



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**CARCINOMA TIROIDEO EN CANINOS  
MECANISMOS MOLECULARES Y TRATAMIENTO**

**Dra. Ana Paula Pessina Serdio, MSc.**

**TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY  
2015**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**CARCINOMA TIROIDEO EN CANINOS**  
**MECANISMOS MOLECULARES Y TRATAMIENTO**

**Dra. Ana Paula Pessina Serdio, MSc.**

**Ana Meikle, DMV. MSc. PhD.**  
**Directora de Tesis**

**Víctor Castillo, PhD**  
**Juan Borrego, PhD**  
**Co-Directores de Tesis**

**2015**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**Prof. Dra. Elsa G. Garófalo  
Directora del Programa de Posgrado  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República – Uruguay**

**Prof. Hugo Cerecetto  
Facultad de Química y Facultad de Ciencias  
Universidad de la República – Uruguay**

**Prof. Miguel Campos  
Facultad de Medicina Veterinaria  
Universidad de Ghent – Bélgica**

## **ACTA DE DEFENSA**

*A todos y cada uno de ustedes, gracias.*

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.*

*Un esfuerzo total es una victoria completa”.*

*Mahatma Gandhi*

*“No es el más fuerte ni el más inteligente el que sobrevive,  
sino el más capaz de adaptarse a los cambios”.*

***Darwin***

## Agradecimientos

*“Si no vives peligrosamente, no vives. La vida solo florece en peligro. La vida nunca florece en la seguridad.” Osho*

Hoy me encuentro ante una nueva hoja en blanco, nunca hubiera imaginado estar frente a ella. Si será “peligrosa” la vida que nos enfrenta constantemente con nosotros mismos, nos propone y a veces casi impone nuevos desafíos, algunos demasiado atrevidos como este. Pero aquí estoy y aquí están los que conmigo emprendieron este viaje y se aventuraron a acompañarme. Sin duda agradezco a la vida que aunque peligrosa me permitió sufrir, aprender, disfrutar de lo vivido.

Agradezco a mis padres por “todo” y por sostenerme cuando perdía fuerzas, haciéndome ver que la vida pasa por otro lado. 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, hoy les prometo que es el último.

A Betina, por cubrir los ratos de madre en los que no pude estar y cuidar a mis hijos como si fueran tuyos, infinitas gracias.

Agradezco muy especialmente a Ana, por haber aceptado nuevamente dirigirme. Me enseñaste muchísimo, me sostuviste cálidamente cuando fue necesario, siempre tu mano extendida para ayudarme y sin duda me mostraste un camino que nunca pensé recorrer. Formamos un gran equipo, nos conocemos, nos aceptamos, nos respetamos y por sobre todo nos queremos.

A Isa (mi mano derecha y amiga), que se unió a mi esfuerzo y ayudó en todo lo que le fue posible y más. Gracias por las horas compartidas, por hacer de mi trabajo el tuyo. A mis compañeras del Laboratorio Gretel, Andrea, Milena, Vicky, Claudia y Paula) por ayudarme y cubrir espacios en lo que no pude estar. Gracias por la amistad compartida.

Al Dr. Víctor Castillo, Co-Director de esta tesis y amigo, por haber confiado nuevamente en mí, por aporta su conocimiento, por habernos apoyado académicamente (a mí y a la Facultad de Veterinaria), gracias por haber compartido su trabajo conmigo. Pero por sobre todo gracias por el aliento y las palabras calmas, contenedoras en tiempos de tormenta que a este “pequeño saltamontes” le permitieron seguir andando y aprender.

Al Dr. Juan Borrego por aceptar a la distancia co-dirigir esta tesis y aportar su expertis.

A mis tesisistas de grado que con su trabajo hicieron posible el mío (Manuela, Rosina, Sofía y Cecilia).

Agradezco al Dr. Gabriel Semiglia por haber realizado la cirugía a mis pacientes, permitirme asistir a las mismas e intercambiar opiniones.

Agradezco también a la Unidad de Oncología de Facultad de Veterinaria con quienes compartimos pacientes e intercambiamos opiniones.

Especialmente doy las gracias al Laboratorio de Técnicas Nucleares, que con su soporte económico permitió que se realizara este trabajo y a la CSIC por su financiación.

Por último, GRACIAS a todos por permitirme seguir confirmando que lo que realmente importa en la vida no son las cosas que tengo sino las personas que me rodean. Sin ustedes esta historia hubiera sido diferente, sin lugar a dudas más ardua y fría.

## **Artículos I a IV**

La presente Tesis está basada en los siguientes artículos, a los cuales se referirá en el texto por su numeración romana (I-IV):

**I. Pessina P**, Castillo V, Araujo M, Carriquiry M, Meikle A. 2012. Expression of thyroid-specific transcription factors in thyroid carcinoma, contralateral thyroid lobe and healthy thyroid gland in dogs. *Res Vet Sci.* 2012; 93(1):108-13. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.06.002. Epub 2011 Jul 6.

**II. Pessina P**. Castillo V, Sartore I, Borrego J, Meikle A. 2014. Semiquantitative immunohistochemical marker staining and localisation in canine thyroid carcinoma and normal thyroid gland. *Vet Comp Oncol.* 2014; 1. doi: 10.1111/vco.12111.

**III. Pessina P**, Castillo V, Sartore I, Cesar, D, Meikle A. The histological pattern in canine thyroid carcinoma affects immunohistochemical marker expression. Enviado para su publicación al *Vet Comp Oncol.* Diciembre 2014.

**IV. Pessina, P**; Hall, P; Cabrera Blatter, MF, Castillo, V. Thyroid carcinoma in dogs: tumor recurrence and survival time after treatment with retinoic acid or doxorubicin. Se enviará para su publicación al *Res Vet Sci.* 2015.

Los *Artículos I y II* se reproducen con el permiso de la revista correspondiente.



# **Índice**

**Introducción, 1**

**Hipótesis, 7**

**Objetivos, 7**

Objetivo general, 7

Objetivos específicos, 7

**Materiales y Métodos, 8**

Diseños experimentales, 8

Determinaciones hormonales, 9

Determinación de transcritos por PCR tiempo real, 9

Inmunohistoquímica y análisis de imagen, 10

Análisis estadísticos, 11

**Resultados principales, 12**

**Discusión general, 17**

**Conclusiones, 21**

**Perspectivas, 22**

**Referencias, 23**

**Anexos, 34**

## Resumen

Esta tesis, que se presenta en cuatro artículos, investigó aspectos moleculares del carcinoma tiroideo canino y su tratamiento. En el **Artículo I** se investigó la expresión de transcritos determinados por PCR en tiempo real en tiroides sanas, carcinomatosas y en el lóbulo tiroideo contralateral (CL) sano de los perros con cáncer. El grupo carcinoma tuvo una concentración de mRNA menor para Tiroglobulina (*Tg*) y Tiroperoxidasa (*TPO*) que el grupo sano y el CL, lo que sugiere que tiene alterada la síntesis de hormonas tiroideas. Las concentraciones de mRNA del receptor de tirotropina (*TSH-R*), gen pareado box 8 (*PAX-8*), y receptor de estrógeno alfa (*ER $\alpha$* ) no fueron diferentes entre grupos. La expresión del *TTF-1* y del factor de crecimiento similar a insulina 1 (*IGF-1*) fue mayor en el grupo CL con respecto a la glándula carcinomatosa, lo que sugiere un mecanismo compensatorio para mantener la condición de eutiroideo en los perros con cáncer. En el **Artículo II** se determinó la inmunotinción de TSH-R, Tg, TTF-1, antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), factor de crecimiento vascular (VEGF) y de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) en glándulas tiroideas sanas y carcinomatosas. El número de folículos fue menor y la densidad celular y número de vasos sanguíneos fue mayor en glándulas carcinomatosas respecto las sanas. No se encontraron diferencias en la inmunotinción de TSH-R y Tg entre grupos en células foliculares y fibroblastos. Las células foliculares carcinomatosas presentaron 2 y 3 veces más intensidad de tinción de TTF-1 y PCNA respectivamente respecto las sanas. La tinción de VEGF en células endoteliales fue mayor en los carcinomas. La mayor expresión de proteínas relacionadas a la proliferación y angiogénesis (TTF-1, PCNA y VEGF) encontrada en el carcinoma es consistente con los mecanismos de progresión tumoral. El objetivo del **Artículo III** fue determinar si marcadores como VEGF, FGF-2, IGF-1 y su receptor (IGF-1R) así como los receptores de ácido retinoico (RAR $\alpha$  y RXR) se asociaban con un patrón histológico diferencial (folicular compacto vs compacto vs sanos). La expresión de IGF-1, IGF-1R y VEGF en fibroblastos y células endoteliales fue mayor en carcinomas compactos que tejido sano y se encontró una mayor expresión de IGF-1R en fibroblastos y FGF-2 en células endoteliales del carcinoma compacto respecto de los foliculares-compactos. La mayor expresión de factores vinculados a la oncogénesis en células endoteliales y fibroblastos encontrada en los carcinomas compactos sostiene la relevancia de las células estromales en la generación del tumor. En el **Artículo IV** se evaluó el efecto de isotretinoína 9-cis (AR9-cis) sobre la recurrencia tumoral y sobrevida como tratamiento novedoso frente al tradicional (doxorrubicina) en el carcinoma tiroideo post cirugía, incluyendo un grupo control (sin tratamiento). El tipo de carcinoma afectó el tiempo de recurrencia y el de sobrevida, siendo mayor en los carcinomas foliculares respecto de los carcinomas foliculares-compactos, que a su vez fueron mayores que los carcinomas compactos. Existió una interacción entre el tratamiento y el tipo de carcinoma, ya que no se encontró efecto del tratamiento en los carcinomas foliculares, mientras que en los otros tipos de carcinoma, los perros tratados con AR9-cis presentaron mayor tiempo de recurrencia y sobrevida, indicando que este tratamiento utilizado luego de la cirugía es superior al tratamiento tradicional con doxorrubicina.

