen pareado box 8 (PAX8) se unen a la secuencia promotora de Tg y TPO y son capaces de activar la transcripción de estos genes (Francis-Lang y col., 1992; Zannini y col., 1992).

Por otra parte, se ha propuesto que el TTF-1 y el PAX8 simultáneamente cooperan en la estimulación de TPO y Tg de la glándula tiroides en humanos (Espinoza y col., 2001; Miccadei y col., 2002). En los perros, no encontramos estudios que consideren la regulación de la expresión de Tg y TPO en glándulas tiroides sanas. Sin embargo, diversos estudios cuyo objetivo era encontrar un marcador molecular de diferenciación en el carcinoma tiroideo reportaron que TTF-1 es un buen marcador de diferenciación de la tiroides que puede ser usado en conjunto con Tg (Kathoh y col., 2000; Ramos-Vara y col., 2002; Aupperle y col., 2003).

Esta tesis tiene por cometidos: 1) Realizar un estudio preliminar para determinar la casuística del cáncer y su asociación con factores como edad, sexo y raza, y su interrelación con el tipo de cáncer, tomando como base de datos el Hospital de la Facultad de Veterinaria del Uruguay; 2) Conocer la frecuencia del carcinoma tiroideo en esta base de datos y describir los signos clínicos más comúnmente asociados al mismo; 3) Investigar la expresión de genes específicos de tiroides en la glándula sana y carcinomatosa. Teniendo en cuenta que la mayoría de los perros con carcinoma se describen clínicamente como eutiroides (Liptak, 2007), hipotetizamos que el lóbulo tiroideo contralateral sano, se encuentra en un estado de compensación ya sea mediante el aumento de la síntesis de hormonas como por su crecimiento (en términos de transcriptos vinculados a éstas funciones). Por lo tanto, se determinó la expresión génica de TSH-R (receptor de tirotropina), Tg, TPO, IGF-I, TTF-1 y PAX8 en lóbulos tiroideos sanos y enfermos en perros con carcinoma y en perros sanos.

6. HIPOTESIS

Estudio 1

Factores como la edad, el sexo y la raza están asociados a la presencia del cáncer en caninos. El carcinoma de tiroides tiene baja casuística en caninos respecto a otros tipos de neoplasias.

Estudio 2

La expresión de los genes específicos vinculados a la síntesis de hormonas tiroideas (TSH-R, Tg, TPO, TTF-1, PAX-8) está afectada en el tejido carcinomatoso. El lóbulo tiroideo sano contralateral funciona de manera compensatoria, pudiéndose esto reflejar en la expresión de los transcritos vinculados a la síntesis hormonal y/o a la proliferación celular (IGF-1 y ER α).

7. OBJETIVOS

Generales

Contribuir al conocimiento del cáncer en general y del carcinoma tiroideo en particular, en caninos

Objetivos particulares

Estudio 1

- 1) Determinar la casuística de cáncer y frecuencia de cada tipo de cáncer en caninos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria durante el año 2010.
- 2) Investigar si la edad, el sexo y la raza son factores asociados a dicha enfermedad.
- 3) Determinar cuáles son los signos clínicos más comúnmente asociados al carcinoma tiroideo.

Estudio 2

- 1) Determinar los transcritos de TSH-R, Tg, TPO, TTF-1, Pax-8, IGF-I y ER α en la glándula sana, carcinomatoso y el lóbulo contralateral sano.
- 2) Analizar si el tipo de tejido considerado (sano, enfermo y contralateral sano) afecta la expresión de los genes mencionados.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio 1

Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo en el que se revisaron todas las fichas clínicas de los caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria desde el año 2005 al 2010 para determinar la casuística. De los carcinomas y/o cánceres diagnosticados localizados en la zona ventral de cuello se registraron además los signos clínicos, análisis colaterales, resultado histopatológico, metástasis y/u otro tipo de observaciones. Para el año 2010 además se registró información respecto edad, sexo y raza de todos los otros casos atendidos por el Hospital cuyos diagnósticos excluían el cáncer (Grupo control). Esta metodología de selección del grupo control ya ha sido utilizada anteriormente (Cohen y col. 1974; Priester y Mantel 1971).

Los cánceres fueron clasificados según su localización: piel, mama, tumor venéreo transmisible (se tomó como un grupo independiente por su alta frecuencia), aparato reproductor, óseos, linfáticos, perineales, cavidad oral, hígado y bazo. Debido a la baja frecuencia los tipos de cáncer restantes se agruparon en la categoría “otros” donde se incluyeron cánceres vasculares, cuello, ojo, cavidad nasal, pulmón, vejiga, mediastino, músculo, sistema nervioso, colon y riñón.

Las edades se agruparon en tres rangos: de 0 a 5 años; de 6 a 10 años y de 11 a 20 años. Se registraron 42 razas, que se mantuvieron como tales acorde a la frecuencia de las mismas el Pastor Alemán, el Cocker, el Bóxer, el Caniche y las cruzas o mestizos; mientras que en “otras” se incluyó el resto de las razas puras con menor frecuencia de aparición.

Estudio 2

Muestras de tejido tiroideo y de sangre

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de las Facultades de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires, Argentina y por la de Montevideo, Uruguay. Los dueños de los pacientes dieron su consentimiento firmado respecto a la autorización para que sus perros participaran de este estudio.

Se obtuvieron muestras de tejido tiroideo de animales sanos enteros que fueron eutanasiados a causa de politraumatismos severos (animales sanos, n=7; 3 hembras y 4 machos) y de perros enteros con carcinoma tiroideo sometidos a cirugía para la remoción del tejido tumoral (lóbulo tiroideo carcinomatoso, n=8, 6 hembras y 2 machos). De este grupo, se tomó una biopsia de tejido tiroideo sano del lóbulo contralateral en 4 animales (lóbulo tiroideo contralateral, 3 hembras y 1 macho). Las muestras de tejido fueron colectadas en la Unidad de Endocrinología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Buenos Aires, Argentina y por el Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Todos los tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C hasta la extracción de ARN. Los tejidos fueron procesados en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. El diagnóstico de los carcinomas tiroideos se confirmaron por exámenes histopatológicos (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción del tumor luego del examen histopatológico y concentraciones de tiroxina libre (fT₄) y tirotrópina (TSH). Los rangos de normalidad para fT₄ y TSH son 0.7 a 2.5 ng/dL y 0.1 a 0.43 ng/mL respectivamente.

| ID | Raza | Sexo ^a | Edad (años) | Resultado histopatológico | fT ₄ (ng/dL) | TSH (ng/mL) |
|----|-----------|-------------------|----------------|----------------------------------|----------------------------|----------------|
| 1 | Beagle | M | 10 | Carcinoma folicular diferenciado | 0.9 | 0.2 |
| 2 | Cruza | F | 8 | Carcinoma sólido- folicular | 1.2 | 0.1 |
| 3 | Cruza | F | 10 | Carcinoma sólido- folicular | 0.7 | 0.3 |
| 4 | Pitt Bull | F | 6 | Carcinoma folicular | 1.1 | 0.3 |
| 5 | Cruza | F | 11 | Carcinoma compacto | 1.1 | 0.2 |
| 6 | Cruza | F | 9 | Carcinoma sólido- folicular | 0.7 | 0.3 |
| 7 | Cruza | F | 10 | Carcinoma folicular (bilateral) | 0.4 | 0.6 |
| 8 | Cruza | M | 8 | Carcinoma sólido- folicular | 0.6 | 0.4 |

Sexo^a, F= hembra y M=macho

Determinaciones de TSH y fT₄ (tiroxina libre)

Las determinaciones hormonales fueron realizadas solo en los casos patológicos. Las concentraciones plasmáticas de TSH fueron determinadas por IRMA (ensayo inmunoradiométrico) utilizando kits comerciales DPC (Coat-A-Count, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, EE.UU.). La sensibilidad del ensayo fue de 0.03 ng/mL. Los coeficientes de variación intra-ensayo para controles bajos (0.26 ng/mL) y altos (3.1 ng/mL) fueron 9.5 % y 2 % respectivamente. Las concentraciones de fT₄ fueron determinadas usando un kit de radioinmunoensayo en fase sólida (RIA) de DPC. La sensibilidad fue de 0.01 ng/dL. Los coeficientes de variación intra-ensayo para controles bajos (0.2 ng/dL) y altos (3.9 ng/dL) fueron 8.5% y 4.1% respectivamente.

Aislamiento de RNA y transcripción reversa

El ARN total fue extraído usando TRIZOL (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), seguido de una precipitación con cloruro de litio para remover inhibidores de la síntesis de cDNA. Las muestras fueron tratadas con ADNasa para remover ADN contaminante (Naderi y col., 2004). La concentración de RNA se determinó por absorbancia a 260 nm y la pureza e integridad del mismo se confirmó a través de la relación de absorbancia 260/280 nm y por electroforesis (gel agarosa 1%). Todas las muestras presentaron relaciones A_{260/280} entre 1.8 y 2.0. La reacción de transcripción reversa (RT) se realizó usando SuperScript III First-Strand Synthesis System Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) con primers no específicos y 1.5 µg total de ARN como molde.

Cuantificación

Como dos variantes de Pax8 fueron reportadas en caninos (PAX 8a y PAX 8g, van Renterghem y col. 1996), ambas fueron determinadas. Los primers específicos para amplificar cDNA de TSH-R, Tg, TPO, PAX-8^a, PAX-8g, y TTF-1, fueron diseñados basados en las secuencias nucleotídicas de canis lupus familiares disponibles en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias para ER α e IGF-I se obtuvieron de la literatura (Pfaffl y col. 2002; Schams y col. 2003; Wu y col. 2004). Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación a la empresa MacroGen (Korea) y se confirmó la identidad de las secuencias en el Gene Bank utilizando el algoritmo blast.

Las secuencias de los primers utilizados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de los pares de primers usados para PCR en tiempo real.

| Genes | Número de acceso | | Secuencia |
|-------------|------------------|----------|----------------------------|
| TSH-R | X17146 | Forward: | GGC AAT GAA GAC ATG GTG TG |
| | | Reverse: | ACA AAG ACA TTG CCC AGG AG |
| Tg | NM0011048104 | Forward: | AGACCCACATCGGAGTGTTT |
| | | Reverse: | AGCCCTGGTGGTTAGAAGGT |
| TPO | AY094504 | Forward: | CTCAAGGAAGGTGGTCTGGA |
| | | Reverse: | CTCTCGGTCAGCTCCTCATT |
| TTF-1 | X77910 | Forward: | GACGCTTCAAGCAACAGAAG |
| | | Reverse: | TTCATCTTGTAGCGGTGGTTC |
| PAX-8a | X83592 | Forward: | GCAGGAAGCGAATACTCTGG |
| | | Reverse: | ACTTGGCCTTGATGTGGAAC |
| PAX-8g | X83592 | Forward: | GCTATGCCTCTTCTGCCATC |
| | | Reverse: | CCACTGTCCCATAGCAACT |
| IGF-1 | NM_001077828 | Forward: | CCAGACAGGAATCGTGGATG |
| | | Reverse: | GCAGTACATCTCCAGCCTCCTCAGA |
| Er α | AY033393 | Forward: | AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC |
| | | Reverse: | CGGTGGATGTGGTCTTCTCT |
| RPL19 | AY158223 | Forward: | CCCCAATGAGACCAATGAAATC |
| | | Reverse: | CAGCCCATCTTTGATCAGCTT |

El nivel de expresión de la proteína ribosomal L19 (RPL19) se usó como control endógeno usando las secuencias de primer de Chen y col. (2006). La expresión de RPL19 se testeó en un estudio piloto y probó ser un buen gen control porque no mostró variaciones entre individuos y tratamientos como había sido demostrado previamente para otros tejidos ovinos y bovinos (Sosa y col. 2009 y Sosa y col. 2010). Como se puede observar en la Figura 8, los ciclos a la línea de base (CT=threshold) no difirieron entre grupos.

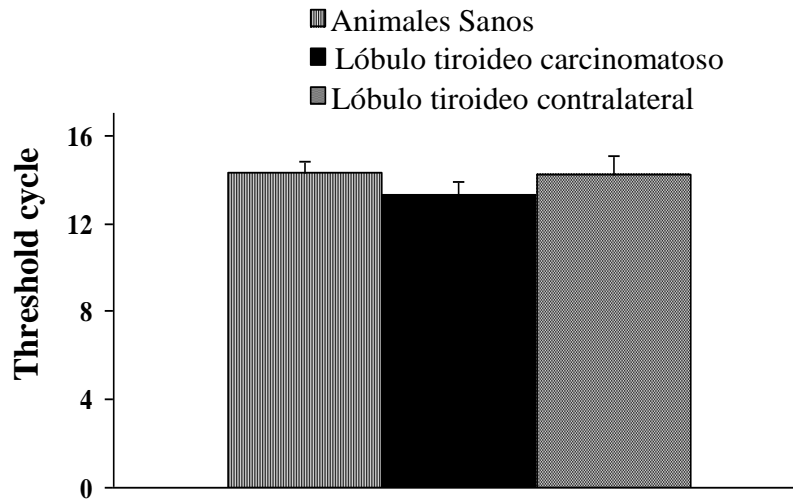


Figura 8. Ciclos a la línea de base del transcrito RPL19 determinado por PCR en tiempo real en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo tiroideo contralateral.

La cuantificación de los transcritos fue determinada en RT-PCR en tiempo real (real-time RT-PCR; Rotor-Gene™ 6000; Corbett Life Sciences, Sydney, Australia) usando SYBR green (Quantimix; Biotools, Madrid, Spain). Las condiciones de amplificación fueron 10 min a 95 °C, 40 ciclos a 15 seg a 95 °C, 45 seg a 60 °C y 20 seg a 72 °C. Se realizaron curvas de dilución del producto PCR de acuerdo a Fenwick y col. (2006). El número de ciclos requeridos para alcanzar la “threshold” (CT) se determinó para cada gen en cada animal. Para estandarizar las medidas de cuantificación de expresión génica debido a diferencias entre las muestras en cantidad de células en la muestra de tejido extraído, en la calidad del ARN, y en la eficiencia de la RT, los datos de expresión de ARNm de los genes de interés fueron normalizados respecto al gen usado como control interno ($\Delta CT = [CT(\text{gene de interés}) - CT(\text{control interno})]$) y se expresaron en relación a la muestra utilizada como control positivo ($\Delta\Delta CT = \Delta CT - \Delta CT (\text{control positivo})$), cuantificación relativa; Livak and Schmittgen, 2001).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio 1, se analizaron las proporciones de acuerdo a la categoría de edad, sexo y raza en animales con cáncer y controles (Año 2010) acorde al test de Chi cuadrado. Se calcularon los odds ratio para los factores sexo y edad. Se consideró significativo una $P < 0.05$ y los valores entre $P > 0.05$ y < 0.15 se consideraron como tendencia.

Para el estudio 2, los transcritos se analizaron por el procedimiento mixto (Proc Mixed, Statistical Analysis System, SAS) incluyendo en el modelo el grupo (sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y contralateral sano) como efectos fijos. Efectos randomizados fueron el plato de PCR. Además, se analizó el efecto del sexo únicamente en el grupo sano, debido a que en los animales con carcinoma eran solo 2 machos. Se realizaron correlaciones de Pearson para estudiar asociaciones entre variables. Los datos se presentan como promedios \pm SEM. El nivel de significación fue $P < 0.05$ y los valores de P comprendidos entre 0.05 y 0.10 se consideraron como tendencia.

9. RESULTADOS

Estudio 1

Casuística del cáncer en casos atendidos en la Facultad de Veterinaria 2005 - 2010

En la Tabla 5 se resume la cantidad de casos clínicos con diagnóstico de cáncer (Grupo cáncer) y el número de animales que presentaron otras patologías no neoplásicas (Grupo control) atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria desde el año 2005 al 2010.

Tabla 5. Casuística de neoplasias en perros durante el período 2005-2010.

| Año | Grupo cáncer | Grupo control | Casuística |
|--------------|--------------|---------------|--------------|
| 2005 | 164 | 1026 | 0.138 |
| 2006 | 203 | 1650 | 0.110 |
| 2007 | 211 | 1402 | 0.131 |
| 2008 | 201 | 1316 | 0.132 |
| 2009 | 184 | 1491 | 0.110 |
| 2010 | 212 | 1217 | 0.148 |
| Total | 1175 | 8102 | 0.127 |

Cáncer y factores asociados

La presencia del cáncer y su asociación con factores como sexo, edad y raza fueron analizados únicamente para el año 2010. El género afectó la frecuencia de aparición de cáncer ($P < 0.0001$), hubo una mayor proporción de hembras con cáncer que machos (140 hembras y 72 machos), Figura 9. El odds ratio (razón de posibilidades) de que una perra presente cáncer respecto a un macho es de 2.0.

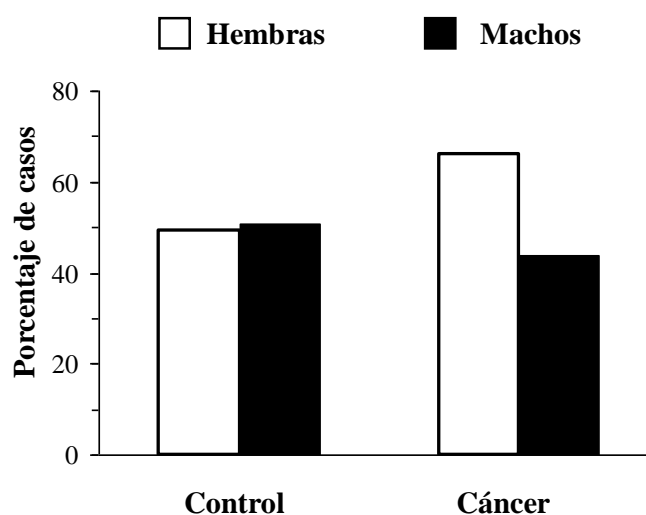


Figura 9. Porcentaje de casos acorde al género en el grupo cáncer y grupo control.

La edad afectó la frecuencia de aparición de las neoplasias ($P < 0.0001$). Se observó un mayor número de casos de cáncer en animales de mediana a avanzada edad (6 a 10 años = 101 animales), y de animales gerontes (11 a 20 años = 81 animales) y por último los

animales jóvenes donde la frecuencia fue menor (0 a 5 años = 30 animales) (Figura 10). El odds ratio de que un perro de mediana edad (6 a 10 años) presente cáncer respecto a un animal joven (0-5 años) es de 8.1; mientras que en animales gerontes (11 a 20 años) aumenta a 12.5.

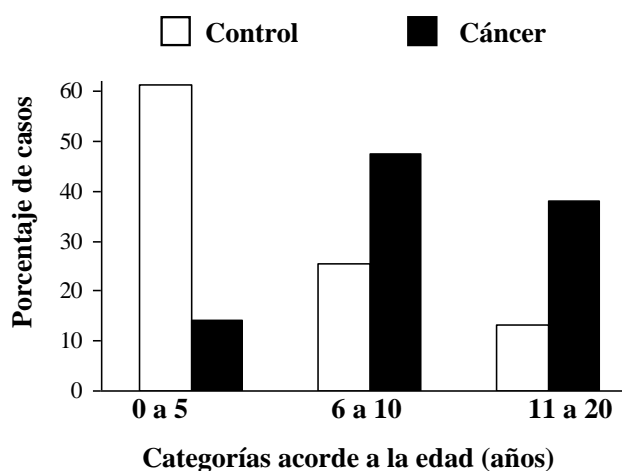


Figura 10. Distribución porcentual de los casos según la edad en el grupo cáncer y control.

En el año 2010, la proporción de animales con cáncer acorde a la raza tendió a ser diferente ($P=0.15$). El porcentaje de perros de cada raza con cáncer respecto al total de los perros de la misma raza atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria fue el siguiente: 26% de los Bóxer con cáncer (cáncer/total: 13/50), el 13.5% de los Caniches (10/74), el 19.6% de los Cocker (10/51) y el 11.8 % de los Pastores Alemanes (8/68).

Para el análisis del efecto del género se eliminaron todos los tejidos vinculados directamente con el sexo (glándula mamaria, útero, testículo, pene, etc.) y no se encontraron efectos del mismo (Tabla 6).

Tabla 6. Número de casos clínicos y distribución porcentual acorde al género para cada tipo de cáncer.

| Tipo de Cáncer | Hembras | Machos | Subtotal casos | Subtotal % |
|--|------------|-----------|----------------|------------|
| Glándula Mamaria | 76 (95%) | 4 (5%) | 80 | 38.3 |
| Piel | 15 (58%) | 11 (42%) | 26 | 12.4 |
| Venéreo Transmisible | 7 (54%) | 6 (46%) | 13 | 6.22 |
| Óseo | 6 (46%) | 7 (54%) | 13 | 6.22 |
| Perineales | 2 (22%) | 7 (78%) | 9 | 4.3 |
| Cavidad oral | 5 (71%) | 2 (29%) | 7 | 3.35 |
| Linfaticos | 3 (50%) | 3 (50%) | 6 | 2.87 |
| Pene, Próstata, Vagina, Utero, Ovarios | 4 (67%) | 2 (33%) | 6 | 2.87 |
| Testitulos | 0 | 6 (100%) | 6 | 2.87 |
| Otros | 22 (49%) | 24 (51%) | 46 | 20.6 |
| TOTAL | 140 | 72 | 212 | 100 |

La categoría etaria afecto la presentación del tipo de cáncer ($P=0.004$). Al analizar la frecuencia del tipo de cáncer acorde a la edad se observó que las categorías de 6-10 y

11-20 años fueron las más afectadas, exceptuando los tumores venéreo transmisible, óseo y linfáticos. En el venéreo transmisible el mayor número de casos se registró entre los 0-5 años; los tumores óseos se distribuyeron equitativamente entre las 3 categorías y los tumores linfáticos presentaron un comportamiento bimodal, concentrándose los casos en la edad temprana y gerontes (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución del tipo de cáncer acorde a la edad.

| Tipo de Cáncer | 0 – 5 años | 6 – 10 años | 11 – 20 años |
|--|-------------------|--------------------|---------------------|
| Glándula Mamaria | 9 (11%) | 37 (46%) | 34 (43%) |
| Piel | 2 (7%) | 15 (58%) | 9 (35%) |
| Venéreo Transmisible | 7 (54%) | 5 (38%) | 1 (8%) |
| Óseo | 4 (31%) | 4 (31%) | 5 (38%) |
| Perineales | 0 | 4 (44%) | 5 (56%) |
| Cavidad oral | 0 | 5 (71%) | 2 (29%) |
| Linfaticos | 2 (33%) | 1 (17%) | 3 (50%) |
| Pene, Próstata, Vagina, Utero, Ovarios | 0 | 4 (67%) | 2 (33%) |
| Testiculos | 0 | 1 (17%) | 5 (83%) |
| Otros | 5 (12%) | 23 (53%) | 15 (35%) |
| TOTAL | 29 (14%) | 99 (47%) | 81 (39%) |

Cáncer de tiroides

En el período analizado (2005-2010) se registraron 14 casos de tumores en la “zona ventral de cuello”, siete de ellos fueron diagnosticados como carcinoma de tiroides; representando el 0,6% del total de cánceres atendidos. En el año 2005 no se registró ningún paciente con carcinoma de tiroides, durante el período 2006-2009, 1 sólo caso por año fue atendido y en el 2010 se registraron 3 pacientes con dicha patología. En cuanto al sexo, de los 7 perros afectados 4 fueron machos y 3 hembras. La edad de los mismos estuvo entre 6 y 12 años y las razas fueron diversas. El signo clínico mas común a todos los pacientes con carcinoma de tiroides fue la deformación en más a nivel ventral de cuello. Cuatro de los caninos presentaron disfagia y disfonía. Solo uno de ellos presentó metástasis al momento del diagnóstico (Ver Tabla 6 en anexo donde se detallan los 7 casos).

Estudio 2

Efecto del género sobre los transcritos en tiroides de animales sanos

En el grupo sano, el nivel de expresión (relativa a PRL19) de ARNm de TSH-R fue mayor en hembras que en machos ($X \pm ES$): 1.84 ± 0.23 vs 0.71 ± 0.19 , $P = 0.021$. El mismo patrón se observó para la expresión de ARNm de Tg, donde las hembras tendieron a mostrar una mayor expresión que los machos: 1.25 ± 0.25 vs 0.52 ± 0.22 , $P = 0.06$. Para los otros genes analizados, TPO, TTF-1, PAX-8, el IGF-1, $ER\alpha$ no se encontraron diferencias de género en la expresión de ARNm.

Expresión de los transcritos en la glándula tiroides en animales sanos, en lóbulo tiroideo carcinomatoso y contralateral

La expresión de los transcritos para los genes TSH-R, Tg, TPO, TTF-1 en la tiroides de animales sanos, en el lóbulo carcinomatoso y en el lóbulo tiroideo contralateral se muestran en la Figura 11.

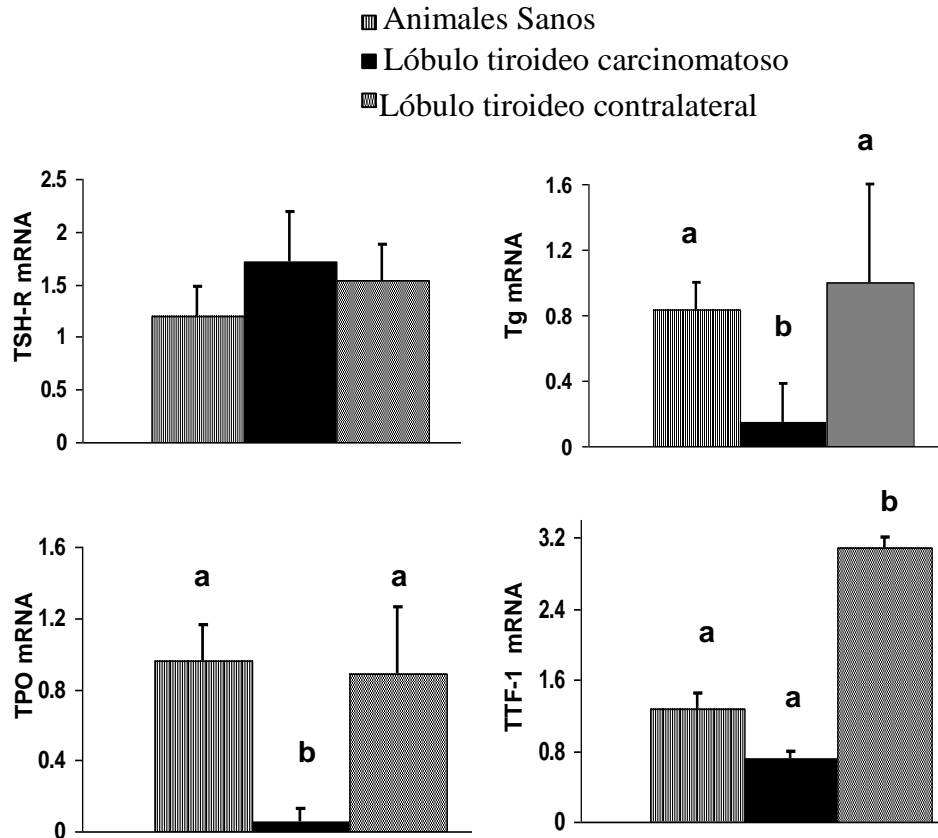


Figura 11. Nivel de expresión de los transcritos (normalizados por RPL19) de TSH-R, Tg, TPO, y TTF-1 en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo contralateral. Las diferentes letras indican diferencias en el mismo gráfico, a,b: $P < 0.05$ (cuadrado de las medias \pm error estándar).

La expresión de ARNm del TSH-R no fue diferente entre los grupos. Los niveles de ARNm de Tg, TPO y TTF-1 fueron afectados por el grupo ($P = 0.012$, P

= 0.0003 y $P = 0.046$, respectivamente). El grupo carcinoma tuvo menor expresión de ARNm de Tg y TPO que los grupos sanos y CL, $P < 0.05$, mientras que no se encontraron diferencias entre estos últimos grupos. La expresión de ARNm de TTF-1 fue mayor en el grupo de CL que en el grupo sano y carcinoma ($P < 0.05$), que no difirieron entre sí (Figura 8). El nivel de expresión de ARNm de PAX-8a, PAX-8g, IGF-1 y el ER α no fue diferente entre los grupos (Figura 12).

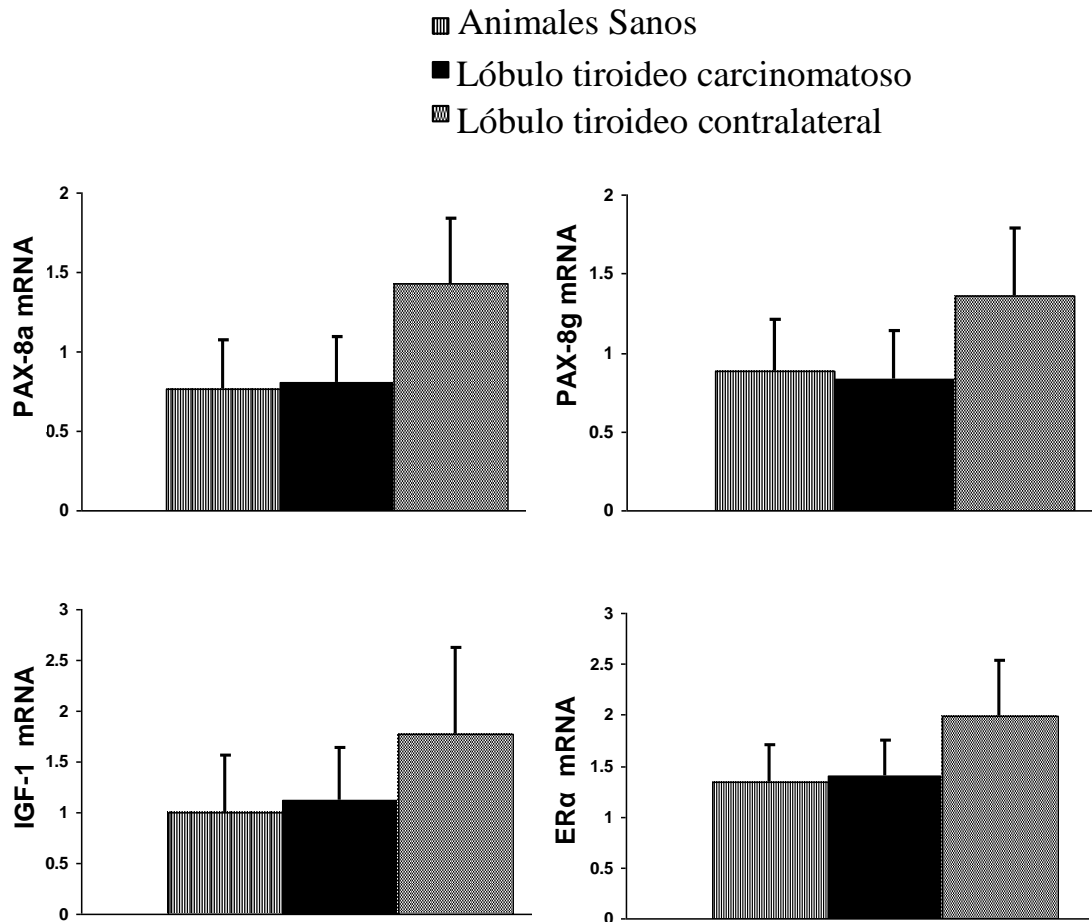


Figura 12. Nivel de expresión de los transcritos (normalizados por RPL19) de PAX-8a, PAX-8g, IGF-1 y ER α en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo contralateral.