Dirección del autor: Ana Paula Pessina, Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria. Lasplacas 1550. CP 11600. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

## Abstract

This thesis presented in four articles, investigated the molecular basis of thyroid carcinoma in dogs and its treatment. In **Article I**, transcript expression was determined by real time PCR in healthy thyroid glands, carcinomas and in the healthy contra lateral lobe (CL) of dogs with cancer. Thyroglobulin (*Tg*), and thyroperoxidase (*TPO*) mRNA expression in carcinoma glands was lower than in healthy glands, suggesting an altered capacity to synthesize thyroid hormones. Concentrations of thyrotropin receptor (*TSH-R*), paired box 8 transcription factor (*PAX-8*), and estrogen receptor alpha (*ER $\alpha$* ) mRNA were not different between groups. The expression of thyroid specific transcription factor-1 (*TTF-1*) and insulin like growth factor (*IGF-I*) was greater in the CL group than in carcinoma group, suggesting that the CL lobe may function in a compensatory state. In **Article II**, the average immunostaining of TSH-R, Tg, TTF-1, vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblastic growth factor-2 (FGF-2) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were determined in follicular carcinomas and healthy thyroid canine glands. The number of follicles was lower, while cell density and number of blood vessels were greater in thyroid carcinomas than in healthy thyroid glands. No differences were detected in the intensity of staining of TSH-R and Tg in follicular cells and fibroblasts between healthy and carcinomas tissue. Follicular cells of the carcinoma tissue presented 2 to 3-fold greater staining of TTF-1 and PCNA respectively than cells of healthy thyroid tissue. VEGF staining was stronger in endothelial cells of the tumoral tissue when compared with normal thyroid tissue, but no differences were found in the other cell types. The greater protein expression of factors related to proliferation and angiogenesis (TTF-1, PCNA and VEGF) found in the carcinoma glands respect healthy thyroid tissue, is consistent with the mechanisms of tumor progression. The objective of **Article III** was to determine if markers like VEGF, FGF-2, IGF-1 and its receptor (IGF-1R) and retinoic receptors (RAR $\alpha$  and RXR) were associated with the tumor histological type (compact carcinomas vs follicular-compact vs healthy thyroid glands). IGF-I, IGF-1R and VEGF expression was greater in fibroblasts and endothelial cells of compact carcinoma than healthy glands. IGF-1R expression in fibroblasts and FGF-2 expression in endothelial cells of compact carcinoma were greater than follicular-compact carcinoma. The greater expression of factors related to proliferation and angiogenesis in endothelial cells and/or fibroblasts of compact carcinoma when compared to healthy glands supports the relevance of stromal cells on oncogenesis. In **Article IV**, the effects of isotretinoína 9-cis (AR9-cis) as a novel post surgery treatment of thyroid carcinoma when compared to a traditional treatment (doxorubicin) was investigated and a control untreated group was included. The time to recurrence was significantly shorter in the control group and doxorubicin group vs AR9-cis group, while no differences were found among doxorubicin and control groups. The type of carcinoma affected time of recurrence and survival as follicular carcinomas presented a greater times than follicular-compact carcinomas which in turn presented greater survival time than compact carcinomas. The interaction among treatment and type was significant as recurrence and survival times in follicular carcinomas did not differ between treatments, but AR9-cis dogs had greater times in follicular-compact and compact carcinomas, showing that this treatment is superior to the traditional (doxorubicin).

## Abreviaciones

AR9-cis: Ácido retinoico 9 cis

COX-2: Ciclooxygenasa 2

ER $\alpha$  : Receptor de estrógeno alfa

FGF-2: Factor de crecimiento fibroblástico 2

fT4: Tiroxina libre

IGF-1: Factor de crecimiento similar a insulina-1

IGF-1R: Receptor del factor de crecimiento similar a insulina-1

NIS: Simportador o intercambiador Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>

PAX-8: gen pareado box 8

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

RAR: Receptor de ácido retinoico

RAR $\alpha$ : Receptor de ácido retinoico alfa

RXR: Receptor X de ácido retinoico

rhTSH: Hormona estimulante del tiroides humana recombinante

T4: Tiroxina

Tg: Tioglobulina

TKIs: Inhibidores tirosin kinasa

TPO: Tioperoxidasa

TSH: Hormona estimulante del tiroides

TSHR: Receptor de la hormona estimulante del tiroides

TTF-1: Factor de transcripción tiroideo-1

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR-2: Receptor del factor de crecimiento endotelial tipo 2

<sup>99m</sup>Tc: Tecnecio-99m

I<sup>131</sup>: Yodo 131

## Introducción

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 de la glándula, cambios degenerativos, inflamación, hiperplasia y neoplasias tiroideas (Elisei y col., 1994; Capen, 2002). En caninos, el carcinoma de tiroides es la patología que afecta la glándula tiroides con mayor frecuencia después del hipotiroidismo (Castillo, 2006). El cáncer de tiroides en el perro así como en humanos es la neoplasia endócrina que se presenta con mayor frecuencia (Barber, 2007; Liu y Brown, 2011). La edad media de presentación es de 9 a 10 años (Barber, 2007; Cano Valdez, 2009). No se ha encontrado predisposición de sexo en caninos a diferencia de lo reportado en humanos donde el cáncer de tiroides es aproximadamente 3 veces más frecuente en las mujeres (Brodey y col., 1968; Leav y col., 1976; Henderson y col., 1982; Sipos y col., 2008; Wucherer y Wilke, 2010; Bukhari y col., 2010). Si bien la incidencia del carcinoma tiroideo no es muy alta, se ha duplicado en las últimas dos décadas tanto en caninos como en humanos (Castillo, 2006; Harris y Bible, 2011).

El carcinoma de tiroides en el perro tiene en general una presentación unilateral debido a que los lóbulos tiroideos no están anatómicamente unidos, diferencia importante con los seres humanos en que existe un istmo que une ambos lóbulos (Liptak, 2007). En caninos, cuando la implicancia es bilateral y el volumen del tumor es mayor a 20 cm<sup>3</sup>, éste suele ser más invasivo y estar asociado a altas tasas metastásicas (Leav y col., 1976; Harari y col., 1986; Theon y col., 2000; Mooney, 2007). La mayoría de los perros con carcinoma de tiroides son eutiroides (60-74%). Un porcentaje menor de pacientes cursan con hipotiroidismo (16 a 30%) y un 10% son hipertiroideos (Castillo y col., 2006; Barber, 2007). Los signos clínicos en perros con tumores tiroideos benignos o malignos son similares y generalmente son el resultado de la alteración o compresión 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, la movilidad y la agresividad del tumor, así como de la presencia de metástasis (Barber, 2007).

Más del 90% de los tumores tiroideos detectables en perros son carcinomas, pudiendo clasificarse como carcinomas tiroideos foliculares cuando se originan en las células foliculares tiroideas y como carcinomas tiroideos medulares cuando se originan en las células parafoliculares (células C) (Wucherer y Wilke, 2010). En caninos, los carcinomas de origen folicular son los que se presentan con mayor frecuencia (Leav y col., 1976; Harari y col., 1986) y pueden clasificarse según el grado de diferenciación en bien diferenciados (folicular, folicular-compacto, compacto y papilar), pobremente diferenciados e indiferenciados (DeLellis, 2004; Kiupel y col., 2008). Otros estudios reportan que la prevalencia del carcinoma de origen medular estaría subestimada ya que es difícil de diferenciar histológicamente del tipo folicular (Carver y col., 1995; Campos y col., 2014). En caninos, la raza, el sexo, el tipo histológico y el tamaño del tumor no parecieron afectar el pronóstico después de la resección quirúrgica, mientras que la enfermedad bilateral y el grado

histológico de malignidad (diferenciación) sí lo afectan (Harari y col., 1986; Verschueren y col., 1992; Klein y col., 1995; Nadeau y col., 2011).

Si bien el proceso de oncogénesis es complejo y difícil de entender, las características o “hallmarks” del cáncer que comprenden seis capacidades biológicas adquiridas por las células durante el desarrollo del tumor, continúan proporcionando una base sólida para la comprensión del mismo (Hanahan y Weinberg, 2011). Ellas incluyen: el mantenimiento de la señal proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, lo que permite la inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis y la activación de la invasión y metástasis (Figura 1).

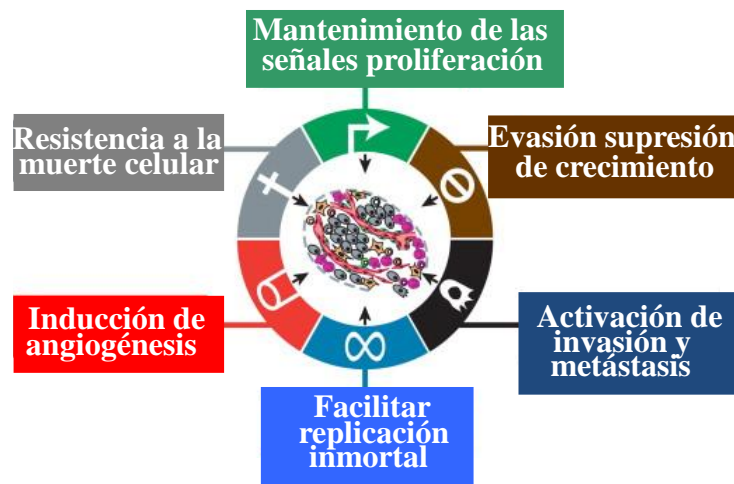


Figura 1. Las características - hallmarks - del cáncer (modificada de Hallmarks of cancer: The next generation, Hanahan y Weinberg, 2011).

En los seres humanos, los carcinomas diferenciados como el papilar y el folicular, retienen en parte las características biológicas de las células tiroideas normales (Elisei y col., 1994). De forma similar, en los perros, la unión de la tirotrópina (TSH) en los carcinomas de tiroides no difirió de la de tejido tiroideo normal (Verschueren y col., 1992), y los autores sugirieron que la TSH puede continuar actuando como un factor de crecimiento tumoral. Además de que la TSH es el principal regulador de la diferenciación y la proliferación del tirocito (Rivas y Santisteban, 2003), regula los niveles de ARNm de algunos genes específicos de la tiroides involucrados en el metabolismo del yodo y la síntesis hormonal en humanos (Moretti y col., 2000). Estos genes incluyen el transportador de sodio (NIS), Tiroglobulina (Tg), Tiroperoxidasa (TPO) y receptor de TSH (TSH-R) (Avvedimento y col., 1984; Gerard y col., 1989; Zarrilli y col., 1990; Lacroix y col., 2006). El mecanismo molecular por el cual la TSH controla la expresión de los genes de Tg y TPO no ha sido completamente dilucidado, pero se considera que la actividad de factores de transcripción es 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; Espinoza y col., 2001; Miccadei y col., 2002). Existen estudios en seres humanos que indican que en los tumores tiroideos benignos, la expresión de los genes PAX8

y TTF-1 no fue diferente en comparación con el tejido tiroideo normal, pero en carcinomas tiroideos, estos factores se encontraron disminuidos por lo que se han reportado como marcadores de malignidad (Lacroix y col., 2006). También se demostró una correlación entre la expresión de NIS, Tg y TPO y la expresión de PAX8 y TTF-1, sugiriendo que las alteraciones en la expresión de los factores de transcripción PAX8 y TTF-1 tienen un rol en la tumorigénesis y procesos de diferenciación tiroidea (Lacroix y col., 2006). En los perros, no encontramos estudios que consideren la regulación de la expresión de Tg y TPO en glándulas tiroideas sanas ni carcinomatosas. Sin embargo, diversos estudios cuyo objetivo era encontrar un marcador molecular de diferenciación en el carcinoma de tiroides 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).