Análisis de correlaciones

Se analizaron correlaciones entre variables en tejidos tiroideos sanos (animales sanos y lóbulo contralateral sano, Tabla 8) y tejidos enfermos (lóbulo carcinomatoso, Tabla 9) por separado.

El análisis de la correlación de la expresión de estos genes en tejidos tiroideos sanos describe dos grupos que se correlacionan entre sí: TSH-R, TTF-1, IGF-1 y ER α por un lado, y Tg, TPO, PAX-8a y PAX-8g por otro. TSH-R, IGF-1 y ER α presentaron una correlación alta y positiva (valores de r oscilaron entre 0.86 y 0.99, Tabla 8), mientras

10. DISCUSIÓN

Estudio 1

La casuística de cáncer en perros atendidos en el Hospital de Facultad de Veterinaria en el período 2005-2010 estuvo entre 0.11 y 0.15. Si bien este es un estudio preliminar y los datos obtenidos no representan la población de perros en general, permiten hacer una estimación adecuada de la casuística para describir las características generales de la distribución del cáncer en caninos (Reif, 2009). En un estudio realizado en 3 años consecutivos en el Estado de California, USA, se reportó un ratio de incidencia anual de 3,8 casos de cáncer por cada 1000 perros, definiéndose la población control en este como todos los casos que son llevados al veterinario para algún tipo de control (Withrow y Vail 2007). No hemos encontrado otros estudios similares al nuestro que permitan comparar resultados.

El género afectó la frecuencia de aparición de cáncer, estando las hembras más representadas que los machos (odds ratio:2). Estos datos son coincidentes con lo reportado por Egenvall y col. (2000) quienes observaron una morbilidad de 2,66% en hembras y 1,58% en machos. El análisis de género en función del tipo de cáncer (localización), no fue significativo. En nuestro estudio la glándula mamaria fue el órgano más afectado por tumores seguido de la piel; estos datos difieren con lo reportado en trabajos de origen estadounidense o europeo, donde piel ocupa el primer lugar y la mama el segundo órgano afectado. Esta diferencia estaría dada por la esterilización a edad temprana que se realiza en estos países tanto de hembras como de machos. Kesley y col. (1998) sugieren que la castración a edad temprana protege contra neoplasias de la glándula mamaria. Se observó que los machos presentaron una mayor frecuencia de tumores perineales que las hembras, datos que concuerdan con lo reportado por Conroy (1983), que menciona que el riesgo de padecer este tipo de tumor es 5 a 10 veces mayor en machos que en hembras.

El efecto de la edad resultó un factor determinante en la aparición de casi todos los tipos de neoplasias, resultando más afectados los animales de mediana edad a viejos. Resultados similares son reportados por Dobson y col. (2002) en el Reino Unido, donde hallaron que la mayoría de los tumores ocurren en perros mayores de nueve años. En el mismo sentido, Withrow y Vail (2007), reportaron que el cáncer es una de las causas de muerte más común en perros geriátricos y desafortunadamente la casuística sigue en aumento. La influencia de la edad en el desarrollo del cáncer está demostrada tanto en medicina humana como veterinaria. La mayoría de los tumores en las especies canina y felina experimentan un incremento constante y regular de su incidencia a medida que el animal envejece. Sin embargo, algunos tipos específicos de tumores presentan una distribución de edad con patrones diferentes: de esta forma, la incidencia de tumores de mama aumenta progresivamente con la edad a partir de los 6 y hasta los 10-11 años para disminuir a edades avanzadas. Otros tumores, como el linfosarcoma o el osteosarcoma presentan patrones de edad bimodales con picos en edades tempranas y un segundo pico en edades más avanzadas (Martínez de Merlo y Pérez Díaz, 2007). Resultados similares a éstos se encontraron en nuestro estudio, sumándose a los tumores mencionados el tumor venéreo transmisible, donde la categoría más afectada es la de 0-5 años,

explicable en gran medida por coincidir con la etapa reproductiva de los animales. En el mismo sentido Bravo y col. (2009) reportan que al ser una neoplasia transmitida sexualmente los animales de mayor riesgo son los perros de 4 a 5 años de edad.

Aun considerando que estos son estudios preliminares y que la base de datos debe ser ampliada para realizar un análisis más preciso, se observó una tendencia a que las proporciones de animales enfermos fuera afectada por raza; la raza Boxer tendió a presentar una mayor frecuencia de aparición de la enfermedad. Estos datos coinciden con lo reportado en la bibliografía donde el Boxer es considerado como una raza de alto riesgo frente a varios tipos de tumores (Cohen y col., 1959; Bravo y col., 2009). Bonnett y col., 2005 reportaron que la presencia de tumores en Bóxer es de casi 4 veces más alta que los Goleen Retrievers.

Estudio2

En animales sanos, la expresión de los transcritos del Receptor de TSH (TSH-R) y de tiroglobulina (Tg) en tiroides fue mayor en hembras que en machos, y no hemos encontrado reportes similares en perros. Hay pocos estudios sobre los efectos del género en la expresión de genes específicos en la glándula tiroides. En ratas, la expresión de TPO ARNm y Tg ARNm fue menor en las hembras jóvenes (50% menos) en comparación con los machos jóvenes (Correa da Costa y col., 2001). En la mujer, la captación de yodo 131 fue mayor que en el hombre (González y col., 2008), mientras que el volumen de la glándula tiroides fue mayor en los hombres (Gómez y col., 2002). Se ha sugerido que los esteroides sexuales pueden influir en el crecimiento de la tiroides a través de la modulación de la concentración de sus receptores específicos (Banu y col., 2002). Además, los receptores de andrógenos y de estrógenos (ER) no sólo están presentes en la glándula tiroides, sino que su síntesis es estimulada por las hormonas respectivas (Banu y col., 2001).

Este es el primer informe de la presencia de ER α en la glándula tiroides canina, siendo su expresión similar entre los sexos. Resultados similares fueron reportados en humanos (Manole y col., 2001). Este último trabajo reportó además que el 17 β -estradiol (E2) tiene un efecto estimulador del crecimiento en las células tiroideas benignas y malignas, lo que puede explicar porqué los tumores y carcinomas de tiroides son tres veces más frecuentes en la mujer que en el hombre (Henderson y col., 1982). Por otra parte, en nuestro estudio, la expresión del TSH-R ARNm fue mayor en las perras; lo que es consistente con el estímulo o inhibición del E2 sobre el TSH-R en hembras o machos respectivamente (Banu y col. 2001). La mayor expresión de Tg ARNm en las hembras podría estar relacionada a una mayor sensibilidad de la glándula tiroides a la TSH (TSH-R).

Aunque la expresión del mensajero de los receptores no siempre refleja la expresión de proteína tisular real como ha sido reportado en otras especies (Meikle y col., 2000; Sosa y col., 2009), no se encontraron diferencias en la expresión del ARNm del TSH-R entre los grupos sanos, contralateral y lóbulo contralateral (CL). Esto está de acuerdo con Verschueren y col. (1992), quienes encontraron que los ensayos de unión de TSH (TSH-R) fueron similares en tejidos tiroideos normales y tumorales en perros. La TSH es considerada el principal regulador de la diferenciación y la proliferación del tirocito (Rivas y Santisteban, 2003), y se ha sugerido que la TSH puede seguir actuando como un factor de crecimiento del tumor (Verschueren y col., 1992).

Ha quedado claramente demostrado que la TSH regula los niveles de ARNm de varios genes específicos de la tiroides, tales como Tg y TPO. En contraste con los resultados de TSH-R ARNm, la expresión de los transcritos de Tg y TPO fueron menores en el grupo carcinoma que en los animales sanos y los del grupos CL, lo que sugiere que el tejido carcinomatoso tiene una menor capacidad funcional de síntesis de hormonas tiroideas. Mientras que no se han encontrado reportes sobre la TPO en el carcinoma de tiroides en perros, varios reportes demuestran que la Tg se detecta en el 90-100% de los carcinomas (Moore y col., 1984; Patnaik y col., 1991; Leblanc y col., 1991). Esta discrepancia podría deberse al hecho de que estos últimos estudios determinan la proteína de Tg, mientras que en nuestro estudio se mide el transcripto. Por otro lado, en los seres humanos, tanto la expresión del gen de Tg como la de TPO en los carcinomas diferenciados fue muy heterogénea (Fabbro y col., 1994).

Los genes Tg y TPO están regulados por dos factores de transcripción, TTF-1 y PAX 8 que están presentes simultáneamente sólo en las células foliculares de la tiroides, lo que sugiere que esta combinación única podría desempeñar un papel en la expresión del fenotipo específico de la tiroides (Fabbro y col., 1994). Si bien este estudio consideró un bajo número de animales, uno de los hallazgos más interesantes de este estudio fue el aumento de casi 3 veces en la expresión de TTF-1 en el lóbulo tiroideo contralateral en comparación con el grupo sano y carcinoma. TTF-1 es considerado un factor mitogénico implicado en la proliferación y diferenciación celular (Ramos-Vara y col., 2002; Lacroix y col., 2006; Kondo y col., 2009), por lo tanto, se puede especular que este incremento en la expresión en el lóbulo contralateral puede estar asociado con una hiperplasia que intenta compensar la pérdida de función del lóbulo enfermo, con el fin de mantener el estado eutiroideo. Esta idea se ve reforzada por la baja expresión de ARNm de Tg y TPO en el tejido carcinomatoso, lo que sugiere que la síntesis de hormonas tiroideas por el lóbulo afectado es defectuosa. En general, los datos de expresión de ARNm tanto en el grupo carcinoma como en el lóbulo contralateral pueden explicar por qué 7 de los 8 perros con carcinoma de tiroides en este estudio presentaron valores de TSH y T4 libre dentro del rango normal, como se ha reportado para la mayoría de los perros (Nelson 1998; Barber, 2007). Por otro lado, un pequeño porcentaje de perros con carcinoma tiroideo presentan hipotiroidismo - como uno de los perros de nuestro estudio- en estos casos se puede proponer que la expresión génica del lóbulo sano esté alterada, ya que se ha demostrado que la expresión de dicho lóbulo es inhibida por citocinas liberadas por el lóbulo enfermo (Dumont y col., 1991; Cocks y col., 2000; Kimura y col., 2001; Zubelewicz y col., 2002).

En contraste con los datos de TTF-1, no se pudieron demostrar diferencias significativas en la expresión de ARNm de PAX-8, y no se encontró correlación entre estos dos transcritos. Por otro lado, el análisis estadístico reveló una correlación significativa entre ARNm de PAX-8 y Tg como ha sido reportado para humanos previamente (Lacroix y col., 2006). Por el contrario, estos autores encontraron una correlación significativa con la TPO, que no fue encontrada en nuestro estudio. Estudios de estos dos factores de transcripción de genes (TTF-1 y PAX-8) y de genes implicados en el metabolismo del yodo mostraron que la expresión génica de TPO y Tg se correlacionó significativamente con la de PAX-8, pero no directamente con TTF-1 (Pasca di Magliano y col., 2000; Lacroix y col., 2006) y esto es consistente con nuestros resultados, ya que TTF-1 ARNm no se correlacionó con la expresión del ARNm de Tg o TPO.

El nivel de expresión del ARNm de IGF-1 y ER α no fue diferente entre los grupos, tal como se encontró para TSH-R. Existió una alta correlación entre estos transcritos en tejidos sanos (perros sanos y lóbulos contralaterales sanos de perros con carcinoma); sin embargo, esta correlación positiva de estos transcritos se pierde en el lóbulo enfermo. Todas estas proteínas son factores mitogénicos y relacionados con el crecimiento, y se podría sugerir que una alteración en la conversación de estos factores este en la base del mecanismo del carcinoma tiroideo. Mas aún, la hipótesis de trabajo de varios investigadores (Roger y Dumont, 1987; Deleu y col., 1999) es que si la glándula tiroides no puede responder funcionalmente a la TSH (por ejemplo, en términos de síntesis de hormonas tiroideas), el único efecto que se observa es el trófico, que conduce a la hiperplasia y a la activación de genes que promueven cambios celulares que conllevan a la aparición del carcinoma.

11. CONCLUSIONES

El estudio preliminar de la casuística del cáncer evidenció que el sexo y la edad son factores asociados a la presencia del mismo, siendo más afectadas las hembras y los animales gerontes. Además la proporción del tipo de cáncer estuvo afectada por la raza, destacándose el Bóxer como la que presentó más casos de cáncer.

En esta tesis se demostró que la expresión génica está alterada en los carcinomas de tiroides respecto del lóbulo tiroideo contralateral y la glándula sana. Los resultados obtenidos sugieren que el tejido carcinomatoso tiene su capacidad funcional alterada y que el lóbulo tiroideo contralateral podría actuar en forma compensatoria en perros eutiroideos.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams WH, Walker MA, Daiel GB, et al. Treatment of differentiated thyroid carcinoma in 7 dogs utilizing ¹³¹I. *Vet Radiol Ultrasound* 1995;36:417-24.
- al-Alawi, N., Rose, D.W., Buckmaster, C., Ahn, N., Rapp, U., Meinkoth, J., Feramisco, J.R., 1995, Thyrotropin-induced mitogenesis is Ras dependent but appears to bypass the Raf-dependent cytoplasmic kinase cascade. *Mol Cell Biol* 15, 1162-1168.
- Alberts, A.S., Arias, J., Hagiwara, M., Montminy, M.R., Feramisco, J.R., 1994, Recombinant cyclic AMP response element binding protein (CREB) phosphorylated on Ser-133 is transcriptionally active upon its introduction into fibroblast nuclei. *J Biol Chem* 269, 7623-7630.
- Antico-Arciuch, V.G., Dima, M., Liao, X.H., Refetoff, S., Di Cristofano, A., 2010, Cross-talk between PI3K and estrogen in the mouse thyroid predisposes to the development of follicular carcinomas with a higher incidence in females. *Oncogene* 29, 5678-5686.
- Arce V.M., 2006, Fisiología de la glándula tiroidea. En *Edocrinología*, Arce, Victor M, Catalina Pablo F, Mallo Federico. Universidad de Santiago de Compostella, Universidad de Vigo.
- Aupperle, H., Gliesche, K., Schoon, H.A., 2003, [Tumors of the thyroid gland in dogs-- a local characteristic in the area of Leipzig]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 110, 154-157.
- Avvedimento, V.E., Tramontano, D., Ursini, M.V., Monticelli, A., Di Lauro, R., 1984, The level of thyroglobulin mRNA is regulated by TSH both in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 472-477.
- Bailey D.B., Page R. L., 2009. Neoplasias específicas en pequeños animales. En Withrow, S.J., Vail, D.M., 2007. *Oncología clínica de pequeños animales*. 4ta ed. Barcelona. Elsevier, pp 579-583.
- Banu, K.S., Govindarajulu, P., Aruldas, M.M., 2001, Testosterone and estradiol modulate TSH-binding in the thyrocytes of Wistar rats: influence of age and sex. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78, 329-342.
- Banu, S.K., Govindarajulu, P., Aruldas, M.M., 2002, Developmental profiles of TSH, sex steroids, and their receptors in the thyroid and their relevance to thyroid growth in immature rats. *Steroids* 67, 137-144.
- Barber, L.G., 2007, Thyroid tumors in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 37, 755-773, vii.
- Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M., Valentinis, B., 1997, The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1332, F105-126.
- Belshaw, B.F. 1989. Enfermedades tiroideas. En: Ettinger, S (ed): *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*, 2ed. Editorial Inter-Médica, Buenos Aires. pp 1491- 1494.
- Benjamin, S.A., Saunders, W.J., Lee, A.C., Angleton, G.M., Stephens, L.C., Mallinckrodt, C.H., 1997, Non-neoplastic and neoplastic thyroid disease in beagles irradiated during prenatal and postnatal development. *Radiat Res* 147, 422-430.