Son muchos los factores de crecimiento que desempeñan un rol fundamental en el desarrollo de distintos tipos de cáncer incluido el de tiroides. En células tiroideas caninas, el factor de crecimiento similar a insulina 1 (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). 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 tiroideo en mujeres que en hombres (Henderson y col., 1982). Otra proteína ampliamente utilizada como indicador de proliferación y mitosis celular es el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), que participa en el proceso de duplicación del DNA. En otros carcinomas caninos como el mamario y pulmonar está demostrado que la expresión de PCNA esta aumentada (Peña y col., 1998; Griffey y col., 1999).

Se sabe que las células de un carcinoma tiroideo pueden secretar potencialmente muchos factores provasculares para promover la angiogénesis, pero el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 (FGF-2), juegan un rol protagónico y son responsables en gran medida del proceso de angiogénesis o neovascularización necesario para que ocurra crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis (Masunga y col., 2000; Tomozawa y col., 2000; Rzeszutko y col., 2004). Además, VEGF ha sido estudiado en diferentes especies animales y diferentes tipos tumorales y es considerado como el mayor promotor del crecimiento y migración endotelial (de Araujo-Filho y col., 2009; Yu y col., 2012; Clemente y col., 2013). En el proceso de angiogénesis tumoral, VEGF estimula a las células endoteliales a producir FGF-2, quien potencia la actividad angiogénica. Por otra parte, el FGF-2 está implicado en el crecimiento anormal de la tiroides humana, tanto como un potencial mitógeno de células foliculares como un estimulador del crecimiento de células endoteliales de la tiroides (Eggo y col., 1995; Patel y col., 2003). En caninos, no hemos encontrado informes al respecto.

Más aún, teniendo en cuenta que el rol de los factores mencionados dependerán del tipo celular en que son producidos, cabe destacar que existe muy poca información – aún considerando otros modelos experimentales aparte del canino - de la expresión y del rol de estos factores y del rol del tipo celular en la tumorigénesis. En la glándula tiroidea, los tipos celulares funcionalmente relevantes son las células foliculares, los fibroblastos y las células endoteliales. El avance en el conocimiento de la

conversación entre éstos tipos celulares es esencial para comprender como contribuyen a la progresión del tumor a través de señales de proliferación y/o facilitando el acceso de nutrientes (Dvorak, 1986; Bouziges y col., 1991; Gribben y col., 2010). De hecho se ha demostrado que el estroma es capaz de desencadenar tumores (Bissell y Radisky, 2001) y la hipótesis actual de la oncogénesis reside en la funcionalidad del estroma, si bien no está claro como las células estromales y tumorales evolucionan (Gribben y col., 2010).

Además del tipo celular, debe tenerse en cuenta que la expresión de los factores antes mencionados implicados en la oncogénesis, dependerá del tipo de tumor. Verschueren y col. (1992) reportaron una menor concentración de sitios de unión de TSH en aquellos carcinomas que mostraron menor captación de pertecnetato de sodio. Sin embargo, los mismos autores no encontraron correlación entre el tipo histológico de grado de malignidad con la concentración o afinidad de los sitios de unión de TSH, ni tampoco entre éstos últimos y las concentraciones de T4 total y Tg. Si bien en general, se han establecido patrones específicos que están asociados a la malignidad y pronóstico del paciente (Hanahan y Weinberg, 2011), hay muy pobre y aislada información respecto la relevancia del tipo de carcinoma tiroideo en caninos sobre la funcionalidad, recurrencia, sobrevida y la respuesta a la terapia.

En caninos, la tiroidectomía es el tratamiento de elección para el carcinoma tiroideo siempre que sea posible y dependerá del tamaño tumoral, la extensión, la invasión y la presencia de enfermedad metastásica macroscópica (Klein y col., 1995; Panciera y col., 2004; Barber, 2007; Tuohy y col., 2012). El tiempo de sobrevivencia media en perros sin tratar es sólo de 3 meses (Worth y col., 2005), pero la cirugía en tumores móviles no metastáticos aumenta el tiempo de sobrevivencia significativamente (Klein y col., 1995). 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 sólo 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) y que el 50% de los perros experimentan recurrencia o presencia de metástasis dentro de los dos años post-cirugía (Harari y col., 1986). La recurrencia post-cirugía va a depender del tipo de tumor, siendo de peor pronóstico los carcinomas anaplásicos, los compactos o foliculares-compactos (Klein y col., 1995; Radinsky, 2007).

Si bien hay reportes que sostienen que los tumores de tiroides son relativamente resistentes a la irradiación, algunos estudios han demostrado que la radiación externa ( $I^{131}$ ) 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; Barber, 2007). La terapia con  $I^{131}$  postcirugía se recomienda en aquellos casos en que el tumor muestra captación de  $^{99m}Tc$ , de lo contrario la radiación no es efectiva como ocurre en casos de carcinomas pobremente diferenciados o anaplásicos (Worth y col., 2005; Turrel y col., 2006). En caninos, la terapia con  $I^{131}$  mejoró el tiempo de sobrevida en pacientes con tumores no resecables (Turrel y col., 2006). A pesar del aparente éxito de la terapia con radiación y cirugía en el manejo de carcinomas tiroideos localizados, cerca del 80% desarrollan metástasis durante el curso de la patología (Patnaik y Lieberman, 1991; Carver y col., 1995; DeLellis, 2004; Kiupel y col., 2008; Sipos y col., 2008; Wucherer y col., 2010). La limitante de la radioterapia



es el alto costo y la necesidad de una infraestructura apropiada así como también las regulaciones legales de cada país. En humanos, la utilización de tirotropina recombinante humana (rhTSH) mejora la absorción de yodo radioactivo en pacientes con cáncer diferenciado tiroideo (Pisarev y Juvenal, 2010). En perros, si bien la experiencia es limitada, recientemente se investigó el uso de rhTSH para optimizar la captación de yodo radioactivo no mostrando un claro beneficio con el protocolo utilizado (Campos y col., 2012). Estos autores sugirieron que esto podría deberse no sólo a la dosis utilizada, la vía de administración y/o el tiempo de evaluación post-administración, sino también a las propiedades intrínsecas del tejido tiroideo neoplásico.

El uso de la quimioterapia para los carcinomas no quirúrgicos o metástasis tiene resultados limitados; la doxorrubicina ha sido la droga más utilizada, pero su eficiencia aplica a carcinoma tiroideo diferenciado (Jeglum y Whereat, 1983; Ogilvie y col., 1989). Se reportaron resultados similares con cisplatino y neviparina (Fineman y col., 1998; Muscella y col., 2009; Dong y col., 2013). Otros estudios demostraron que la quimioterapia luego de la tiroidectomía no mejora el tiempo de sobrevivencia (Nadeau y col., 2011; Tuohy y col., 2012).

La utilización de fármacos antiinflamatorios no esteroideos 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 sobre-expresan 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; Campos y col., 2014). 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 una mayor expresión COX-2 se pueden correlacionar con una mayor recurrencia tumoral y muerte (Haynik y Prayson, 2005). Recientemente se ha demostrado que inhibidores de COX-2 son capaces de revertir la resistencia a múltiples agentes quimioterápicos a través de la disminución de la expresión de una glicoproteína P (P-gp). Esta proteína disminuye la concentración intracelular de drogas quimioterápicas, limitando así su citotoxicidad (Gottesman y col., 2002). La COX-2 y la P-gp mostraron ser buenos target terapéuticos a nivel molecular principalmente para el cáncer de tiroides medulares no siendo tan específicos para el carcinoma folicular (Zatelli y col., 2005; Campos y col., 2014).

En humanos, el suplemento con Levotiroxina (T4) se ha propuesto y es utilizado como tratamiento complementario en la terapia de carcinomas tiroideos foliculares bien diferenciados (Biondi y col., 2010). El propósito de esta terapia es inhibir por retroalimentación intrínseca la liberación de TSH, ya que esta hormona actuaría como un factor de crecimiento en los tumores que mantienen sitios de unión ávidos por TSH. Son escasos los estudios que investigan la eficacia de este tratamiento en la inhibición del crecimiento del tumor primario o metástasis en los perros (Barber, 2007). Tuohy y col. (2012) reportaron que el uso de Levotiroxina postcirugía en perros con carcinomas tiroideos bilaterales mejoró el tiempo de sobrevivencia. Un estudio reciente evaluó el efecto de la terapia con Levotiroxina sobre el tiempo de sobrevivencia en caninos con carcinomas tiroideos luego de diferentes tratamientos

(Campos y col., 2014). Estos autores reportaron que el tratamiento con Levotiroxina no proporcionó un beneficio en la supervivencia de estos pacientes.

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 tumoral 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 X de ácido retinoico), 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). Los resultados obtenidos con AR en líneas de cultivo de cáncer tiroideo así como en estudios clínicos en humanos son promisorios (Simon y col., 2002; Short y col., 2004; Trojanowicz y col., 2010; Coelho y col., 2011). En caninos, el tratamiento con AR ha sido utilizado en pacientes con adenoma productor de ACTH (corticotropinoma) (Castillo y col., 2010), pero hasta el momento de iniciar esta tesis no había sido documentado para el cáncer de tiroides 3) Inhibidores tirosin kinasa (TKIs) están siendo utilizados para tratar numerosos tipos de cáncer. En humanos, la inhibición del receptor del factor de crecimiento endotelial tipo 2 (VEGFR-2) utilizando TKIs, es la terapia nueva más efectiva en el tratamiento de carcinomas tiroideos avanzados (Keefe y col., 2010). En caninos están siendo utilizados con éxito en el tratamiento de tumores sólidos incluido el carcinoma de tiroides (London y col., 2012).

En resumen, el avance de las técnicas moleculares ha permitido comprender la relevancia que la comunicación intercelular y la relación tejido tumoral-estroma tienen en el proceso de carcinogénesis en humanos (Joyce y Pollard, 2009). En caninos la investigación al respecto es escasa y no existen trabajos que consideren la glándula tiroidea sana y carcinomatosa, buscando caracterizar la expresión molecular en diferentes tipos celulares (tirocitos, fibroblastos y células endoteliales) y en diferentes tipos de carcinoma (folicular, folicular-compacto y compacto). Tampoco se han encontrado trabajos que vinculen la respuesta al tratamiento teniendo en cuenta el tipo de carcinoma y como éste impacta en la recurrencia y sobrevida de los pacientes. Es necesario profundizar en el conocimiento de las vías que regulan las interacciones celulares dentro del tumor y del tejido sano para poder determinar marcadores tumorales vinculados con el diagnóstico y el pronóstico. Esto permitirá además el uso de terapias innovadoras para aquellos tipos de cáncer que no responden a la terapéutica convencional.

## Hipótesis

Dado que la mayoría de los perros con carcinoma se describen clínicamente como eutiroides, hipotetizamos que el tejido carcinomatoso presenta una expresión de transcritos y proteínas vinculadas con la síntesis de hormonas tiroideas alterada respecto del tejido sano y que el lóbulo tiroideo contralateral sano, se encuentra en un estado de compensación mediante el aumento de transcritos de proteínas vinculadas a la síntesis hormonal y/o al crecimiento tisular. Por otro lado, considerando que la respuesta global de un tejido depende de la funcionalidad de células específicas y de la conversación entre ellas, planteamos la hipótesis de que existen alteraciones en la expresión proteica que son dependientes del tipo celular, así como también del tipo de tumor presente (e.g grado de diferenciación) y que existen marcadores diagnósticos, con valor predictivo respecto del pronóstico del tipo de tumor. Finalmente, investigaremos el efecto de un tratamiento innovador como la isotretinoína 9-cis (AR-9cis) frente a uno tradicional (doxorrubicina) y un grupo de perros con carcinoma sin tratar (controles) sobre el tiempo de recurrencia y sobrevida de pacientes con carcinoma tiroideo post-cirugía.

## Objetivos

### Objetivos Generales

Contribuir al conocimiento de las bases moleculares y terapéutica del cáncer de tiroides en caninos.

### Objetivos Específicos

- i) Determinar los transcritos de TSH-R, Tg, TPO, TTF-1, Pax-8, IGF-I y ER $\alpha$  en la glándula sana, carcinomatosa y el lóbulo contralateral sano (**Artículo I**).
- ii) Localizar y cuantificar la expresión proteica de TSH-R, Tg, TTF-1, VEGF, FGF-2, TTF-1 y PCNA en tejido tiroideo sano y carcinomatoso. Determinar si dicha expresión difiere en los tipos celulares a estudiar (células foliculares, fibroblastos y células endoteliales, **Artículo II**).
- iii) Localizar y cuantificar la expresión de Receptores de Ácido Retinoico (RAR $\alpha$ /RXR), VEGF, FGF-2, IGF-1 y su receptor en tejido tiroideo sano y carcinomatoso con diferentes patrones histológicos (folicular-compacto y compacto, **Artículo III**).
- iv) Estudiar el tiempo de recurrencia y sobrevida de pacientes con carcinoma tiroideo post-cirugía, no tratados, tratados con doxorrubicina o con isotretinoína 9-cis (**Artículo IV**).

## **Materiales y Métodos**

### Diseños experimentales

Todos los estudios fueron aprobados por los Comités de Ética de las Facultades de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires, Argentina y de Montevideo, Uruguay. Los dueños de los pacientes dieron su consentimiento firmado respecto a la autorización para que sus perros participaran de este estudio.

Los animales considerados sanos en esta tesis son animales que fueron eutanasiados a causa de politraumatismos severos. El **Artículo I** que estudió la expresión de transcritos acorde al estado del tejido (sano vs carcinoma) incluyó 7 animales sanos (3 hembras y 4 machos) y 8 perros con carcinoma tiroideo sometidos a cirugía para la remoción del tejido tumoral. Fueron excluidos del estudio los perros con carcinoma de tiroides que presentaban metástasis local o a distancia al momento del diagnóstico. Todos los carcinomas fueron de origen folicular: folicular (n=3), folicular-compacto (n=4) y compacto (n=1). De este grupo, se tomó una biopsia de tejido tiroideo sano del lóbulo contralateral en 4 animales (lóbulo tiroideo contralateral). Para determinar si la expresión proteica determinada por inmunohistoquímica en las células foliculares, endoteliales y fibroblastos se encontraba alterada por el estado del tejido (sano vs carcinoma, **Artículo II**) se tomaron muestras de tiroides de 8 animales sanos y 8 animales con carcinoma tiroideo (carcinoma folicular (n=3), foliculares-compactos (n=4) y compactos (n=1). En el siguiente estudio (**Artículo III**) se investigó además el efecto del grado de diferenciación del tumor y para ello se incluyeron 8 perros sanos y 16 perros con carcinoma tiroideo (carcinomas folicular-compactos (n=8) y compacto (n=8). En el último estudio de esta tesis (**Artículo IV**) que buscaba evaluar los efectos de la isotretinoína 9-cis (AR9-cis) como droga alternativa a la tradicional (doxorrubicina) y un grupo de perros sin tratamiento postquirúrgico (control), se incluyeron 12 carcinomas foliculares, 17 foliculares-compactos, 6 compactos y 2 papilares homogéneamente distribuidos entre los tratamientos.

Las muestras de tiroides (sanas y carcinomatosas) en el **Artículo I** se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C hasta la extracción de ARNm. Las muestras de tejido en los **Artículos II, III y IV** se almacenaron en formaldehído al 4% y se realizaron los bloques de parafina. Se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina para el estudio histopatológico y los tumores se clasificaron según los criterios descritos por Meissner y Warren (1969). Además, la clasificación tuvo en cuenta la determinación de tiroglobulina y calcitonina por inmunohistoquímica acorde a Patnaik y Lieberman (1991); todos los tumores incluidos en esta tesis fueron positivos para tiroglobulina y negativos para calcitonina. Se tomaron muestras de sangre de los animales sanos y con carcinoma para evaluar el estatus hormonal (T4 libre y TSH).

En el **Artículo IV**, los animales que no recibieron ningún tratamiento por decisión de los propietarios constituyeron el grupo control (n=10), mientras que el resto de los animales fueron distribuidos al azar en los grupos doxorrubicina (dosis 30 mg/m<sup>2</sup> cada 3 semanas, 6 ciclos completos, n=12) o AR9-cis (dosis 2 mg/kg/día como cápsulas entéricas confeccionadas acorde al peso vivo del animal durante 6 meses, n=15).

Se consideró hipotiroidismo cuando la TSH estuvo por encima de 0.4 ng/mL pero la T4 libre (fT4) dentro del rango normal (0.7-2.5 ng/dL, hipotiroidismo subclínico), o la TSH aumentada y la T4 libre disminuida (hipotiroidismo clínico) de acuerdo a lo descrito por Castillo y col. (2001) y Ferm y col. (2009). Se consideró hipertiroidismo cuando la fT4 estuvo por encima del valor de referencia. A todos los perros se les realizó diagnóstico ultrasonográfico y de centelleo con un escáner en una cámara gama con  $^{99m}\text{Tc}$ . El estudio se realizó por 540 días luego de la cirugía, dentro de los primeros 180 días se realizó el tratamiento y el resto de tiempo los animales estuvieron sin tratamiento.

#### Determinaciones de TSH y T4 libre (fT4)

Las determinaciones hormonales fueron realizadas sólo 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 por quimioluminiscencia usando un kit comercial de Siemens. 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.

#### Determinación de transcritos por PCR tiempo real

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  $\mu\text{g}$  total de ARN como molde. Los primers específicos para amplificar cDNA fueron diseñados basados en las secuencias nucleotídicas de canis lupus familiares disponibles en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación a la empresa Macrogen (Korea) y se confirmó la identidad de la secuencias en el Gene Bank utilizando el algoritmo blast.

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, Sosa y col., 2010). Los ciclos a la línea de base (CT=threshold) no difirieron entre grupos. La cuantificación de los transcritos fue determinada en RT-PCR en tiempo real (real-time RT-PCR; Rotor-Gene<sup>TM</sup> 6000; Corbett Life Sciences, Sydney, Australia) usando SYBR green (Quantimix; Biotools, Madrid, Spain). 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 ( $\Delta CT - [CT(\text{gen de interés}) - CT(\text{control interno})]$ ) 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 y Schmittgen, 2001).

### Inmunohistoquímica y análisis de imagen

La inmunoreactividad para estas proteínas se visualizó en secciones transversales de 5- $\mu\text{m}$  tanto en el tejido tiroideo sano como en los carcinomas usando la técnica inmunohistoquímica avidina-biotina peroxidasa previamente descrita (Meikle y col., 2000). El sitio de la enzima unida se visualizó mediante la aplicación de 3, 3'-diaminobencidina en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , un cromógeno que produce un precipitado insoluble marrón cuando se incuba con la enzima. Las secciones fueron contrastadas con hematoxilina. Los controles negativos para cada receptor se obtuvieron mediante la sustitución del anticuerpo primario con una IgG no inmune homóloga a concentraciones equivalentes (Santa Cruz). Se adjunta tabla con los anticuerpos primarios utilizados para cada proteína.

Tabla 1. Información de Anticuerpos primarios utilizados para la localización de los antígenos.

| <b>Anticuerpo</b>             | <b>Proveedor</b>         | <b>Ac Primario</b> | <b>Ac Secundario</b> | <b>Dilución</b> |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------|----------------------|-----------------|
| <b>TSH-R</b>                  | Aviva Systems Biology    | Policlonal Rabbit  | Goat anti-rabbit IgG | 1:25            |
| <b>TG</b>                     | Santa Cruz Biotechnology | Monoclonal Mouse   | Horse anti-mouse IgG | 1:75            |
| <b>TTF-1</b>                  | Santa Cruz Biotechnology | Policlonal Rabbit  | Goat anti-rabbit IgG | 1:400           |
| <b>PCNA</b>                   | Santa Cruz Biotechnology | Monoclonal Mouse   | Horse anti-mouse IgG | 1:75            |
| <b>VEGF</b>                   | Santa Cruz Biotechnology | Policlonal Rabbit  | Goat anti-rabbit IgG | 1:200           |
| <b>FGF-2</b>                  | Santa Cruz Biotechnology | Policlonal Rabbit  | Goat anti-rabbit IgG | 1:200           |
| <b>IGF-1</b>                  | Santa Cruz Biotechnology | Policlonal Goat    | Goat anti-rabbit IgG | 1:50            |
| <b>IGF-1R</b>                 | Abcam                    | Policlonal Rabbit  | Goat anti-rabbit IgG | 1:50            |
| <b>RAR<math>\alpha</math></b> | Santa Cruz Biotechnology | Policlonal Rabbit  | Goat anti-rabbit IgG | 1:100           |
| <b>RXR</b>                    | Santa Cruz Biotechnology | Policlonal Rabbit  | Goat anti-rabbit IgG | 1:100           |
| <b>Calcitonina</b>            | Dako                     | Policlonal Rabbit  | Goat anti-rabbit IgG | 1:1000          |

La densidad celular, número de folículos y los vasos sanguíneos y la inmunotinción de proteínas inmunorreactivas en los diferentes tipos celulares se estimó en treinta fotografías a lo largo del slide a 40X tomado de cada corte histológico por dos observadores independientes cegados al grupo. En cada slide, se evaluaron tres tipos de células: folicular, células endoteliales y fibroblastos. La tinción de los núcleos o citoplasma se puntuó como negativo (-), débil (+), moderada (+ +) o intensa (+ + +) y se expresó el grado de tinción de cada tipo de célula sobre una escala de 0 -10 (Thatcher y col., 2003), donde 0 es la ausencia de tinción y 10 es la intensidad de tinción máxima. La intensidad media de tinción se calculó como  $1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3$ , donde n es la proporción de células en cada campo exhibiendo, tinción débil (n1) moderada (n2) e intensa (n3) (Boos y col., 1996).

### Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el paquete estadístico SAS (Sistema de Análisis Estadístico, SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.). Se realizó un análisis univariado de los datos en todas las variables para identificar valores atípicos y para verificar la normalidad de los residuales.

Los transcriptos (**Artículo I**) fueron analizados por el procedimiento mixto (Proc Mixed, Statistical Análisis System, SAS) incluyendo en el modelo el grupo (sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y contralateral sano) como efectos fijos. El plato de PCR se consideró como efecto aleatorio. Además, se analizó el efecto del sexo en el grupo sano. Se realizaron correlaciones de Pearson para estudiar asociaciones entre variables.

El número de folículos y los vasos, la densidad de células y la intensidad de tinción promedio se analizó con un modelo estadístico que incluyó el efecto de la condición de los animales (sanos vs carcinoma), tipo celular (foliculares, fibroblastos y células endoteliales) e interacciones (**Artículo II**), presentando en el **Artículo III** el mismo modelo pero incluyendo ambos tipos de carcinomas (e.j. condición de los animales: sano, carcinoma folicular-compacto y compacto).

La evaluación de recurrencia del tumor y de la supervivencia de los animales (**Artículo IV**) se evaluó por el Proc Survival del paquete estadístico SAS incluyendo en el modelo el tratamiento (control, doxorubicina o ARcis-9) y el tipo de tumor (folicular, folicular-compacto o compacto). Se calculó además el riesgo relativo y el hazard ratio con una tabla de contingencia para analizar diferencias entre grupos por el test de Fisher a  $P < 0.05$ , utilizando el software STATA, (USA). Para analizar la interacción entre el tipo de tumor y el tratamiento se utilizó el procedimiento genmod (Proc Genmod, Statistical Análisis System, SAS) incluyendo en el modelo el tratamiento, el tipo de tumor (folicular, folicular-compacto y compacto) y sus interacciones, con una distribución de Poisson.

Los datos se presentaron como promedios  $\pm$  SEM. El nivel de significación fue  $P < 0.05$ .

## Resultados principales

En animales sanos, el nivel de expresión de ARNm de TSH-R y Tg fue mayor o tendió a ser mayor en hembras que en machos ( $P = 0.021$  y  $P = 0.06$ , respectivamente, **Artículo I**), no encontrándose diferencias en la expresión de los transcritos de los otros genes analizados, TPO, TTF-1, PAX-8, IGF-1 y ER $\alpha$ .

La expresión de ARNm del TSH-R no fue diferente entre los grupos. El grupo carcinoma tuvo menor expresión de ARNm de Tg y TPO que los grupos sanos y lóbulo contralateral (CL,  $P < 0.05$ ), mientras que no se encontraron diferencias entre estos últimos grupos (Figura 2, **Artículo I**). La expresión de ARNm de TTF-1 fue mayor en el grupo CL que en el grupo sano y carcinoma ( $P < 0.05$ ), que no difirieron entre sí. La expresión de mRNA de IGF-1 fue mayor en el grupo CL que en el grupo carcinoma ( $P < 0.05$ ).

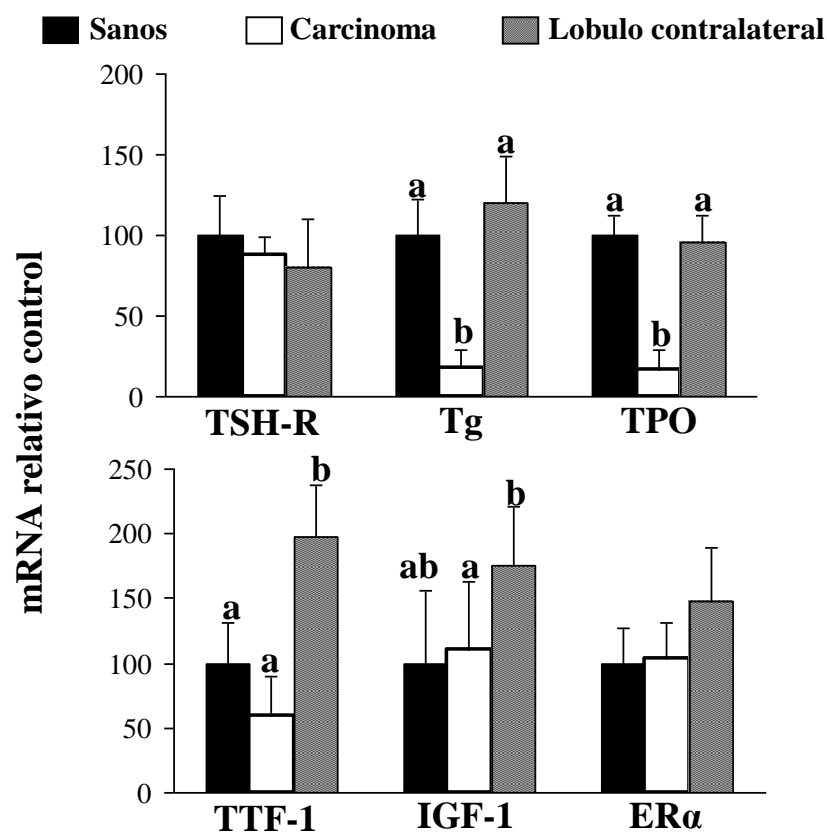


Figura 2. Nivel de expresión de los transcritos (100% = expresión mRNA grupo control) de TSH-R, Tg, TPO, TTF-1, IGF-1 y ER $\alpha$  en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo contralateral. Las diferentes letras indican diferencias en el mismo gráfico,  $P < 0.05$  (cuadrado de las medias  $\pm$  error estándar).

En tiroides sanas, los transcritos de TTF-1, IGF-1 y ER $\alpha$  presentaron un coeficiente de correlación medio (valores de  $r$  oscilaron entre 0.65 a 0.81,  $P < 0.04$ ), mientras que en el tejido carcinomatoso, no se observó correlación de la expresión de estos genes (**Artículo I**).



En el **Artículo II**, el grupo carcinoma estuvo conformado por 3 carcinomas foliculares, 4 foliculares-compactos y un compacto. El número de folículos fue menor en el grupo carcinoma que en el sano ( $P < 0.0001$ ) y la densidad celular y el número de vasos sanguíneos fue mayor ( $P < 0.0001$  y  $P = 0.034$ , respectivamente). En el **Artículo III**, los grupos carcinoma fueron clasificados acorde a la histopatología del tumor, habiendo 8 foliculares-compactos y 8 compactos. La densidad celular de los compactos tendió ( $P = 0.06$ ) a ser mayor que las de los foliculares-compactos y ambos presentaron una mayor densidad celular que el grupo sano ( $P < 0.03$ ). Los carcinomas foliculares-compactos presentaron y los compactos tendieron a presentar un mayor número de vasos que las glándulas tiroideas sanas ( $P = 0.010$  y  $P < 0.1$ , respectivamente).

Se observó tinción para TSH-R y Tg en el citoplasma de las células foliculares y de los fibroblastos, pero no en las células endoteliales (**Artículo II**). La tinción de TTF-1 y PCNA fue nuclear pero mientras PCNA se observó en células foliculares y fibroblásticas, TTF-1 se observó sólo en células foliculares. VEGF, FGF-2 IGF-1, IGF-1R, RAR $\alpha$  y RXR presentaron tinción citoplasmática en las células foliculares, endoteliales y fibroblastos, pero se observó además tinción nuclear de IGF-1R RAR $\alpha$  y RXR en algunas muestras de carcinomas y únicamente en células foliculares (**Artículos II y III**).

No se encontraron diferencias en la intensidad de tinción de TSH-R y Tg entre los grupos sanos y carcinomas (datos no mostrados, **Artículo II**); además las células foliculares presentaron mayor inmunotinción que los fibroblastos ( $P < 0.0001$ ). Se encontró cerca de dos y tres veces mayor contenido de TTF-1 y PCNA respectivamente, en las células foliculares del tejido carcinomatoso respecto del sano ( $P < 0.05$ , Figura 3). Un patrón similar se observó en PCNA en los fibroblastos.

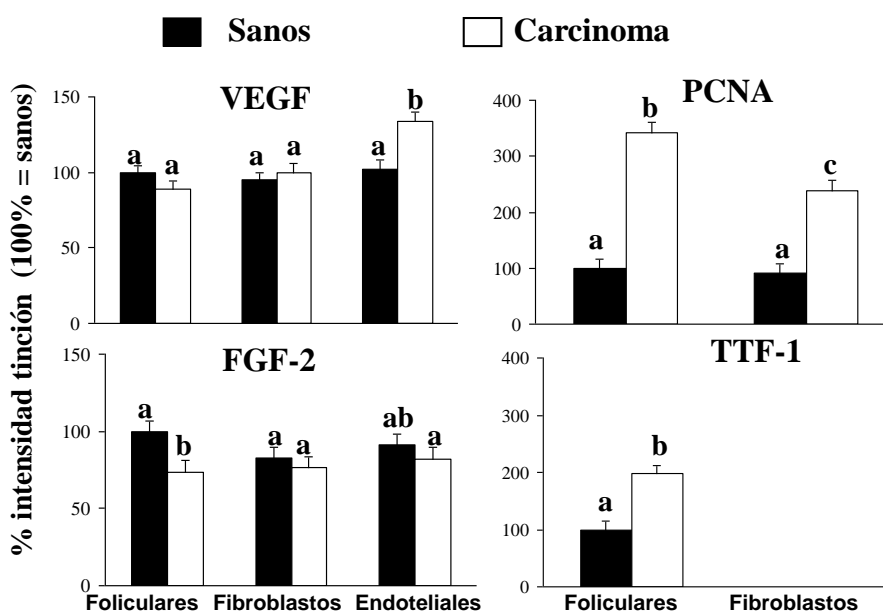


Figura 3. Intensidad de tinción (expresado en porcentaje, 100% = intensidad de tinción de las células foliculares del grupo control) de VEGF, FGF-2, PCNA y TTF-1 en células foliculares, fibroblastos y células endoteliales de glándulas sanas y carcinomatosas (**Artículo II**). Las diferentes letras

indican diferencias en el mismo gráfico,  $P < 0.05$  (cuadrado de las medias  $\pm$  error estándar).