- Benjamin, S.A., Stephens, L.C., Hamilton, B.F., Saunders, W.J., Lee, A.C., Angleton, G.M., Mallinckrodt, C.H., 1996, Associations between lymphocytic thyroiditis, hypothyroidism, and thyroid neoplasia in beagles. *Vet Pathol* 33, 486-494.
- Birchard, S.J., Roesel, O.F., 1981, Neoplasia of the thyroid gland in the dogs. A retrospective study of 16 cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 17, 369-372.
- Bonnett, B.N., Egenvall, A., Hedhammar, A., Olson, P. 2005, Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. *Acta Vet Scand.*;46(3):105-20.
- Bravo, D., Cruz-Casallas P., Ochoa J. 2010, Prevalencia de neoplasias en caninos en la Universidad de los Llanos, durante 2004 a 2007. *MVZ Córdoba* 15(1): 1925-1937.
- Brearley, M.J., Hayes, A.M., Murphy, S., 1999, Hypofractionated radiation therapy for invasive thyroid carcinoma in dogs: a retrospective analysis of survival. *J Small Anim Pract* 40, 206-210.
- Brodey, R.S., Kelly, D.F., 1968, Thyroid neoplasms in the dog. A clinicopathologic study of fifty-seven cases. *Cancer* 22, 406-416.
- Bronson, R.T., 1982, Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *Am J Vet Res* 43, 2057-2059.
- Bukhari, U., Sadiq, S., Memon, J.H., Baig, F., 2010, Thyroid carcinoma--experience at Jinnah Postgraduate Medical Centre Karachi. *J Pak Med Assoc* 60, 365-367.
- Cano Valdez A. Aspectos Histológicos del Cáncer Diferenciado de la Tiroides. *Cancerología*. 2009;4:73-83.
- Capen CC: The endocrine glands. In: *Pathology of Domestic Animals*, ed. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, 4th ed., pp. 309–328. Academic Press, San Diego, CA, 1993.
- Capen CC: Tumors of the endocrine glands. In: *Tumors in Domestic Animals*, ed. Meuten DJ, 4th ed., pp. 638–684. Iowa State Press, Ames, IA, 2002.
- Carver, J.R., Kapatkin, A., Patnaik, A.K., 1995, A comparison of medullary thyroid carcinoma and thyroid adenocarcinoma in dogs: a retrospective study of 38 cases. *Vet Surg* 24, 315-319.
- Casey, M.B., Zhang, S., Jin, L., Kajita, S., Lloyd, R.V., 2004, Expression of cyclooxygenase-2 and thromboxane synthase in non-neoplastic and neoplastic thyroid lesions. *Endocr Pathol* 15, 107-116.
- Cass, L.A., Meinkoth, J.L., 2000, Ras signaling through PI3K confers hormone-independent proliferation that is compatible with differentiation. *Oncogene* 19, 924-932.
- Castillo, V.A., Lalia, J.C., Junco, M., Sartorio, G., Marquez, A., Rodriguez, M.S., Pisarev, M.A., 2001, Changes in thyroid function in puppies fed a high iodine commercial diet. *Vet J* 161, 80-84.
- Castillo, V; Pisarev, M; Lalia, J; Rodriguez, MS; Cabrini, R; Márquez, A. Commercial diet induced hypothyroidism due to high iodine. A histological and radiological analysis. *Veterinary Quarterly*: 23 (4): 218-223; 2001.
- Castillo, V; Lalia, J; Rodriguez, MS; Pisarev, M. Morphologic changes in the thyroid glands of puppies fed a high-iodine commercial diet. *The Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 1 (1): 45-50; 2003.
- Castillo, V. Epidemiología Endócrina. En Gómez N y Feijoo, S. *Clínica Médica de Pequeños Animales I*, cap Endocrinología, ed. Aniwa, 2006;121-122.
- Chastain, C.B., 1990, Canine pseudohypothyroidism and covert hypothyroidism. *Probl Vet Med* 2, 693-716.

- Chen Y, Green JA, Antoniou E, Ealy AD, Mathialagan N, Walker AM, Avasle MP, Rosenfeld CS, Hearne LB, Roberts RM. Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology*. 2006;147:2127-2137.
- Cian D., Demarchi R., Gay C., Pérez M. 2004. Patología tiroidea. Casuística de patología benigna y maligna. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*. 135:17-20.http://med.unne.edu.ar/revista/revista135/pat_tiroi.pdf
- Coates, J., 1997, Hipotiroidismo: manifestaciones neurologicas. *Selecciones Veterinarias*, Vol 5,4:314.
- Cocks, H.C., Ramsden, J.D., Watkinson, J.C., Eggo, M.C., 2000, Thyroid stimulating hormone increases angiogenic growth factor expression in rat thyrocytes. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 25, 570-576.
- Cohen, D., Booth, S., Sussman, O., 1959. An epidemiological study of canine lymphoma and its public health significance. *Am J Vet Res* 20:1026-1031.
- Cohen D, Reif JS, Brodey RS, Keiser H., 1974. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Res*. Nov;34(11):2859-68.
- Conroy, J.D. (1983) Canine skin Tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association* 19 (1), 91-115.
- Correa da Costa VM, Moreira DG, Rosenthal D. Thyroid function and aging: gender-related differences. *Journal of Endocrinology*. 2001;171:193-198.
- Chastain, C., Ganjman, V., 1990. *Endocrinología clínica de los animales de compañía*. México D.F.: Editorial Interamericana.
- De Deken, X., Wang, D., Many, M.C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J.E., Miot, F., 2000, Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 275, 23227-23233.
- Deleu, S., Pirson, I., Coulonval, K., Drouin, A., Taton, M., Clermont, F., Roger, P.P., Nakamura, T., Dumont, J.E., Maenhaut, C., 1999, IGF-1 or insulin, and the TSH cyclic AMP cascade separately control dog and human thyroid cell growth and DNA synthesis, and complement each other in inducing mitogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 149, 41-51.
- Dellmann, HD. (1984) Sistema Endócrino. En: Dellmann, HD, Brown, En: *Hitología Veterinaria*, 2 ed, Ed. Acribia, Zaragoza. pp 412-415.
- Devilee, P., Van Leeuwen, I.S., Voesten, A., Rutteman, G.R., Vos, J.H., Cornelisse, C.J., 1994, The canine p53 gene is subject to somatic mutations in thypoid carcinoma. *Anticancer Res* 14, 2039-2046.
- Di Palma, T., Nitsch, R., Mascia, A., Nitsch, L., Di Lauro, R., Zannini, M., 2003, The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem* 278, 3395-3402.
- Dieguéz C, Aguilar E. *Tratado de Endocrinología pediátrica* 2 edición, 1997. Cap 2 Integración neuroendócrina y regulación hormonal de la secreción adenohipofisaria. Pag35.
- Dobson J, Samuel S, Milstein H, Rogers, Wood J. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract* 2002; 43:240-246.
- Dorn, C.R., Taylor, D.O., Frye, F.L., Hibbard, H.H., 1968, Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. I. Methodology and description of cases. *J Natl Cancer Inst* 40, 295-305.

- Dremier, S., Pohl, V., Poteet-Smith, C., Roger, P.P., Corbin, J., Doskeland, S.O., Dumont, J.E., Maenhaut, C., 1997, Activation of cyclic AMP-dependent kinase is required but may not be sufficient to mimic cyclic AMP-dependent DNA synthesis and thyroglobulin expression in dog thyroid cells. *Mol Cell Biol* 17, 6717-6726.
- Dremier, S., Vandeput, F., Zwartkruis, F.J., Bos, J.L., Dumont, J.E., Maenhaut, C., 2000, Activation of the small G protein Rap1 in dog thyroid cells by both cAMP-dependent and -independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 7-11.
- Dumont, J.E., Maenhaut, C., Pirson, I., Baptist, M., Roger, P.P., 1991, Growth factors controlling the thyroid gland. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 5, 727-754.
- Edney, A.T., 1992, Companion animals and human health. *Vet Rec* 130, 285-287.
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Olson, P., Hedhammar, A., 2000a, Gender, age and breed pattern of diagnoses for veterinary care in insured dogs in Sweden during 1996. *Vet Rec* 146, 551-557.
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Olson, P., Hedhammar, A., 2000b, Gender, age, breed and distribution of morbidity and mortality in insured dogs in Sweden during 1995 and 1996. *Vet Rec* 146, 519-525.
- Eng, P.H., Cardona, G.R., Fang, S.L., Previti, M., Alex, S., Carrasco, N., Chin, W.W., Braverman, L.E., 1999, Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 140, 3404-3410.
- Engler, D., Burger, A.G., 1984, The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. *Endocr Rev* 5, 151-184.
- Espinoza, C.R., Schmitt, T.L., Loos, U., 2001, Thyroid transcription factor 1 and Pax8 synergistically activate the promoter of the human thyroglobulin gene. *J Mol Endocrinol* 27, 59-67.
- Evans H.E.(ed): Miller's Anatomy of the dog, 3 rd ed. WB Saunders, Philadelphia, 1993.
- Fabbro, D., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Belfiore, A., Di Lauro, R., Damante, G., 1994, Expression of thyroid-specific transcription factors TTF-1 and PAX-8 in human thyroid neoplasms. *Cancer Res* 54, 4744-4749.
- Fearon, E.R., 1997, Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 278, 1043-1050.
- Feldman EC, Nelson RW. Canine thyroid tumors and hyperthyroidism. In: Feldman EC, Nelson RW, editors. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3rd edition. St. Louis (MO): Saunders; 2004. p. 219-49.
- Feldman y Nelson. *Endocrinología y Reproducción Canina y Felina*. En *Neoplasias tiroideas e Hipertiroidismo en caninos*. Cap5, pag 244-278. 3ªed. editorial Intermedica, 2007.
- Fenwick, M.A., Fitzpatrick, R., Kenny, D.A., Diskin, M.G., Patton, J., Murphy, J.J., Wathes, D.C., 2008, Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol* 34, 31-44.
- Ferris J, García J, Berbel O. 2001. Dieta y cáncer pediátrico. *Rev. Esp. Pediatr.* 57:75-92.
- Flint, A.P., Sheldrick, E.L., Fisher, P.A., 2002, Ligand-independent activation of steroid receptors. *Domest Anim Endocrinol* 23, 13-24.
- Flores, E. (1986) Epidemiología del cáncer en perro y gato. *Monografías Med Vet* 8(2) 39-48.

- Fraker, P.J., King, L.E., 2001, A distinct role for apoptosis in the changes in lymphopoiesis and myelopoiesis created by deficiencies in zinc. *FASEB J* 15, 2572-2578.
- Francis-Lang H, Price M, Policarpou-Schwarz M, Di Lauro R. The promoter of thyroperoxidase gene indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 1992;12:576-588.
- Frascaroli, G.C., 2007. Terapia de Rediferenciación en Cáncer de Tiroides. *RAEM*, vol 44.
- García, B., Santisteban, P. 2002. PI3K is involved in the IGF-1 inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression. *Mol Endocrinol* 16(2):342-52.
- Garcia-Gonzalez, M., Abdulkader, I., Boquete, A.V., Neo, X.M., Forteza, J., Cameselle-Teijeiro, J., 2005, Cyclooxygenase-2 in normal, hyperplastic and neoplastic follicular cells of the human thyroid gland. *Virchows Arch* 447, 12-17.
- Gerard, C.M., Lefort, A., Christophe, D., Libert, F., Van Sande, J., Dumont, J.E., Vassart, G., 1989, Control of thyroperoxidase and thyroglobulin transcription by cAMP: evidence for distinct regulatory mechanisms. *Mol Endocrinol* 3, 2110-2118.
- Gomez, J.M., Maravall, F.J., Gomez, N., Guma, A., Casamitjana, R., Soler, J., 2002, Pituitary-thyroid axis, thyroid volume and leptin in healthy adults. *Horm Metab Res* 34, 67-71.
- Gonzalez, E.P., Carmona, C.A., Araya, Q.A., Miranda, F.K., Massardo, V.T., Jimenez, R.B., Jaimovich, F.R., Gatica, R.H., 2008, [Normal ¹³¹iodine uptake values at 2 and 24 hours]. *Rev Med Chil* 136, 1288-1293.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harari, J., Patterson, J.S., Rosenthal, R.C., 1986, Clinical and pathologic features of thyroid tumors in 26 dogs. *J Am Vet Med Assoc* 188, 1160-1164.
- Haynik, D.M., Prayson, R.A., 2005, Immunohistochemical expression of cyclooxygenase 2 in follicular carcinomas of the thyroid. *Arch Pathol Lab Med* 129, 736-741.
- Henderson, B.E., Ross, R.K., Pike, M.C., Casagrande, J.T., 1982, Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res* 42, 3232-3239.
- Ito, Y., Yoshida, H., Nakano, K., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Yokozawa, T., Matsuzuka, F., Matsuura, N., Kuma, K., Miyauchi, A., 2003, Cyclooxygenase-2 expression in thyroid neoplasms. *Histopathology* 42, 492-497.
- Javaux, F., Bertaux, F., Donda, A., Francis-Lang, H., Vassart, G., DiLauro, R., Christophe, D., 1992, Functional role of TTF-1 binding sites in bovine thyroglobulin promoter. *FEBS Lett* 300, 222-226.
- Jeglum KA, Wreat A. Chemotherapy of canine thyroid carcinoma. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1983;5:96-8.
- Kaptein, E.M., Hays, M.T., Ferguson, D.C., 1994, Thyroid hormone metabolism. A comparative evaluation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 24, 431-466.
- Katoh, R., Kawaoi, A., Miyagi, E., Li, X., Suzuki, K., Nakamura, Y., Kakudo, K., 2000, Thyroid transcription factor-1 in normal, hyperplastic, and neoplastic follicular thyroid cells examined by immunohistochemistry and nonradioactive in situ hybridization. *Mod Pathol* 13, 570-576.
- Kelsey, J.L., Moore, A.S., Glickman, L.T., 1998, Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. *Epidemiol Rev* 20, 204-217.