Se encontró mayor tinción de VEGF en las células endoteliales del carcinoma respecto de los sanos (**Artículo II**, Figura 3), y mayor tinción de VEGF en células endoteliales y fibroblastos del carcinoma compacto respecto al tejido sano (**Artículo III**, Figura 4). La tinción de FGF-2 fue mayor en las células foliculares sanas que las carcinomatosas (**Artículo II**), pero esto no se encontró en el **Artículo III**. Las células endoteliales de los carcinomas compactos presentaron ( $P < 0.05$ ) mayor FGF-2 que las glándulas sanas y los carcinomas foliculares-compactos (**Artículo III**, Figura 4). Los fibroblastos y células endoteliales en carcinomas compactos presentaron mayor tinción de IGF-1 e IGF-1R que los mismos tipos celulares en las glándulas tiroideas sanas ( $P < 0.05$ , **Artículo III**). Las células endoteliales de los carcinomas foliculares-compactos presentaron mayor tinción de IGF-1R que las de las glándulas tiroideas sanas ( $P < 0.05$ , **Artículo III**). Los fibroblastos de los carcinomas compactos presentaron mayor contenido de IGF-1R que los de los carcinomas folicular-compactos ( $P < 0.05$ ).

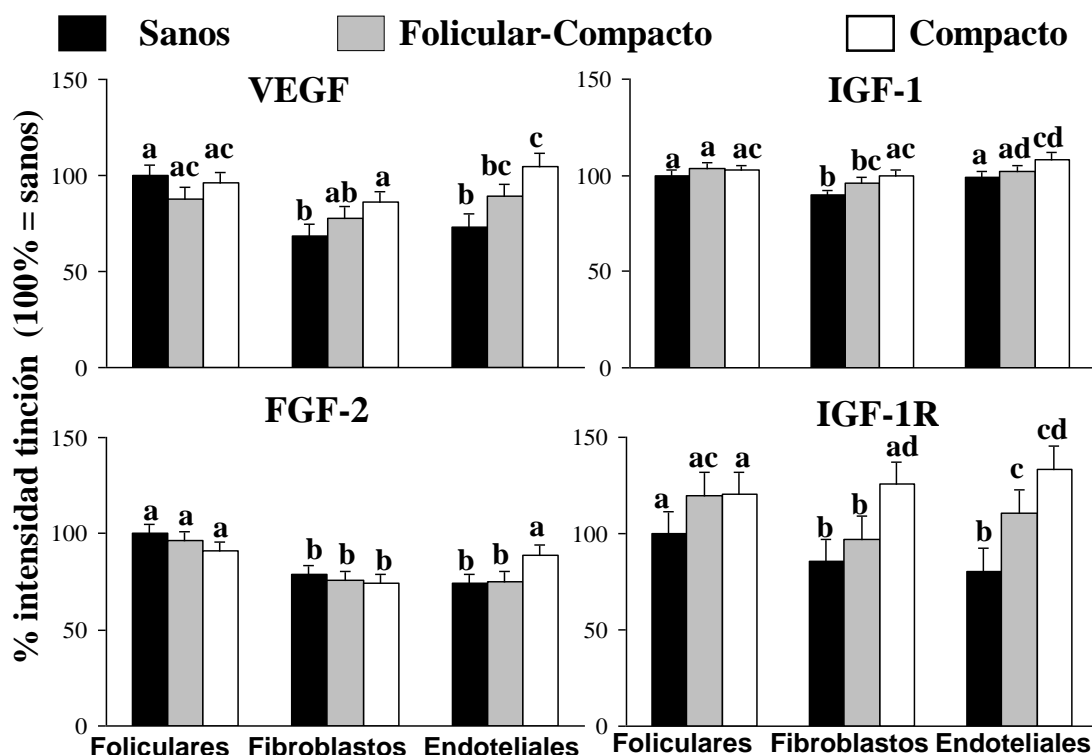


Figura 4. Intensidad de tinción (expresado en porcentaje, 100% = intensidad de tinción de las células foliculares del grupo control) de VEGF, FGF-2, IGF-1 y IGF1-R en células foliculares, fibroblastos y células endoteliales de glándulas sanas, carcinomas foliculares compactos y compactos (**Artículo III**). Las diferentes letras indican diferencias en el mismo gráfico,  $P < 0.05$  (cuadrado de las medias  $\pm$  error estándar).

Las células endoteliales de los tumores compactos presentaron una mayor expresión de  $RAR\alpha$  que las de los tumores foliculares-compactos y las glándulas sanas. Se encontró un patrón de expresión de  $RXR$  alterado de acuerdo a los grupos (interacción tratamiento y tipo celular,  $P < 0.05$ , **Artículo III**), mientras que en las

glándulas sanas se encontró una mayor tinción en las células foliculares que en los fibroblastos y las endoteliales ( $P < 0.005$ ), no se encontraron diferencias en la expresión de RXR entre los tipos celulares en ambos tipos de carcinoma (datos no mostrados, **Artículo III**).

En general, la inmunotinción en los diferentes tipos celulares dependió del estatus del animal. En animales sanos, la expresión de la mayoría de los factores determinados en el **Artículo III**, fue mayor en las células foliculares que en los fibroblastos y células endoteliales, pero esto no ocurrió en ambos tipos de carcinoma donde – en general- la expresión de estos factores en células endoteliales y fibroblastos fue más importante.

En el estudio de tiempo de recurrencia y sobrevida luego de tratamientos AR9-cis, doxorubicina o sin tratar (controles) se incluyeron 12 tumores foliculares, 17 foliculares-compactos, 6 compactos y 2 papilares (**Artículo IV**). Los tumores foliculares fueron en su mayoría hipercaptantes (11/12), hiper (5/12) o eutiroides (6/12); los foliculares-compactos normocaptantes (10/17) y eutiroides (10/14) y los compactos fueron todos hipocaptantes e hipotiroideos. Los carcinomas papilares fueron normocaptantes y eutiroides.

El tiempo de recurrencia fue más corto en los grupos control y doxorubicina que en el grupo AR9-cis ( $P < 0.03$ , Figura 5, **Artículo IV**). El tiempo de recurrencia para el 50% de los perros control y doxorubicina fue de 195 días (95% CI: 180-390) y 225 días (95% CI: 210-420) respectivamente, mientras que sólo el 13.3 % de los perros AR9-cis presentaron recurrencia luego de los 360 días. El tipo de carcinoma afectó el tiempo de recurrencia, siendo mayor en los foliculares, que en los foliculares-compactos y estos a su vez que los compactos ( $503 \pm 15$  vs  $289 \pm 13$  vs  $215 \pm 21$  días,  $P < 0.0001$ ). La interacción entre tratamiento y tipo de carcinoma fue significativa ( $P < 0.001$ ) ya que no se encontraron diferencias de los tratamientos en los carcinomas foliculares, pero en los otros tipos de carcinomas, los perros AR9-cis presentaron un mayor tiempo de recurrencia que los perros con doxorubicina o controles, no habiendo diferencias entre éstos dos últimos.

El tiempo de sobrevida fue mayor en los perros tratados con AR9-cis respecto de los controles y los tratados con doxorubicina ( $P = 0.0007$  y  $P = 0.008$  respectivamente, **Artículo IV**). El tiempo medio de sobrevida fue 220 días (95% CI: 180-450) para los controles y 390 días (95% CI: 240-540) para los perros tratados con doxorubicina, mientras que solo 3 perros del grupo AR9-cis murieron durante el experimento. Al final del ensayo (540 días), 20% de los perros control, 33.3% de los tratados con doxorubicina y 80% de los pacientes tratados con AR9-cis sobrevivieron. El tipo de carcinoma afectó el tiempo de sobrevida, siendo mayor en los foliculares que en los foliculares-compactos y éstos a su vez que los compactos ( $526 \pm 15$  vs  $347 \pm 13$  vs  $221 \pm 21$  días,  $P < 0.0001$ ). La interacción entre tratamiento y tipo de carcinoma fue significativa, y el patrón fue similar para lo descrito en recurrencia.

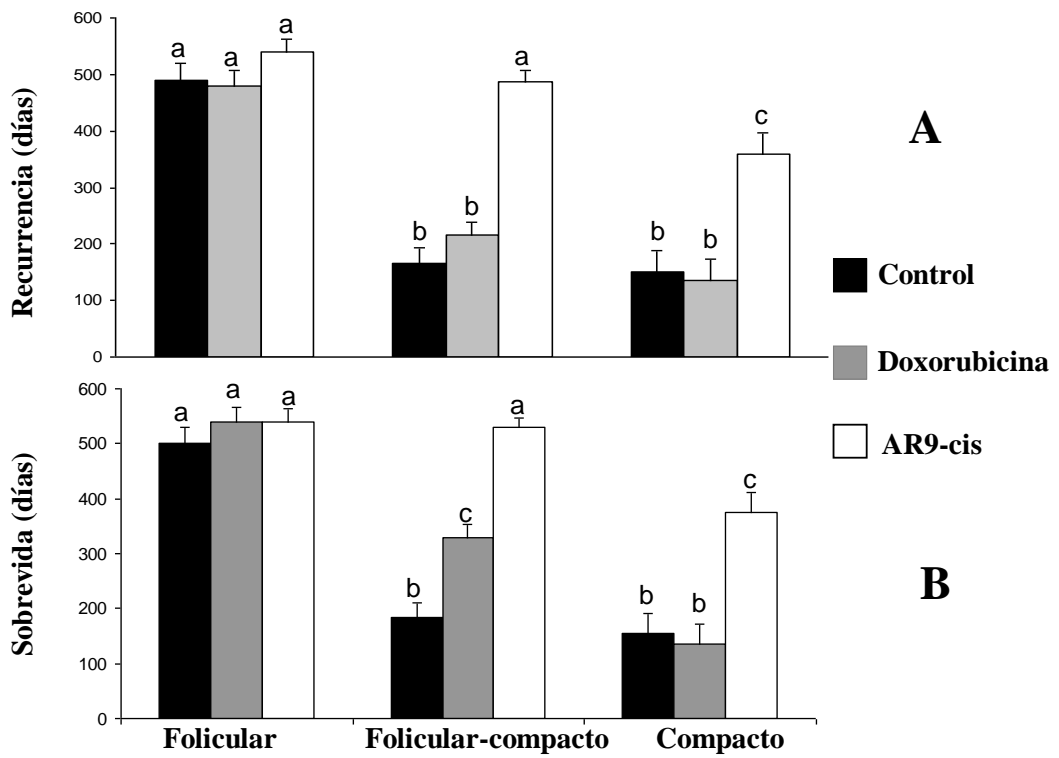


Figura 5. Tiempo de recurrencia (A) y supervivencia (B) en perros con carcinomas foliculares, foliculares-compactos y compactos luego del tratamiento con doxorubicina, isotretinoína 9-cis (AR9-cis) y sin tratar (control). Las letras indican diferencias entre tratamientos y tipos de cáncer,  $P < 0.05$ .

## Discusión general

En animales sanos, el género afectó la expresión de los transcritos de TSH-R y Tg en tiroides, siendo mayor en hembras que en machos (**Artículo I**), y no hemos encontrado reportes similares en perros. La mayor expresión génica de Tg en las hembras podría estar relacionada a una mayor sensibilidad en la glándula tiroidea a la TSH (TSH-R, mayor concentración mRNA de TSH-R). En la mujer, la captación  $I^{131}$  es mayor que en el hombre (González y col., 2008) y 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). Manole y col. (2001) reportó que el  $17\beta$ -estradiol (E2) tiene un efecto estimulador del crecimiento en las células tiroideas benignas y malignas, lo que podría explicar la mayor frecuencia – de tres a cuatro veces- de tumores de tiroides en la mujer que en el hombre (Henderson y col., 1982; Bukhari y col., 2010). Existe poca información en caninos al respecto, pero se ha reportado que el sexo no sería un factor de riesgo para el cáncer tiroideo (Harari y col., 1986). Este es el primer informe de la presencia de ER $\alpha$  en la glándula tiroidea canina, siendo su expresión similar entre los sexos. Se podría postular que el riesgo de carcinoma tiroideo en las hembras caninas es menor que en las mujeres debido a que las perras – dependiendo de las costumbres de los países- son gonadectomizadas a edad temprana y que sus ciclos reproductivos son estacionales.

No se encontraron diferencias en la expresión génica del TSH-R entre las glándulas tiroideas sanas y carcinomatosas y el lóbulo contralateral sano del paciente con cáncer (CL, **Artículo I**), ni tampoco en el contenido de TSH-R determinado por inmunohistoquímica entre las glándulas tiroideas sanas y carcinomatosas (**Artículo II**). 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), dado que la sensibilidad de la glándula tiroidea a la TSH en el carcinoma se mantiene, se ha sugerido que la TSH puede seguir actuando como un factor de crecimiento tumoral (Verschueren y col., 1992). En contraste con los resultados de ARNm de TSH-R, la expresión de los transcritos de Tg y TPO fueron menores en el grupo carcinoma que en los animales sanos y en el CL (**Artículo I**), lo que sugiere que el tejido carcinomatoso tiene una menor capacidad de síntesis de hormonas tiroideas. 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. Por otro lado, la inmunotinción de Tg fue similar entre el grupo carcinoma y el sano (**Artículo II**), lo que sugiere modificaciones post-transcripcionales en el cáncer. Esto es consistente con varios reportes que 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). Un hallazgo novedoso fue la localización de Tg y TSH-R en los fibroblastos de la glándula tiroidea, sin embargo, no podemos explicar la relevancia de su presencia en éste tipo celular.

Aun considerando, que el **Artículo I** incluyó un muy bajo número de animales, uno de los hallazgos más interesantes de este estudio fue el aumento de casi 3 veces en la expresión de mRNA de TTF-1 y en menor grado, de IGF-1 en el lóbulo tiroideo contralateral sano respecto del tejido carcinomatoso. TTF-1 e IGF-1 son factores mitogénicos implicados en la proliferación y diferenciación celular (Ramos-Vara y col., 2002; Lacroix y col., 2006; Kondo y col., 2009), por lo tanto, se puede postular 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. Estos hallazgos no pudieron ser confirmados a nivel de la proteína debido a la dificultad en la obtención de muestras de lóbulo contralateral sano en perros con carcinoma tiroideo. La intensidad de tinción de TTF-1 en células foliculares e IGF-1 en fibroblastos y células endoteliales fueron mayores en carcinomas que en glándulas tiroideas sanas (**Artículos II y III**). Un patrón similar se encontró para PCNA en células foliculares y fibroblastos y para IGF-1R en fibroblastos y células endoteliales. Este trabajo constituye el primer reporte en perros que detecta simultáneamente IGF-1/IGF-1R en glándulas tiroideas sanas y carcinomatosas, y el aumento encontrado en cáncer tiroideo es consistente con los trabajos previos que demuestran una sobreexpresión de éstos factores (Vella y col., 2001). Todas estas proteínas son factores mitogénicos y relacionados con el crecimiento tisular y el aumento observado es consistente con la mayor densidad celular determinada (**Artículos II y III**). Tomando en cuenta la pérdida en la relación (correlación) de los transcritos en el tejido carcinomatoso (**Artículo I**) y la expresión proteica aumentada (**Artículos II y III**), se podría sugerir que una alteración en la conversación de éstos factores está en la base del mecanismo del carcinoma tiroideo. De hecho, en humanos, los análisis de sobrevida que utilizan PCNA como marcador muestran un mejor pronóstico en pacientes con bajos índices de PCNA (Konturek y col., 2012).

El aumento encontrado en la expresión de VEGF en células endoteliales (**Artículos II y III**) y fibroblastos (**Artículo III**) en tiroides carcinomatosas está de acuerdo con lo reportado para otros tipos de tumor (Yonemaru y col., 2006; Al-Dissi y col., 2010; Yu y col., 2012). La mayor expresión de VEGF se asocia con el mayor número de vasos observado en ambos trabajos, dado su rol como promotor en la angiogénesis. Se ha reportado que tumores de 1 -2 mm de tamaño se sostienen por difusión simple, pero el crecimiento posterior depende de la angiogénesis (Soh y col., 1997). La inmunopositividad de VEGF en los fibroblastos resultó contradictoria en esta tesis: no se encontraron diferencias en el **Artículo II** ni entre los carcinomas foliculares-compactos y los sanos (**Artículo III**) y fue mayor en los carcinomas compactos en el **Artículo III**; esto podría deberse a que los tumores en el **Artículo III** fueron clasificados de acuerdo al grado de diferenciación (foliculares-compactos y compactos), mientras que en **Artículo II**, el grupo carcinoma estuvo integrado por 3 foliculares, 4 foliculares-compactos y 1 compacto. Similares reflexiones pueden hacerse para la expresión de FGF-2 que fue mayor en las células endoteliales del carcinoma compacto respecto los sanos en el **Artículo III** y no difirieron en el **Artículo II**, donde los sanos presentaron una mayor inmunotinción en células foliculares. El aumento en la expresión de ambos factores (VEGF y FGF-2) en células del estroma sostiene la idea del feedback positivo entre ambos que contribuye con la progresión del tumor, si bien VEGF parece ser más efectivo en la neovascularización que FGF-2 (Giavazzi y col., 2003).

Los hallazgos más notables en relación a cambios en la expresión de factores, se observaron en las células foliculares (2y 3 veces mayor expresión de TTF-1 y PCNA respectivamente, **Artículo II**). Sin embargo es importante destacar que la mayoría de los factores determinados en el **Artículo III** se encontraron aumentados en las células endoteliales y en los fibroblastos y no en las células tumorales propiamente dichas (células foliculares). Esto refuerza la existencia de una conversación entre éstos tipos celulares que, a través de señales de proliferación y/o facilitando el acceso de nutrientes, contribuyen con la progresión del tumor (Dvorak, 1986; Bouzigos y col., 1991; Gribben y col., 2010). De hecho se ha demostrado que el estroma puede desencadenar tumores (Bissell y Radisky, 2001) y la hipótesis actual de la oncogénesis reside en la funcionalidad del estroma, si bien no está claro como las células del estroma y tumorales evolucionan (Gribben y col., 2010).

No hemos encontrado reportes que estudien la expresión de RAR $\alpha$  y RXR en glándulas tiroideas sanas y carcinomatosas en caninos. No se encontraron diferencias en la expresión de RAR $\alpha$  en las células tumorales, pero las células endoteliales de los tumores compactos presentaron una mayor expresión de RAR $\alpha$  que los otros grupos (folicular-compactos y sanos, **Artículo III**). Si bien las células endoteliales no se indiferencian, sí proliferan y sostienen el crecimiento vascular para proveer nutrientes a las células tumorales (foliculares). Si bien los datos de RXR son preliminares debido a que en esta tesis se determinaron todas las isoformas juntas y sólo algunas se modifican acorde al cáncer (Haugen y col., 2008), se observó una alteración en el patrón. En las glándulas tiroideas sanas se encontró un mayor contenido de RXR en las células foliculares respecto de los fibroblastos y las células endoteliales, no encontrándose diferencias acorde al tipo celular en ambos tipos de carcinoma, sugiriendo que existe un cambio en la funcionalidad del tejido en la oncogénesis.

La presencia de estos receptores en carcinomas foliculares-compactos y compactos (**Artículo III**) es consistente con la respuesta al tratamiento observada en perros tratados con AR9-cis (**Artículo IV**). Si bien los resultados son preliminares debido al bajo número de animales incluidos en el ensayo, los resultados obtenidos con AR9-cis en tiempo de sobrevida postcirugía son notables (sobrevivieron: 20% de los perros controles, 33.3 % de los tratados con doxorrubicina y 80% de los tratados con AR9-cis, a los 540 días de iniciado el ensayo). Los ácidos retinoicos (ARs) regulan la expresión de genes supresores de tumor e inhiben el crecimiento tumoral (Connolly y col., 2013) y han sido usados de forma exitosa en el tratamiento de cánceres en humanos (Hansen y col., 2000; Lengfelder y col., 2005). Específicamente en carcinoma tiroideo humano los ARs son agentes anti-proliferativos que promueven la diferenciación celular (Coelho y col., 2005; Trojanowicz y col., 2009; Oh y col., 2011; Coelho y col., 2011). En perros, no hemos encontrado otros reportes que los de Castillo y col. (2010) en el síndrome de Cushing, cuyos resultados son alentadores respecto del uso de ésta droga.

El tipo de tumor modificó la respuesta a los tratamientos, mientras que en los carcinomas foliculares no se encontraron diferencias entre tratamientos, los perros con carcinomas foliculares-compactos y compactos tratados con AR9-cis presentaron un mayor tiempo de recurrencia y sobrevida que los otros grupos (doxorrubicina y controles). Si bien el tratamiento con doxorrubicina no modificó el tiempo de recurrencia respecto de los controles, si prolongó el tiempo de sobrevida

en los carcinomas foliculares-compactos, sugiriendo que logra retrasar la progresión del tumor. Los tiempos de recurrencia y sobrevida acorde al tipo histológico del tumor son consistentes con la malignidad correspondiente propuesta (Verschueren y col., 1992) y con la funcionalidad encontrada (perfil tiroideo y captación de  $^{99m}\text{Tc}$ ). Como era esperable, los pacientes hipertiroideos (carcinomas foliculares) presentaron una alta captación de  $^{99m}\text{Tc}$ , mientras que en los pacientes hipotiroideos (carcinomas foliculares-compactos o compactos) la captación fue menor. Esto está de acuerdo con los estudios de Verschueren y col. (1992), que describieron que a mayor grado de indiferenciación, las concentraciones de receptor de TSH y la captación de  $^{99m}\text{Tc}$  son menores.