- Kent MS, Griffery SM, Verstraete FJM, et al. Computer-assisted image analysis of neovascularization in thyroid neoplasms from dogs. *Am J Vet Res* 2002;63:363–9.
- Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J.E., Roger, P.P., 2001, Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 22, 631-656.
- Klein, M.K., Powers, B.E., Withrow, S.J., Curtis, C.R., Straw, R.C., Ogilvie, G.K., Dickinson, K.L., Cooper, M.F., Baier, M., 1995, Treatment of thyroid carcinoma in dogs by surgical resection alone: 20 cases (1981-1989). *J Am Vet Med Assoc* 206, 1007-1009.
- Kondo, T., Nakazawa, T., Ma, D., Niu, D., Mochizuki, K., Kawasaki, T., Nakamura, N., Yamane, T., Kobayashi, M., Katoh, R., 2009, Epigenetic silencing of TTF-1/NKX2-1 through DNA hypermethylation and histone H3 modulation in thyroid carcinomas. *Lab Invest* 89, 791-799.
- Lacroix, L., Michiels, S., Mian, C., Arturi, F., Caillou, B., Filetti, S., Schlumberger, M., Bidart, J.M., 2006, HEX, PAX-8 and TTF-1 gene expression in human thyroid tissues: a comparative analysis with other genes involved in iodide metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64, 398-404.
- Larimore TC, Moley JF. Cancer of the endocrine system. Section 1. Molecular biology of endocrine tumors. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles and practice of oncology*. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.p. 1727–840.
- Larsen PR, Berry MJ. Type I iodothyronine deiodinase: unexpected complexities in a simple deiodination reaction. *Thyroid*. 1994 Fall;4(3):357-62.
- Leav, I., Schiller, A.L., Rijnberk, A., Legg, M.A., der Kinderen, P.J., 1976, Adenomas and carcinomas of the canine and feline thyroid. *Am J Pathol* 83, 61-122.
- Leblanc, B., Parodi, A.L., Lagadic, M., Hurtrel, M., Jobit, C., 1991, Immunocytochemistry of canine thyroid tumors. *Vet Pathol* 28, 370-380.
- Lehninger. *Principios de Bioquímica*. Eds: Nelson DL, Cox MN. Tercera Edición. 2000. Freeman and Company, New York, NY and Basingstoke.
- Lingaas, F., Comstock, K.E., Kirkness, E.F., Sorensen, A., Aarskaug, T., Hitte, C., Nickerson, M.L., Moe, L., Schmidt, L.S., Thomas, R., Breen, M., Galibert, F., Zbar, B., Ostrander, E.A., 2003, A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German Shepherd dog. *Hum Mol Genet* 12, 3043-3053.
- Liptak, J.M., 2007, Canine thyroid carcinoma. *Clin Tech Small Anim Pract* 22, 75-81.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lurye, J.C., Behrend, E.N., 2001, Endocrine tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 31, 1083-1110, ix-x.
- MacKenzie, S.J., Baillie, G.S., McPhee, I., MacKenzie, C., Seamons, R., McSorley, T., Millen, J., Beard, M.B., van Heeke, G., Houslay, M.D., 2002, Long PDE4 cAMP specific phosphodiesterases are activated by protein kinase A-mediated phosphorylation of a single serine residue in Upstream Conserved Region 1 (UCR1). *Br J Pharmacol* 136, 421-433.
- Manole, D., Schildknecht, B., Gosnell, B., Adams, E., Derwahl, M., 2001, Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1072-1077.

- Mansberger, A.R., Jr., Wei, J.P., 1993, Surgical embryology and anatomy of the thyroid and parathyroid glands. *Surg Clin North Am* 73, 727-746.
- Martínez de Merlo E, Pérez Díaz C. Influencia de la edad en el desarrollo del cáncer. How age can influence on cancer development. *RECVET*: 2007, Vol. II, N° 01-04 <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet>.
- Mayayo E, Santisteban P, Vincens-Calvet E. Patología Tiroidea fetal y noenatal. En: Argente Olivers J, Carrascosa Lezcano A, García Bouthelie R, Rodríguez Hierro F. *Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia 2ª ed.* Barcelona: Doyma; 2000. p. 647-700.
- Medeiros-Neto G, Knobel M, DeGroot LJ. Genetic disorders of the thyroid hormone system. In: Baxter JD, (eds). *Genetics in Endocrinology*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2002, p 375-402.
- Medina, D.L., Santisteban, P., 2000, Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems. *Eur J Endocrinol* 143, 161-178.
- Medina, D.L., Suzuki, K., Pietrarelli, M., Okajima, F., Kohn, L.D., Santisteban, P., 2000, Role of insulin and serum on thyrotropin regulation of thyroid transcription factor-1 and pax-8 genes expression in FRTL-5 thyroid cells. *Thyroid* 10, 295-303.
- Meikle, A., Bielli, A., Masironi, B., Pedrana, G., Wang, H., Forsberg, M., Sahlin, L., 2000, An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reprod Nutr Dev* 40, 587-596.
- Miccadei, S., De Leo, R., Zammarchi, E., Natali, P.G., Civitareale, D., 2002, The synergistic activity of thyroid transcription factor 1 and Pax 8 relies on the promoter/enhancer interplay. *Mol Endocrinol* 16, 837-846.
- Mitchell, P.J., Tjian, R., 1989, Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-378.
- Moore, F.M., Kledzik, G.S., Wolfe, H.J., DeLellis, R.A., 1984, Thyroglobulin and calcitonin immunoreactivity in canine thyroid carcinomas. *Vet Pathol* 21, 168-173.
- Morand, S., Agnandji, D., Noel-Hudson, M.S., Nicolas, V., Buisson, S., Macon-Lemaitre, L., Gnidehou, S., Kaniewski, J., Ohayon, R., Virion, A., Dupuy, C., 2004, Targeting of the dual oxidase 2 N-terminal region to the plasma membrane. *J Biol Chem* 279, 30244-30251.
- Moretti, F., Nanni, S., Pontecorvi, A., 2000, Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14, 517-539.
- Naderi, A., Ahmed, A.A., Barbosa-Morais, N.L., Aparicio, S., Brenton, J.D., Caldas, C., 2004, Expression microarray reproducibility is improved by optimising purification steps in RNA amplification and labelling. *BMC Genomics* 5, 9.
- Nelson RW. Disorders of the thyroid gland. In: Nelson RW, Couto CG. *Small Animal Internal Medicine*. St. Louis: Mosby; 1998:729-732.
- Ogilvie, G.K., Reynolds, H.A., Richardson, R.C., Withrow, S.J., Norris, A.M., Henderson, R.A., Klausner, J.S., Fowler, J.D., McCaw, D., 1989, Phase II evaluation of doxorubicin for treatment of various canine neoplasms. *J Am Vet Med Assoc* 195, 1580-1583.
- Ogilvie GK: Tumors of the endocrine system. In Withrow SJ, MacEwan EG(eds): *Small Animal Clinical Oncology*, 2nd ed . WB Saunders. Philadelphia, 1996, p 310.
- Ohno, M., Zannini, M., Levy, O., Carrasco, N., di Lauro, R., 1999, The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide

- symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 19, 2051-2060.
- Pack, L., Roberts, R.E., Dawson, S.D., Dookwah, H.D., 2001, Definitive radiation therapy for infiltrative thyroid carcinoma in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 42, 471-474.
- Palos-Paz, F., Perez-Guerra, O., Cameselle-Teijeiro, J., Rueda-Chimeno, C., Barreiro-Morandeira, F., Lado-Abeal, J., Araujo Vilar, D., Argueso, R., Barca, O., Botana, M., Cabezas-Agricola, J.M., Catalina, P., Dominguez Gerpe, L., Fernandez, T., Mato, A., Nuno, A., Penin, M., Victoria, B., 2008, Prevalence of mutations in TSHR, GNAS, PRKAR1A and RAS genes in a large series of toxic thyroid adenomas from Galicia, an iodine-deficient area in NW Spain. *Eur J Endocrinol* 159, 623-631.
- Pancieria DL, Lanz OI, Vail DM. 2004 Treating thyroid and parathyroid neoplasia in dogs and cats. *Vet Med* 99: 154.
- Parmentier, M., Libert, F., Maenhaut, C., Lefort, A., Gerard, C., Perret, J., Van Sande, J., Dumont, J.E., Vassart, G., 1989, Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* 246, 1620-1622.
- Pasca di Magliano, M., Di Lauro, R., Zannini, M., 2000, Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13144-13149.
- Patnaik, A.K., Lieberman, P.H., 1991, Gross, histologic, cytochemical, and immunocytochemical study of medullary thyroid carcinoma in sixteen dogs. *Vet Pathol* 28, 223-233.
- Peterson, M.; Ferguson, D. (1992) Tiropatías. En Ettinger, S (ed): Tratado de Medicina Interna Veterinaria. 3ªde. Inter-vet, Buenos Aires, Argentina, pp 1716-1725.
- Pfaffl, M.W., Georgieva, T.M., Georgiev, I.P., Ontsouka, E., Hageleit, M., Blum, J.W., 2002, Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domest Anim Endocrinol* 22, 91-102.
- Pierce, J.G., Parsons, T.F., 1981, Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50, 465-495.
- Pisarev M. A., Juvenal G., 2010. Cáncer de Tiroides: Aspectos Moleculares y Nuevas Terapias. En Separata Montpellier 2010 - Vol. 18 N°3.
- Pocock, G., Richards, C.D., 2005. Regulación hormonal del organismo. En Fisiología Humana: La base de la Medicina. Elseiver, España, pp 229-230.
- Pollak, M.N., 2004, Insulin-like growth factors and neoplasia. *Novartis Found Symp* 262, 84-98; discussion 98-107, 265-108.
- Priester, W.A., Mantel, N., 1971, Occurrence of tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. *J Natl Cancer Inst* 47, 1333-1344.
- Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., Johnson, G.C., Pace, L.W., 2002, Immunohistochemical detection of thyroid transcription factor-1, thyroglobulin, and calcitonin in canine normal, hyperplastic, and neoplastic thyroid gland. *Vet Pathol* 39, 480-487.
- Reif, J.S., 2009. Epidemiología e Incidencia del Cáncer. En Withrow, S.J., Vail, D.M., 2007. Oncología clínica de pequeños animales. 4ta ed. Barcelona. Elsevier, pp 69-78.
- Reimann, N., Nolte, I., Bonk, U., Werner, M., Bullerdiek, J., Bartnitzke, S., 1996, Trisomy 18 in a canine thyroid adenoma. *Cancer Genet Cytogenet* 90, 154-156.

- Rivas, M., Santisteban, P., 2003, TSH-activated signaling pathways in thyroid tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol* 213, 31-45.
- Rivolta, C.M., Moya, C.M., Esperante, S.A., Gutnisky, V.J., Varela, V., Targovnik, H.M., 2005, [The thyroid as a model for molecular mechanisms in genetic diseases]. *Medicina (B Aires)* 65, 257-267.
- Roger, P.P., Dumont, J.E., 1987, Thyrotropin is a potent growth factor for normal human thyroid cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 149, 707-711.
- Roger, P.P., Hotimsky, A., Moreau, C., Dumont, J.E., 1982, Stimulation by thyrotropin, cholera toxin and dibutyryl cyclic AMP of the multiplication of differentiated thyroid cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 26, 165-176.
- Rosai J. Thyroid gland. In: Ackerman's Surgical Pathology, ed. Rosai J, 8th ed., pp. 500, 552. Mosby-Year Book, St Louis, MO, 1996.
- Rossella Elisei, Aldo Pinchera, Cristina Romei, Maria Gryczynska, Viviane Pohl, Carine Maenhaut, Laura Fugazzola, and Furio Pacini. Expression of Thyrotropin Receptor (TSH-R), Thyroglobulin, Thyroperoxidase, and Calcitonin Messenger Ribonucleic Acids in Thyroid Carcinomas: Evidence of TSH-R Gene Transcript in Medullary Histotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78(4):867-871.
- Santisteban, P. Mecanismos moleculares implicados en la función tiroidea. En *Endocrinología*, Arce, Victor M, Catalina Pablo F, Mallo Federico. Universidad de Santiago de Compostella, Universidad de Vigo, p 161-168.
- Scavelli T.D., Peterson M.E.: The thyroid. In Slatter D (ed): *Textbook of Small Animal Surgery*, 2nd ed. WB Saunders, Philadelphia, 1992, p 1514.
- Scott-Moncrieff, J.C.; Nelson, R.W. (1998) Change in serum thyroid-stimulating hormone concentration in response to administration of thyrotropin-releasing hormone to healthy dogs, hypothyroid dogs, and euthyroid dogs with concurrent disease. *J. Am Vet Med Assoc.* Nov 15; 213(10): 1435-8.
- Schams, D., Kohlenberg, S., Amselgruber, W., Berisha, B., Pfaffl, M.W., Sinowatz, F., 2003, Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J Endocrinol* 177, 305-317.
- Schreiderman, M.A., Levin, D.L., 1980, Needs, problems and prospects in cancer epidemiology. *Cancer Epidemiology in the USA Y USSR.* Us dep. Of Health and Human Services Natr. Canc. Inst. Bethesda. Maryland.
- Schlumberger, M.J., 1998, Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 338, 297-306.
- Segev, D.L., Umbricht, C., Zeiger, M.A., 2003, Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg Oncol* 12, 69-90.
- Shupnik, M.A., Ridgway, E.C., Chin, W.W., 1989, Molecular biology of thyrotropin. *Endocr Rev* 10, 459-475.
- Soh, E.Y., Sobhi, S.A., Wong, M.G., Meng, Y.G., Siperstein, A.E., Clark, O.H., Duh, Q.Y., 1996, Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery* 120, 944-947.
- Sosa, C., Abecia, J.A., Carriquiry, M., Vazquez, M.I., Fernandez-Foren, A., Talmon, M., Forcada, F., Meikle, A., 2009, Effect of undernutrition on the uterine environment during maternal recognition of pregnancy in sheep. *Reprod Fertil Dev* 21, 869-881.

- Sosa, C., Gonzalez-Bulnes, A., Abecia, J.A., Forcada, F., Meikle, A., 2010, Short-term undernutrition affects final development of ovulatory follicles in sheep synchronized for ovulation. *Reprod Domest Anim* 45, 1033-1038.
- Sullivan M, Cox F, Peard MJ, et al. 1987, Thyroid tumours in the dog. *J Small Anim Pract*;28: 505–12.
- Theon, A.P., Marks, S.L., Feldman, E.S., Griffey, S., 2000, Prognostic factors and patterns of treatment failure in dogs with unresectable differentiated thyroid carcinomas treated with megavoltage irradiation. *J Am Vet Med Assoc* 216, 1775-1779.
- Thorner, M; Vance, M; Laws, E; Horwart, E; Kovacs, K., 1998 The anterior pituitary. In: Wilson, Foster, Kronenberg, Larsen (eds.): *Williams Textbook of Endocrinology*, 9th ed, W.B. Saunders, Philadelphia , 263- 266.
- Turrel, J.M., McEntee, M.C., Burke, B.P., Page, R.L., 2006, Sodium iodide I 131 treatment of dogs with nonresectable thyroid tumors: 39 cases (1990-2003). *J Am Vet Med Assoc* 229, 542-548.
- Van Renterghem, P., Vassart, G., Christophe, D., 1996, Pax 8 expression in primary cultured dog thyrocyte is increased by cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta* 1307, 97-103.
- Venzke, W.G. 1982. Endocrinología de los carnívoros. En: Getty, R (ed). S. Sisson, J.D. Grossman: *Anatomía de los animales domésticos*, 5ª ed, Salvat Editores, Barcelona, pp1743-1744.
- Verschuere, C., 1992, Thyroid cancer research in the dog: anno 1992. *Tijdschr Diergeneeskde* 117 Suppl 1, 26S-27S.
- Verschuere, C.P., Rutteman, G.R., Vos, J.H., Van Dijk, J.E., de Bruin, T.W., 1992, Thyrotrophin receptors in normal and neoplastic (primary and metastatic) canine thyroid tissue. *J Endocrinol* 132, 461-468.
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 2004, Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- Withrow, S.J., Vail, D.M., 2007. *Oncología clínica de pequeños animales*. 4ta ed. Barcelona. Elsevier, pp 69-76.
- Worth AT, Zuber RM, Hockin M. 2005, Radioiodide (131I) therapy for the treatment of canine thyroid carcinoma. *Aust Vet J*;83:208–14.
- Wucherer, K.L., Wilke, V., 2010, Thyroid cancer in dogs: an update based on 638 cases (1995-2005). *J Am Anim Hosp Assoc* 46, 249-254.
- Wu SH, Weber WJ, Chester-Jones H, Hansen LB, Crooker BA. Effects of intake, selection for milk yield, and bST administration on hepatic expression of insulin receptors and components of the somatotrophic axis in growing Holstein heifers. *J Dairy Sci*. 2004; 87: (Suppl. 1) 364 Abstract W 205.
- Zannini, M., Francis-Lang, H., Plachov, D., Di Lauro, R., 1992, Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol Cell Biol* 12, 4230-4241.
- Zarrilli, R., Formisano, S., Di Jeso, B., 1990, Hormonal regulation of thyroid peroxidase in normal and transformed rat thyroid cells. *Mol Endocrinol* 4, 39-45.
- Zubelewicz, B., Muc-Wierzgon, M., Wierzgon, J., Romanowski, W., Mazurek, U., Wilczok, T., Podwinska, E., 2002, Genetic dysregulation of gene coding tumor necrosis factor alpha receptors (TNF alpha Rs) in follicular thyroid cancer--preliminary report. *J Biol Regul Homeost Agents* 16, 98-104.

13. ANEXO 1

**CASOS DE CARCINOMA TIROIDEO REGISTRADOS EN EL HOSPITAL DE
LA FACULTAD DE VETERINARIA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

2005-2010

| Año | Raza | Sexo | Edad (años) | Signos clínicos | Metástasis | Biopsia | Histopatología | Observaciones |
|------|-----------------|--------|-------------|---|----------------|--|------------------------------------|---|
| 2006 | Doberman | Macho | 7 | Deformación En zona de cuello de 5cm de diámetro, disfonía, disfagia | No | Si: carcinoma tiroideo bien diferenciado | No | 2006: cirugía, tiroidectomía 2008: recidiva, nueva cirugía |
| 2007 | Cruza | Hembra | 10 | Deformación en más en zona ventral de cuello, vómitos disfagia, reflejo tusígeno positivo | No | Si: carcinoma , probablemente tiroideo | No | 2007: Eutanasia |
| 2008 | Pastor Alemán | Macho | 11 | Tumoración a nivel ventral de cuello, vómitos, disfagia, disfonía | No | Si: cuadro compatible con carcinoma tiroideo | No | No |
| 2009 | Cruza | Hembra | 7 | Tumoración en zona ventral de cuello, disfagia | No | Si: compatible con proceso tumoral, podría estar vinculado a glándula tiroides | Si: carcinoma tiroideo compacto | 2010: eutanasia |
| 2010 | Shih-tsu | Macho | 12 | Deformación en más en ventral de cuello | Si: en abdomen | Si: compatible con carcinoma tiroideo | No | Rx: masa mediastínica craneal. Cirugía inviable por presencia de metástasis |
| 2010 | Pit bull | Hembra | 6 | Disfagia, deformación en ventral de cuello | No | No | Si: carcinoma folicular | Ecografía: Masa de 4 x 3cm de ecotextura sólida, heterogénea, compatible con proceso expansivo de tiroides. 9/4/10 cirugía (tiroidectomía derecha) |
| 2010 | Goden Retriever | Macho | 9 | Tumoración en zona ventral de cuello | No | Si: compatible con carcinoma tiroideo | Si: Carcinoma compacto a folicular | Ecografía: tumor tiroideo de 25,98cm ³ , aspecto heterogéneo, bordes bien definidos. 8/11/10 cirugía (tiroidectomía) Testículo tumor células leydig. |

ANEXO 2

TRABAJO ENVIADO A REVISTA ARBITRADA

RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE

**Expression of thyroid-specific transcription factors in thyroid carcinoma,
contralateral thyroid lobule and healthy thyroid gland in dogs**

Pessina, P.^{a*}, Castillo, V.^b, Araújo, M.^a, Carriquiry M^c, Meikle, A.^a

^aLaboratory of Nuclear Techniques, Veterinary Faculty, Lasplacas 1550, 11600, Montevideo, Uruguay.

^bArea Clínica Médica Pequeños Animales, U. Endocrinología, Htal. Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

^cAnimal Production Department, Agronomy Faculty, Garzon 2382, Montevideo, Uruguay.

*Corresponding autor: Tel/Fax: 00598-26223106, E-mail: ppessina@hotmail.com

Abstract

Thyrotropin receptor (*TSH-R*), thyroglobulin (*Tg*), thyroperoxidase (*TPO*), thyroid specific transcription factor-1 (*TTF-1*), paired box 8 transcription factor (*PAX-8*), insulin like growth factor (*IGF-1*) and estrogen receptor alpha (*ERα*) transcripts were determined by real-time PCR in follicular carcinoma and contra-lateral (CL) lobes, and healthy thyroid canine glands. Concentrations of *TSH-R*, *PAX-8*, *IGF-1*, *ERα* mRNA were not different between groups; the carcinoma group had lower *Tg* and *TPO* mRNA than the healthy and CL groups, while no differences were found among these latter groups, suggesting that the carcinoma tissue presents an altered capacity to synthesize thyroid hormones. The transcription factor that promotes thyrocytes proliferation, *TTF-1*, presented a greater mRNA expression in the CL group, suggesting that the CL lobe may function in a compensatory state.

Keywords: thyroid carcinoma, gene expression, canine.

1. Introduction

Thyroid carcinomas is a common form of endocrine neoplasia in dogs (Barber, 2007; Cano Valdez, 2009); being 6 % of a total of 500 endocrine pathologies in dogs at the Hospital School of the Veterinary Science Faculty, University of Buenos Aires, Argentina (Castillo, 2006). The median age of presentation is 9 to 10 years in almost all studies (Brodey and Kelly, 1968; Leav *et al.*, 1976; Patnaik and Lieberman, 1991; Carver *et al.*, 1995; Turrel *et al.*, 2006). In humans, thyroid cancer is more common in females (Henderson *et al.*, 1982; Bukhari *et al.*, 2010), however, in dogs no sex predisposition was evident (Leav *et al.*, 1976; Wucherer and Wilke, 2010). The majority of the carcinomas are unilateral and nonfunctional and most dogs are described as clinically euthyroid (Liptak, 2007). The signalment of dogs with benign or malignant thyroid tumors is similar: clinical signs are usually the result of impingement on the surrounding structures: cough, dysphagia, dysphonia and dyspnea (Birchard and Roesel, 1981; Harari *et al.*, 1986); although in our experience the majority of the dogs show a mass in the thyroid anatomical area being discovered by the owners, and only a 1% of the cases had the symptoms mentioned. The prognosis and treatment strategies for canine thyroid carcinomas depend in large part on the size and invasiveness of the tumor as well as on the presence of metastasis (Barber, 2007).

Carcinomas of the thyroid gland in dogs usually arise from the epithelial cells that line the colloid follicles and may be classified according to the degree of differentiation. In humans, differentiated carcinomas such as the papillary and the follicular, retain in part the biological features of the normal thyroid cells (Rossella *et al.*, 1994). Similarly, in dogs, Thyrotropin (TSH) binding in canine thyroid carcinoma did not differ from that in normal canine thyroid tissue (Verschueren *et al.*, 1992), and the authors suggested that TSH may continue to act as a growth factor for the tumor. In canine thyroid cells, insulin like growth factor I (IGF-I) allow the mitogenic effect of *TSH* and stimulate by itself protein synthesis and cell growth (Deleu *et al.*, 1999). Besides, TSH is considered the main regulator of thyrocyte differentiation and proliferation (Rivas and Santisteban, 2003) and it has been clearly demonstrated that TSH regulates mRNA levels of several

thyroid-specific genes such as thyroglobulin (*Tg*) and thyroperoxidase (*TPO*) (Avvedimento *et al.*, 1984; Gérard *et al.*, 1989b; Zarrilli *et al.*, 1990).

The molecular mechanism by which TSH controls *Tg* and *TPO* gene expression, and the potential involvement of the transcription factors which are known to bind to their promoter regions have not been elucidated yet. The activity of transcription factors is in fact considered as the main switch to regulate gene expression (Mitchell and Tjian, 1989). In humans, two transcription factors, thyroid-specific transcription factor-1 (*TTF-1*) and paired box 8 transcription factor (*PAX-8*) bind to the sequence of *Tg* and *TPO* promoters and they are able to activate transcription of these genes (Francis-Lang *et al.*, 1992; Zannini *et al.*, 1992). Moreover, it has been proposed that *TTF-1* and *PAX-8* simultaneously cooperate in the stimulation of *TPO* and *Tg* genes in the human thyroid gland (Espinoza *et al.*, 2001; Miccadei *et al.*, 2002). In dogs, we were not able to find studies considering the regulation of *Tg* and *TPO* expression in healthy thyroid glands. In contrast, various studies that aimed to find a proper molecular marker for thyroid carcinoma differentiation reported that *TTF-1* is a good marker of thyroid differentiation that can be used in conjunction with *Tg* (Katoh *et al.*, 2000; Ramos-Vara *et al.*, 2002; Aupperle *et al.*, 2003).

In this study we aimed to investigate the expression of thyroid specific genes in carcinoma and healthy thyroid gland. Moreover, taking into account that most dogs with carcinoma are described as clinically euthyroid (Liptak, 2007), we hypothesized that the healthy thyroid lobule functions in a compensatory state by increasing its functionality. Thus, the objectives of this study were to investigate the gene thyroid expression of *TSH-R* (thyrotropin receptor), *Tg*, *TPO*, *IGF-I*, *TTF-1* and *PAX-8* genes in healthy and sick lobules in carcinoma and healthy dogs. Since a gender effect on the thyroid cancer in other species was observed (Henderson *et al.*, 1982), estrogen receptor alpha (*ERα*), a potent mitogenic factor that has been related to growth of human thyroid tumor (Manole *et al.*, 2001), was also determined.

2. Materials and methods

The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Sciences of the University of Buenos Aires and by the Secretaría de Ciencia y Técnica (Secretariat of Science and Techniques) and by the Veterinary Faculty, University of Uruguay, Uruguay. Dog owners gave their signed consent for the participation of their animals in this study.

2.1 Tissue and blood samples

Tissue samples selected were as follows: normal thyroid tissue specimens were obtained from healthy animals euthanized after suffering severe trauma (Healthy group, n = 7; 3 intact females and 4 intact males), differentiated thyroid carcinomas (Carcinoma group, n = 8; 6 intact females and 2 intact males); from this group, thyroid tissue was obtained from the contralateral lobe in 4 animals (Contralateral lobule group, CL group, n = 4; 3 females and 1 male). The tissue samples were collected at the Endocrinology Unit, Veterinary Faculty, University of Buenos Aires, Argentina and at the Veterinary Hospital, Veterinary Faculty, University of Uruguay. All tissue specimens were frozen and stored at -80°C in liquid nitrogen before use for RNA extraction. Thyroid tissue samples were processed in the Laboratory of Nuclear Techniques, Veterinary Faculty, Montevideo, Uruguay.

The diagnosis of thyroid carcinomas was confirmed by histopathological examination (Table 1).

2.2 Plasma TSH and fT4 (free thyroxine) concentrations

Hormonal determination was performed only in the pathological cases. Plasma TSH concentrations were determined by an immunoradiometric assay (IRMA) using DPC commercial kits (Coat-A-Count; Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA). The sensitivity of the assay was 0.03 ng/mL. The intra-assay coefficient of variation for low (0.26 ng/mL) and high (3.1 ng/mL) concentrations of TSH were 9.5% and 2%, respectively. Free thyroxine concentrations were determined by a direct solid-phase radioimmunoassay (RIA) using DPC commercial kits. The RIA had a

sensitivity of 0.01 ng/dL. The intra-assay coefficients of variation for low (0.2 ng/dL) and high controls (3.9 ng/dL) were 8.5% and 4.1 %, respectively.

2.3 RNA isolation and reverse transcription

Total RNA from thyroid was extracted using TRIZOL (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) followed by precipitation with lithium chloride to remove inhibitors of cDNA synthesis and by DNase-treatment with DNA-FreeTM Kit (Ambion, Austin, TX, USA) to remove contaminating DNA (Naderi et al., 2004). RNA concentration was determined by measuring absorbance at 260 nm, the purity of all RNA isolates was assessed from 260/280 absorbance ratio and the integrity by electrophoresis (1% agarose gel). All samples presented $A_{260/280}$ ratios between 1.8 and 2.0. For each sample, cDNA was synthesized by reverse transcription using the SuperScript III First-Strand Synthesis System Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with random primers and 1,5 µg total RNA added as a template.

2.4 Quantitative real time PCR

Since two splicing variants of dog Pax 8 (*PAX-8a* *PAX-8g*) were described (Van Renterghem *et al.*, 1996), both of them were determined. Primers to specifically amplify cDNA of *TSH-R*, *Tg*, *TPO*, *PAX-8a*, *PAX-8g* and *TTF-1*, were designed based on canis lupus familiaris nucleotide sequences available from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Primer sequences for *ERα* and *IGF-I* were obtained from the literature (Pfaffl *et al.*, 2002; Schams *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). The products of PCR were sent to Macrogen (Korea) for sequencing. The identity of the sequences were concealed by Blast in the Gene Bank. The primer sequences are presented in Table 2. The level of expression of ribosomal protein L19 (*RPL19*) was used as an endogenous control, using the primer sequences of Chen *et al.* (2006). The expression of the *RPL19* gene was tested in a pilot study under our conditions and it proved to be a good housekeeping gene because it exhibited minimum variation across individuals and treatments, as was shown in other ovine tissues previously (Sosa *et al.*, 2009a; Sosa *et al.*, 2009b). As is shown in the Figure 1, data of cycles to the threshold (CT) did not differ among groups. Amplification reactions were performed in a final volume of 20µL containing 10µL SYBR Green master mix (Quantimix EASY SYG kit;

Biotoools BandM Laboratories, Madrid, Spain), 500 nm forward and reverse primers (Operon Biotechnologies, Cologne, Germany) and 3 μ L diluted cDNA (1 : 7.5 in RNase/DNase-free water). Samples were analysed in duplicate in a 72-disk Rotor-GeneTM 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, NSW, Australia).

Standard amplification conditions were 10 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 95°C, 45 s at 60°C and 20 s at 72°C. For quantification, standard curves were generated by amplifying serial dilutions of each amplicon according to Fenwick *et al.* (2006). To standardise quantitative gene expression measurements for differences in cellular input, RNA quality and RT efficiency among samples, data for gene expression were analysed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, which implies normalisation against the endogenous control (*RPL19*; Livak and Schmittgen (2001)).

2.5 Statistical analysis

Data were analyzed in a incomplete randomized block design with the Statistical Analysis System program (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Univariate analyses of the data were performed on all variables to identify outliers and to verify normality of residuals. Transcript data were analyzed using the mixed procedure with a model that included the effects of group (Healthy group, Carcinoma group and Contralateral lobe group) as fixed effect and PCR run and dog as random effects. The Kenward-Rogers procedure was used to adjust the denominator degree of freedom. Besides, gender effect was analysed only in the healthy group, since only two males were included in the carcinoma group. Pearson correlation coefficient was used to describe relationships between variables Data are presented as least square means \pm pooled standard errors and means were considered to differ when $P < 0.05$ and a trend identified when $0.05 < P < 0.10$.

3. Results

3.1 Gender effect on gene transcription in the healthy animals

In the healthy group, the expression of *TSH-R* mRNA was greater in females than males ($X \pm$ pooled standard error, relative expression): 1.84 ± 0.23 vs 0.71 ± 0.19 respectively, $P=0.021$. The same pattern was observed for *Tg* mRNA, females tended to show higher expression than males: 1.25 ± 0.25 vs 0.52 ± 0.22 respectively, $P=0.06$.

For the other genes analysed, *TPO*, *TTF-1*, *PAX-8*, *IGF-1*, *ER α* , no gender differences on mRNA expression were found.

3.2 Gene expression in the thyroid gland of carcinoma, contralateral lobule and healthy groups

The gene thyroid expression of *TSH-R*, *Tg*, *TPO*, *TTF-1* genes in healthy animals, carcinoma thyroid lobule and in contralateral thyroid lobule are shown in Figure 2.

The expression of *TSH-R* mRNA was not different between groups.

Tg, *TPO* and *TTF-1* mRNAs were affected by the group ($P=0.012$, $P=0.0003$ and $P=0.046$, respectively).

The carcinoma group had lower *Tg* mRNA and *TPO* mRNA than the healthy and CL group, $P < 0.05$, while no differences were found among these latter groups.

The *TTF-1* mRNA expression was greater in the CL group than in healthy and carcinoma group ($P < 0.05$), which did not differ.

The level of expression of *PAX-8a*, *PAX-8g*, *IGF-1* and *ER α* mRNA was not different between groups (Figure 3).

3.3 Correlation analysis

The analysis of the correlation of these genes expression in healthy tissues described two groups: *TSH-R*, *TTF-1*, *IGF-1* and *ER α* were correlated among them, while in the other group *Tg*, *TPO*, *PAX-8a* and *PAX-8g* were considered. *TSH-R*, *IGF-1* and *ER α* were highly and positively correlated (r values ranged from 0.86 to 0.99), while *TTF-1* presented a medium correlation coefficient with these other genes (0.45 to 0.58).

PAX-8a/g presented a medium correlation (r values from 0.52 to 0.59) with *Tg* mRNA, but not with *TPO*. *Tg* and *TPO* were positively correlated ($r=0.64$, $P=0.003$).

4. Discussion

In healthy animals, the thyroid *TSH-R* mRNA and *Tg* mRNA expression were greater in females than males, and we did not find similar reports in dogs. In other species, few studies have analyzed the effects of the gender on thyroid gland expression. In rats, *TPO* and *Tg* mRNA expression was decreased by about 50% in the young female as compared with the young males (Correa da Costa *et al.*, 2001). In woman, thyroid 131 iodine uptake was higher than in man (González *et al.*, 2008), and thyroid volume was higher in males (Gómez *et al.*, 2002). It has been suggested that sex steroids may influence thyroid growth by modulating their receptors concentration in the thyroid (Banu *et al.*, 2002). Moreover, androgen and estrogen receptor (ER) are not only present in the thyroid gland but they are also up-regulated by their respective hormones (Banu *et al.*, 2001). As far as we know, this is the first report of ER α in canine thyroid gland, which expression did not differ among gender. Similar results were reported in humans, although a growth stimulatory effect of 17 β -estradiol on benign and malignant human thyroid cells was reported (Manole *et al.*, 2001), which may explain why thyroid tumors and carcinomas are 3 times more frequent in woman than in man (Henderson *et al.*, 1982). On the other hand, in this study, *TSH-R* mRNA was higher in females which is consistent with Banu *et al.* (2001) that reported that estradiol stimulated TSH-binding in rat females and inhibited it in males. The higher *Tg* mRNA expression in females could be related to a higher TSH sensitivity of the thyroid gland (TSH-R), but no other gene was affected by gender.

TSH is considered the main regulator of thyrocyte differentiation and proliferation (Rivas and Santisteban, 2003) and it was suggested that TSH may continue to act as a growth factor for the tumor (Verschuere *et al.*, 1992). The origin of all tumors was follicular; which is in agreement with most reports in dogs (Ramos-Vara *et al.*, 2002; Barber, 2007). Although, messenger expression of the receptor may not always reflect the actual protein tissue expression as we have found previously in sheep (Meikle *et al.* 2000, Sosa *et al.* 2009a), and that several post-transcriptional events may alter protein expression, no differences were found in *TSH-R* mRNA expression among healthy, carcinoma and contralateral lobule (CL) groups. This is in agreement with Verschuere *et al.* (1992), that characterized TSH-receptor binding in normal thyroid tissues and thyroid neoplasms in dogs. It has been clearly demonstrated that *TSH* regulates mRNA

levels of several thyroid-specific genes such as *Tg* and *TPO*. In contrast to *TSH-R* mRNA results, *Tg* and *TPO* mRNA expression were lower in the carcinoma group than in healthy animals and CL groups, suggesting that the synthesis of the thyroid hormones by the carcinoma tissue is diminished. In dogs, while no reports on TPO in thyroid carcinoma were found, several reports are consistently showing that Tg is detected in 90–100% of the thyroid carcinomas (Moore *et al.*, 1984; Patnaik *et al.*, 1991; Leblanc *et al.*, 1991). This discrepancy could be due to the fact that these latter studies determined Tg protein, while we measure the transcript. In contrast, in humans, both *Tg* and *TPO* gene expression in differentiated carcinomas was highly heterogeneous (Fabbro *et al.*, 1994).

Tg and *TPO* genes are regulated by two transcription factors, *TTF-1* and *PAX 8* that are present together only in the thyroid follicular cell, suggesting that this unique combination could play a role in the expression of the thyroid –specific phenotype (Fabbro *et al.*, 1994). Although this study considered a small number of animals, one of the most interesting findings of this study was the almost 3-fold increase in *TTF-1* expression in the contralateral thyroid lobule when compared to the healthy and carcinoma group. *TTF-1* is considered a mitogenic factor involved in proliferation and cell differentiation (Ramos-Vara *et al.*, 2002; Lacroix *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2009), thus, it can be speculated that this increased expression in the contralateral lobe could be associated to hyperplasia to compensate the loss of function of the sick lobe, in order to maintain the euthyroid state. Moreover, this idea is reinforced by the low *Tg* and *TPO* mRNA expression in the carcinoma tissue, which suggest a dysfunction of the affected lobe to synthesize thyroid hormones. Overall, mRNA expression data from both the carcinoma and contralateral lobe may explain why in 7 out of 8 of the dogs with thyroid carcinoma in this study presented TSH and fT4 values within the normal range, as has been reported for the majority of dogs (Barber, 2007; Nelson, 1998). On the other hand, a smaller percentage of the dogs with thyroid carcinoma present hypothyroidism - as one of the dogs of this study-; in these cases an altered gene expression of the healthy lobe can be proposed, since it has been demonstrated that is inhibited by cytokines released by the diseased lobe (Dumont *et al.*, 1991; Cocks *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2001; Zubelewicz *et al.*, 2002). Besides, unlike thyroid tumors in the cat, which are typically functional, 90% of the canine thyroid tumors do not secrete excess thyroid hormones (Nelson, 1998).

In contrast to *TTF-1* data, no significant differences in *PAX-8* mRNA could be demonstrated, and no correlation was found among these two transcripts. On the other hand, statistical analysis revealed a significant correlation between *PAX-8* and *Tg* mRNA ($r=0.59$). These findings are consistent with those reported by Lacroix *et al.* (2006), who found that the expression of *PAX-8* mRNA was significantly correlated with the expression levels of *Tg*. In contrast, these authors found a significant correlation with *TPO*, which was not the case of our study. Studies of these two transcription factors genes (*TTF-1* and *PAX-8*) and of genes involved in iodine metabolism showed that *TPO* and *Tg* gene expression both correlated significantly with that of *PAX-8*, but not directly with *TTF-1* (Pasca di Magliano *et al.*, 2000; Lacroix *et al.*, 2006) and this is consistent with our results since *TTF-1* mRNA did not correlate with *Tg* or *TPO* mRNA expression.

The level of expression of *IGF-1* and *ER α* mRNA was not different between groups, as was found for *TSH-R*. Indeed, *IGF-1*, *ER α* and *TSH-R* mRNA were strongly correlated (r values ranged from 0.86 to 0.99). All these proteins are mitogenic and growth-related factors, and the working hypothesis of several researchers (Roger and Dumont, 1987; Deleu *et al.*, 1999) is that if the thyroid gland cannot functionally respond to TSH (e.g. thyroid hormone synthesis) the only effect that is observed is the trophic one, which leads to hyperplasia and may be to the activation of genes that promote cell changes leading to carcinoma.

In summary, this study demonstrated that gene expression is altered in both carcinoma and contralateral thyroid lobe when compared to the healthy gland in the dogs included in this study. The results obtained in the present cases, suggest that the carcinoma tissue present a diminished functionality and that the contralateral thyroid lobe may function in a compensatory state in euthyroid dogs.

Acknowledgments

This study was financed by the Laboratory of Nuclear Techniques, Veterinary Faculty, Uruguay. We want to thank to Dr. Pablo Hall, for all surgeries and thyroid biopsies. The authors are grateful to MSc Paula Nicolini for technical advice, and Dr. Maria Fernanda Cabrera Blatter and Dr. Maria Florencia Galelli for their collaboration.

References

Aupperle H, Gliesche K, Schoon HA. Tumors of the thyroid gland in dogs--a local characteristic in the area of Leipzig. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2003;110(4):154-157.

Avvedimento VE, Tramontano D, Ursini MV, Monticelli A, Di Lauro R. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1984;122:472-477.

Banu SK, Govindarajulu P, Aruldas MM. Developmental profiles of TSH, sex steroids, and their receptors in the thyroid and their relevance to thyroid growth in immature rats. *Steroids.* 2002;67(2):137-144.

Banu SK, Govindarajulu P, Aruldas MM. Testosterona and estradiol modulate TSH-binding in the thyrocytes of Wistar rats: influence of age and sex. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001;78(4):329-342.

Barber LG. Thyroid Tumors in Dogs and Cats. *Vet Clin Small Anim.* 2007;37(4):755–773.

Birchard SJ, Roesel OF. Neoplasia of the thyroid gland in the dogs. A retrospective study of 16 cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1981;17:369-372.

Brodey RS, Kelly DF. Thyroid neoplasms in the dog. A clinicopathologic study of fifty-seven cases. *Cancer.* 1968;22:406-416.

Bukhari U, Sadiq S, Memon JH, Baig F. Thyroid carcinoma--experience at Jinnah Postgraduate Medical Centre Karachi. *J Pak Med Assoc.* 2010;60(5):365-367.

Cano Valdez A. Aspectos Histológicos del Cáncer Diferenciado de la Tiroides. *Cancerología.* 2009;4:73-83.

Carver JR, Kapatkin A, Patnaik AK. A comparison of medullary thyroid carcinoma and thyroid adenocarcinoma in dogs: a retrospective study of 38 cases. *Vet Surg.* 1995;24(4):315-319.

Castillo, V. Epidemiología Endócrina. En Gómez N y Feijoo, S. *Clínica Médica de Pequeños Animales I*, cap Endocrinología, ed. Aniwa, 2006;121-122.

Chen Y, Green JA, Antoniou E, Ealy AD, Mathialagan N, Walker AM, Avalle MP, Rosenfeld CS, Hearne LB, Roberts RM. Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology*. 2006;147:2127-2137.

Cocks, H.C., Ramsden, J.D., Watkinson, J.C., Eggo, M.C. Thyroid stimulating hormone increases angiogenic growth factor expression in rat thyrocytes. *Clin. Otolaryngol*. 2000;25:570-576.

Correa da Costa VM, Moreira DG, Rosenthal D. Thyroid function and aging: gender-related differences. *Journal of Endocrinology*. 2001;171:193-198.

Deleu S, Pirson I, Coulonval K, Drouin A, Taton M, Clermont F, Roger PP, Nakamura T, Dumont JE, Maenhaut C. IGF-1 or insulin, and the TSH cyclic AMP cascade separately control dog and human thyroid cell growth and DNA synthesis, and complement each other in inducing mitogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 1999;25:149(1-2):41-51.

Dumont, J.E., Maenhaut, C., Pirson, I., Baptist, M., Roger, P.P. Growth factors controlling the thyroid gland. *Baillieres Clin. Endocrinol.Metab*. 1991;5:727-754.

Espinoza CR, Schmitt TL, Loos U. Thyroid transcription factor 1 and Pax8 synergistically activate the promoter of the human thyroglobulin gene. *J. Mol. Endocrinol*. 2001;27(1):59-67.

Fabbro D, Di Loreto C, Beltrami CA, Belfiore A, Di Lauro R, Damante G. Expression of thyroid-specific transcription factors TTF-1 and PAX-8 in human thyroid neoplasms. *Cancer Res*. 1994;54(17):4744-4749.

Fenwick MA, Fitzpatrick R, Kenny DA, Diskin MG, Patton J, Murphy JJ, Wathes DC. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol*. 2006;34:31-44

Francis-Lang H, Price M, Policarpou-Schwarz M, Di Lauro R. The promoter of thyroperoxidase gene indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol*. 1992;12:576-588.

Gérard CM, Lefort A, Christophe D, Libert F, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Control of thyroperoxydase and thyroglobulin transcription by cAMP: evidence for distinct regulatory mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 1989b;3:2110-2118.

Gómez JM, Maravall FJ, Gómez N, Gumà A, Casamitjana R, Soler J. Pituitary-thyroid axis, thyroid volume and leptin in healthy adults. *Horm Metab Res.* 2002;34(2):67-71.

González EP, Carmona C AR, Araya Q AV, Miranda FK, Massardo VT, Jiménez RB, Jaimovich FR, Gatica RH. Normal ¹³¹iodine uptake values at 2 and 24 hours. *Rev Med Chil.* 2008;136(10):1288-1293.

Harari J, Patterson JS, Rosenthal RC. Clinical and pathologic features of thyroid tumors in 26 dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;188:1160-1164.

Henderson BE, Ross RK, Casangrande JT. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res.* 1982;42(8):3232-3239.

Katoh R, Kawaoi A, Miyagi E, Li X, Suzuki K, Nakamura Y, Kakudo K. Thyroid transcription factor-1 in normal, hyperplastic, and neoplastic follicular thyroid cells examined by immunohistochemistry and nonradioactive in situ hybridization. *Mod Pathol.* 2000;13(5):570-576.

Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J.E., Roger, P.P. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr. Rev.* 2001;22:631-656.

Kondo T, Nakazawa T, Niu D, Mochizuki K, Kawasaki T, Nakamura N, Yamane T, Kobayashi M, Katoh R. Epigenetic silencing of TTF-1/NKX2-1 through DNA hypermethylation and histone H3 modulation in thyroid carcinomas. *Lab Invest.* 2009;89(7):791-799.

Lacroix L, Michiels S, Mian C, Arturi F, Caillou B, Filetti S, Schlumberger M, Bidart J. HEX, PAX-8 and TTF-1 gene expression in human thyroid tissues: a comparative analysis with other genes involved in iodide metabolism. *Clinical Endocrinology.* 2006; 64:398-404.

Leav I, Schiller AI, Rijnberk A, Legg MA, der Kinderen PJ. Adenomas and carcinomas of the canine and feline thyroid. *Am J Pathol.* 1976;83(1):61-122.

Leblanc B, Parodi AL, Lagadic M, Hurtrel M, Jobit C: Immunocytochemistry of canine thyroid tumors. *Vet Pathol.* 1991;28:370-380.

Liptak JM. Canine thyroid carcinoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2007;22(2):75-81.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$. *Methods.* 2001;25:402-408.

Manole D, Schildknecht B, Gosnell B, Adams E, Derwahl M. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(3):1072-1077.

Meikle A, Bielli A, Masironi B, Pedrana G, Wang H, Forsberg M, Sahlin L. An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reprod Nutr Dev.* 2000; 40(6):587-96.

Miccadei S, De Leo R, Zammarchi E, Natali PG, Civitareale D. The synergistic activity of thyroid transcription factor 1 and Pax 8 relies on the promoter/enhancer interplay. *Mol. Endocrinol.* 2002;16(4):837-846.

Mitchell PJ, Tjian R. Transcriptional regulations in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* 1989;245(4916):371-378.

Moore FM, Kledzik GS, Wolfe HJ, DeLellis RA: Thyroglobulin and calcitonin immunoreactivity in canine thyroid neoplasms. *Vet Pathol.* 1984;21:168-173.

Nelson RW. Disorders of the thyroid gland. In: Nelson RW, Couto CG. *Small Animal Internal Medicine.* St. Louis: Mosby; 1998:729-732.

Pasca di Magliano M, Di Lauro R, Zannini M. Pax 8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Science, USA.* 2000;97:13144-13149.

Patnaik AK, Lieberman PH. Gross, histologic, cytochemical and immunocytochemical study of medullary thyroid carcinoma in sixteen dogs. *Vet Pathol.* 1991;28:223-233.

Pfaffl MW, Georgieva TM, Georgiev IP, Ontsouka E, Hageleit M, Blum JW. Real time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domest Anim Endocrinol.* 2002;22:91-102.

Ramos-Vara JA, Miller MA, Johnson GC, Pace LW. Immunohistochemical detection of thyroid transcription factor-1, thyroglobulin, and calcitonin in canine normal, hyperplastic, and neoplastic thyroid gland. *Vet Pathol.* 2002;39(4):480-487.

Rivas M, Santisteban P. TSH-activated signaling pathways in thyroid tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;31;213(1):31-45.

Roger PP, Dumont JE. Thyrotropin is a potent growth factor for normal human thyroid cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;149(2):707-711.

Rossella Elisei, Aldo Pinchera, Cristina Romei, Maria Gryczynska, Viviane Pohl, Carine Maenhaut, Laura Fugazzola, and Furio Pacini. Expression of Thyrotropin Receptor (TSH-R), Thyroglobulin, Thyroperoxidase, and Calcitonin Messenger Ribonucleic Acids in Thyroid Carcinomas: Evidence of TSH-R Gene Transcript in Medullary Histotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78(4):867-871.

Schams D, Kohlenberg S, Amselgruber W, Berisha B, Pfaffl MW, Sinowatz F. Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J Endocrinol.* 2003;177:305-317.

Sosa, C; Carriquiry, M; Fernandez, A; Talmon, M; Abecia, JA; Forcada, F; Meikle, A. Effect of undernutrition on the uterine environment during maternal recognition of pregnancy in sheep. *Reproduction Fertility and Development.* 2009 a; 21:1-13.

Sosa C, Abecia JA, Carriquiry M, Forcada F, Martin GB, Palacín I, Meikle A. Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domest Anim Endocrinol.* 2009 b;36(1):13-23.

Turrel JM, McEntee MC, Burke BP, Page RL. Sodium I 131 treatment of dogs with nonresectable thyroid tumors: 39 cases (1990–2003). *J Am Vet Med Assoc.* 2006;229:542-548.

Van Renterghem P, Vassart G, Christophe D. Pax 8 expression in primary cultured dog thyrocyte is increased by cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 3;1307(1):97-103.

Verschueren CP, Rutteman GR, Vos JH, Van Dijk JE, de Bruin TW. Thyrotrophin receptors in normal and neoplastic (primary and metastatic) canine thyroid tissue. *J Endocrinol.* 1992; 132(3):461-468.

Wu SH, Weber WJ, Chester-Jones H, Hansen LB, Crooker BA. Effects of intake, selection for milk yield, and bST administration on hepatic expression of insulin receptors and components of the somatotropic axis in growing Holstein heifers. *J Dairy Sci.* 2004; 87: (Suppl. 1) 364 Abstract W 205.

Wucherer KL, Wilke V. Thyroid cancer in dogs: an update based on 638 cases (1995-2005). *J Am Anim Hosp Assoc.* 2010;46(4):249-254.

Zannini M, Francis-Lang H, Plachow D, Di Lauro R. Pax 8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol. Cell. Biol.* 1992;12:4230-4241.

Zarrilli R, Formisano S, Di Jeso B. Hormonal regulation of thyroid peroxidase in normal and transformed rat thyroid cells. *Mol. Endocrinol.* 1990;4(1):39-45.

Zubelewicz B, Muc-Wierzgon M, Wierzgon J. Genetic dysregulation of gene coding tumor necrosis factor alpha receptors (TNF alpha Rs) in follicular thyroid cancer preliminary report. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2002;16:98.

Tables

Table 1. Tumor description after the histopathology examination and free thyroxine (fT4) and thyrotropin (TSH) concentrations. Normal ranges for fT4 and TSH are 0.7 to 2.5 ng/dL and 0.1 to 0.43 ng/mL.

| ID | Breed | Sex ^a | Age (years) | Histopathology result | fT ₄ (ng/dL) | TSH (ng/mL) |
|----|-----------|------------------|----------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------|
| 1 | Beagle | M | 10 | Differentiated follicular carcinoma | 0.9 | 0.2 |
| 2 | Mongrel | F | 8 | Solid- follicular carcinoma | 1.2 | 0.1 |
| 3 | Mongrel | F | 10 | Solid- follicular carcinoma | 0.7 | 0.3 |
| 4 | Pitt Bull | F | 6 | Follicular carcinoma | 1.1 | 0.3 |
| 5 | Mongrel | F | 11 | Compact- carcinoma | 1.1 | 0.2 |
| 6 | Mongrel | F | 9 | Solid- follicular carcinoma | 0.7 | 0.3 |
| 7 | Mongrel | F | 10 | Follicular carcinoma (bilateral) | 0.4 | 0.6 |
| 8 | Mongrel | M | 8 | Solid- follicular carcinoma | 0.6 | 0.4 |

^aSex, F = female, M = male.

Table 2. Sequences of primer pairs used for real-time RT-PCR assay

| Genes ^a | RefSeq accession number ^b | Primers Sequence |
|--------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| TSH-R | X17146 | Forward: GGC AAT GAA GAC ATG GTG TG |
| | | Reverse: ACA AAG ACA TTG CCC AGG AG |
| Tg | NM0011048104 | Forward: AGACCCACATCGGAGTGTTTC |
| | | Reverse: AGCCCTGGTGGTTAGAAAGGT |
| TPO | AY094504 | Forward: CTCAAGGAAGGTGGTCTGGA |
| | | Reverse: CTCTCGGTCAGCTCCTCATT |
| TTF-1 | X77910 | Forward: GACGCTTCAAGCAACAGAAG |
| | | Reverse: TTCATCTTGTAGCGGTGGTTC |
| PAX-8a | X83592 | Forward: GCAGGAAGCGAATACTCTGG |
| | | Reverse: ACTTGGCCTTGATGTGGAAC |
| PAX-8g | X83592 | Forward: GCTATGCCTCTTCTGCCATC |
| | | Reverse: CCACTGTCCCCATAGCAACT |
| IGF-1 | NM_001077828 | Forward: CCAGACAGGAATCGTGGATG |
| | | Reverse: GCAGTACATCTCCAGCCTCCTCAGA |
| Era | AY033393 | Forward: AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC |
| | | Reverse: CGGTGGATGTGGTCCTTCTCT |
| RPL19 | AY158223 | Forward: CCCCAATGAGACCAATGAAATC |
| | | Reverse: CAGCCCATCTTTGATCAGCTT |

^aTSH-R = thyrotropin receptor, Tg = thyroglobulin, TPO = thyroperoxidase, TTF-1 = thyroid transcription factor, PAX8-a = paired box gene 8, PAX8-g = paired box gene 8, IGF-1 = insulin-like growth factor, Era = estrogen receptor α , RPL19 = ribosomal protein L19.

^bGene Bank sequences.

Figure captions

Figure 1. Cycles to the threshold of *RPL19* transcripts determined by real-time RT-PCR assay in healthy dogs, carcinoma thyroid lobule and contralateral thyroid lobule.

Figure 2. Levels of expression (normalized to *RPL19*) of the transcripts of TSH receptor (*TSH-R*), Tiroglobulin (*Tg*), Thyroperoxidase (*TPO*) and Thyroid transcription factor 1 (*TTF-1*) in healthy dogs, carcinoma thyroid lobule and contralateral thyroid lobule. Different letters indicate differences within the same graph, a,b: $P < 0.05$. (Least square means \pm pooled standar error).

Figure 3. Levels of expression (normalized to *RPL19*) of the transcripts of *PAX-8a*, *PAX-8g*, *IGF- 1* and estrogen receptor alpha (*ER α*) in healthy dogs, carcinoma thyroid lobule and contralateral thyroid lobule.

Figure 1

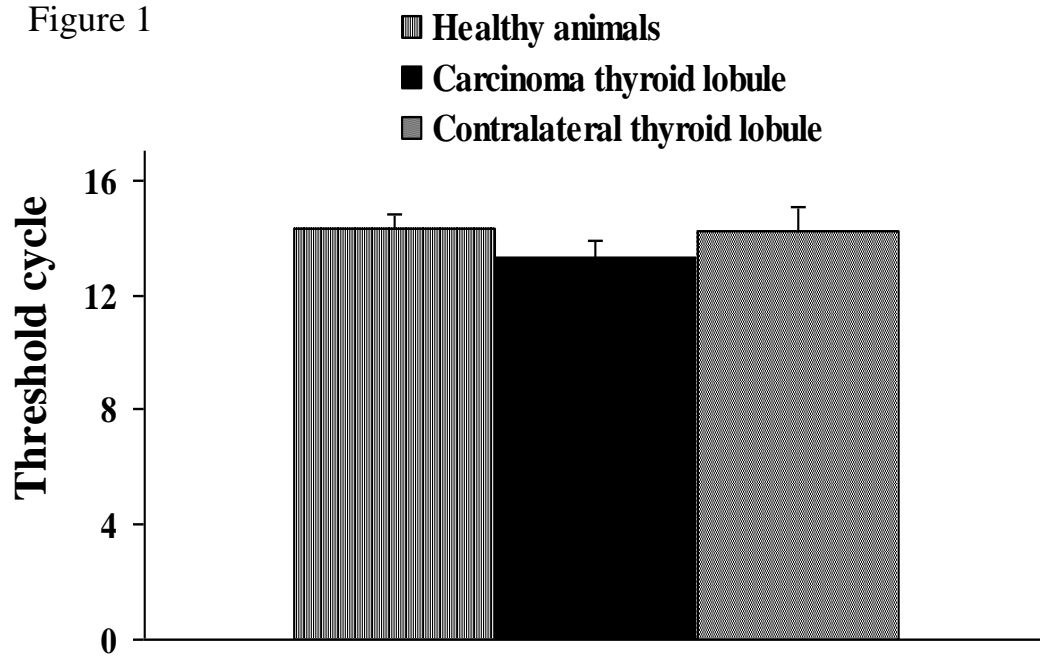


Figure 2

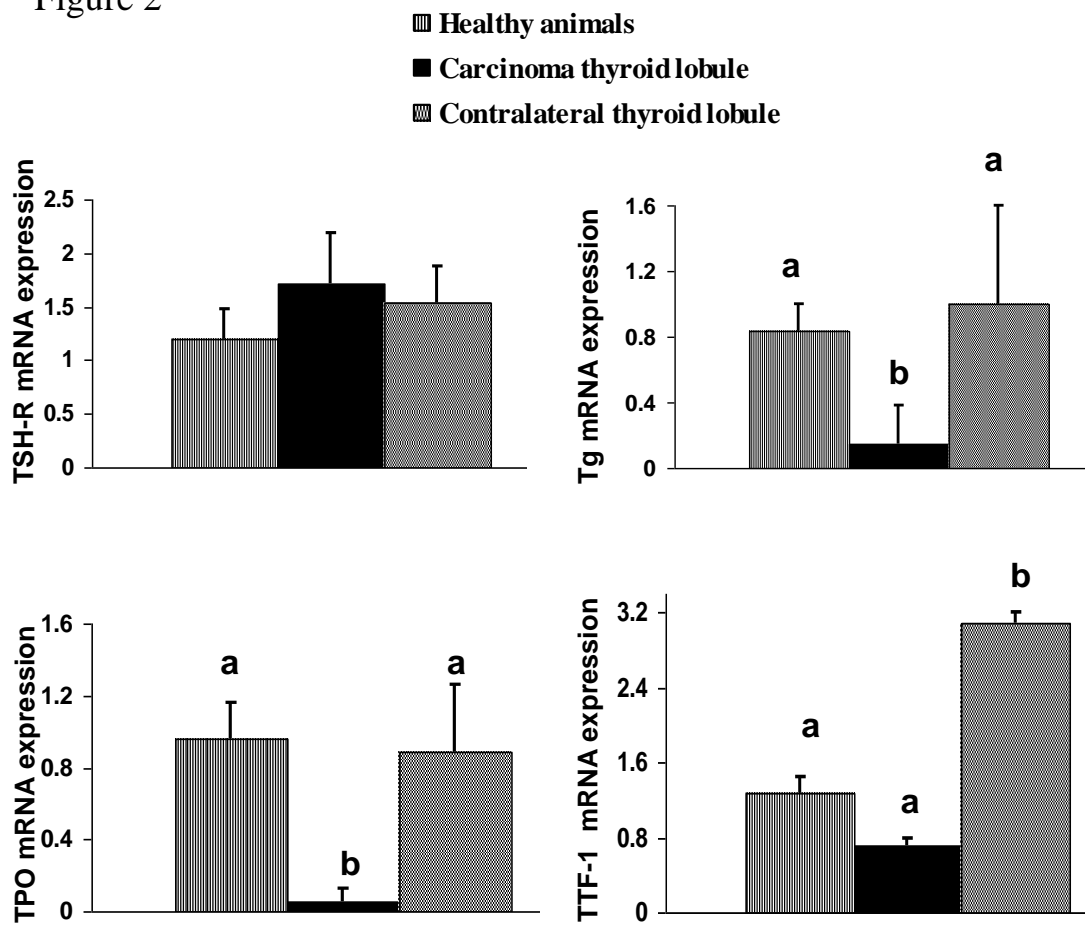


Figure 3

Healthy animals
Carcinoma thyroid lobule
Contralateral thyroid lobule