## Conclusiones

- La expresión génica de Tg y TPO es menor en los carcinomas tiroideos respecto a las tiroides sanas, sugiriendo una capacidad funcional de síntesis de hormonas tiroideas disminuida.
- El lóbulo tiroideo contralateral sano presenta concentraciones mayores de Tg y TPO que el lóbulo carcinomatoso y una mayor concentración de transcritos de TTF-1 e IGF-1, lo que sugiere un mecanismo compensatorio para mantener la función tiroidea normal (eutiroidismo).
- El mayor contenido proteico de factores vinculados con la proliferación y angiogénesis (TTF-1, PCNA, IGF-1, IGF-1R y VEGF) en el carcinoma respecto del tejido sano, es consistente con la mayor densidad celular y capilaridad, y constituyen una red de señales que estarían en la base de la oncogénesis.
- La expresión proteica depende del tipo de carcinoma, siendo mayor la expresión de factores mitogénicos y angiogénicos en las células del estroma de cánceres más indiferenciados; los datos sostienen el rol de éstas células en la progresión del tumor.
- El tratamiento del carcinoma con AR9-cis post-cirugía aumenta de forma significativa el tiempo de recurrencia y sobrevida en comparación con el tratamiento con doxorubicina. Los efectos del tratamiento dependieron del tipo histológico del carcinoma tiroideo.

## Perspectivas

Investigar sobre los mecanismos de la oncogénesis del carcinoma tiroideo canino, así como también estudiar los cambios biológicos que inducen los tratamientos es complejo, costoso y difícil por varios motivos. La frecuencia de la enfermedad es baja (1.4 %, Theilen y Madewell, 1979), por lo que la obtención de casos clínicos en un período de tiempo determinado ofrece dificultades. Además, existen factores que afectan la presentación del tumor (genética, edad, sexo, factores ambientales), que sumados a la baja prevalencia de la enfermedad, hace poco factible la obtención de un número apropiado de unidades experimentales homogéneas (perros) en tiempos adecuados para realizar estudios de biología molecular del cáncer e incursionar en nuevas formas de control del mismo. Por esta razón, las estrategias experimentales futuras deberán considerar el desarrollo de nuevos modelos experimentales (cultivos celulares a partir de tumores tiroideos caninos, trasplante de carcinomas tiroideos caninos a ratones “nude o inmunodeficientes, entre otros).

Teniendo en cuenta los hallazgos notables respecto a la sobrevida postquirúrgica de aquellos perros con carcinoma tiroideo tratados con isotretinoína 9 cis (AR9-cis) frente al tratamiento tradicional (doxorubicina) y perros sin tratamiento, se propone investigar los mecanismos de acción que están en la base de las respuestas obtenidas. Tomando en cuenta los modelos experimentales mencionados anteriormente se podrán uniformizar condiciones tales como tipo de tumor y tiempo de aparición tumoral, además de otras características inherentes al animal ya mencionadas y obtener resultados en tiempos factibles.

Por otro lado, dado que el tipo de tumor afecta tanto la expresión de marcadores tumorales en células del estroma del carcinoma como la sobrevida del paciente e interacciona con el tratamiento, se deberá incluir este aspecto en las futuras investigaciones. Asimismo, se deberá tener en cuenta el rol del tipo celular, por lo que tanto además de las determinaciones cuantitativas de las variables en todo el tejido, se deberán incluir metodologías que apunten a especificar la función específica del tipo celular. Finalmente las variables incluidas en esta tesis son –junto a otras- factores candidatos centrales en la oncogénesis y/o regulación del crecimiento del tumor. El conocer los mecanismos moleculares de las redes intra e intercelulares subyacentes en la oncogénesis, es la base para el descubrimiento de nuevas opciones terapéuticas para esta patología (Malaguarnera y col., 2012).

## Referencias

- Al-Dissi, A.N., Haines, D.M., Singh, B., Kidney, B.A., 2010, Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *Can Vet J* 51:1109-1114.
- 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.
- 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.
- Biondi, B., and Cooper, D.S., 2010, Benefits of thyrotropin suppression versus the risks of adverse effects in differentiated thyroid cancer. *Thyroid*; 20:135-146.
- Birchard, S.J., and 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.
- Bissell, M.J. and Radisky, D., 2001, Putting tumors in context. *Nature Reviews Cancer* 1: 46–54.
- Boos, A., Meyer, W., Schwarz, R. and Grunert, E., 1996, Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Animal Reproduction Science* 44: 11–21.
- Bouziges, F., Simo, P., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Kedinger, M., 1991, Altered deposition of basement membrane molecule in co-culture of colonic cancer cells and fibroblast. *International Journal of Cancer* 48: 101-108.
- 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., and Kelly, D.F., 1968, Thyroid neoplasms in the dog. A clinicopathologic study of fifty-seven cases. *Cancer* 22, 406-416.
- 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.

- Campos, M., Peremans, K., Vandermeulen, E., Duchateau, L., Bosmans, T., Polis, I., Daminet S., 2012, Effect of recombinant human thyrotropin on the uptake of radioactive iodine (<sup>123</sup>I) in dogs with thyroid tumors. *PLoS One* 2012;7:e50344.
- Campos, M., Ducatelle, R., Rutteman, G., Kooistra, H.S., Duchateau, L., de Rooster, H., Peremans, K., Daminet, S., 2014, Clinical, pathological and immunohistochemical prognostic factors in dogs with thyroid carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014 In review.
- Campos, M., Baert, A., Van de Maele, I., Duchateau, L., de Rooster, H., Steblaj, B., Peremans, K., Daminet, S., 2014, Effect of levothyroxine therapy on survival of dogs with thyroid tumors. In: *Pathogenesis and Treatment of Canine Thyroid Tumors*. Chapter 6.
- Cano Valdez, A., 2009, Aspectos Histológicos del Cáncer Diferenciado de la Tiroides. *Cancerología* 4:73-83.
- Capen, C.C.: 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.
- Castillo, V; Rodriguez, MS; Lalia, J., 2001, Estimulación con TRH y evaluación de la respuesta de la TSH en perros. Su importancia en el diagnóstico de enfermedad tiroidea subclínica (hipotiroidismo subclínico y tiroiditis autoinmune eutiroidea). *Revista Científica* 11: 23-27.
- Castillo, V., 2006, Epidemiología Endócrina. En Gómez N y Feijoo, S. *Clínica Médica de Pequeños Animales I*, cap Endocrinología, ed. Aniwa, 121-122.
- Castillo, V.A., and Gallelli, M.F., 2010, Corticotroph adenoma in the dog: Pathogenesis and new therapeutic possibilities. *Research in Veterinary Science* 88;26–32.
- Chen, Y., Green, J.A., Antoniou, E., Ealy, A.D., Mathialagan, N., Walker, A.M., Avalle, M.P., Rosenfeld, C.S., Hearne, L.B., Roberts, R.M., 2006, Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology* 147:2127-2137.
- Clemente, M., Sánchez-Archidona, A.R., Sardón, D., Díez, L., Martín-Ruiz, A., Caceres, S., et al., 2013, Different role of COX-2 and angiogenesis in canine

inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. *The Veterinary Journal* 197: 427–432.

- Connolly, R.M., Nguyen, N.K., Sukumar, S., 2013, Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. *Clin Cancer Res.* Apr 1;19(7):1651-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3175. Epub 2013 Jan 15.
- Coelho, S.M., Vaisman, M., Carvalho, D.P., 2005, Tumour re-differentiation effect of retinoic acid: a novel therapeutic approach for advanced thyroid cancer. *Curr Pharm Des.* 11(19):2525-31. Review.
- Coelho, S.M., Vaisman, F., Buescu, A., Mello, R.C., Carvalho, D.P., Vaisman, M., 2011, Follow-up of patients treated with retinoic acid for the control of radioiodine non-responsive advanced thyroid carcinoma. *Braz J Med Biol Res.* Jan;44(1):73-7. Epub 2010 Nov 12.
- de Araujo-Filho, V.J., Alves, V.A., de Castro, I.V., Lourenço, S.V., Cernea, C.R., Brandão, L.G., et al., 2009, Vascular endothelial growth factor expression in invasive papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 19: 1233–1237.
- DeLellis, R.A., 2004, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization., International Academy of Pathology., International Association for the Study of Lung Cancer. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press;320.
- 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.
- Dong, J.J., Zhou, Y., Liu, Y.T., Zhang, Z.W., Zhou, X.J., Wang, H.J., Liao, L., 2013, In vitro evaluation of the therapeutic potential of nevirapine in treatment of human thyroid anaplastic carcinoma. *Molecular and Cellular Endocrinology* dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.02.001, 2013.
- Dvorak, H.F., Tumors: wound that do not heal. *N Engl Med* 1986; 315:1650-1659.
- Eggo, M.C., Hopkins, J.M., Franklyn, J.A., Johnson, G.D, Sanders, D.S., Sheppard, M.C., 1995, Expression of fibroblast growth factors in thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80: 1006–1011.
- Elisei, R., Pinchera, A., Romei, C., Gryczynska, M., Pohl, V., Maenhaut, C., Fugazzola, L., Pacini, F., 1994, 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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 78 (4), 867–871.

- 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.
- Ferm, K., Björnerfeldt, S., Karlsson, A., Andersson, G., Nachreinerz, R., Hedhammar, A., 2009, Prevalence of diagnostic characteristics indicating canine autoimmune lymphocytic thyroiditis in giant schnauzer and hovawart dogs. *Journal of Small Animal Practice* 50, 176–179.
- Fineman, L.S., Hamilton, T.A., de Gortari, A., Bonney, P., 1998, Cisplatin chemotherapy for treatment of thyroid carcinoma in dogs: 13 cases. *J Am Anim Hosp Assoc*;34:109-112.
- Francis-Lang, H., Price, M., Policarpou-Schwarz, M., Di Lauro, R., 1992, The promoter of thyroperoxidase gene indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 12:576-588.
- Frascaroli, G.C., 2007, Terapia de Rediferenciación en Cáncer de Tiroides. *RAEM*, vol 44.
- 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.
- Giavazzi, R., Sennino, B., Coltrini, D., Garofalo, A., Dossi, R., Ronca, R., Tosatti, M.P., Presta, M., 2003, Distinct role of fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor on tumor growth and angiogenesis. *The American Journal of Pathology* 162:1913-1926.
- 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 <sup>131</sup>iodine uptake values at 2 and 24 hours]. *Rev Med Chil* 136, 1288-1293.
- Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E., 2002, Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*;2:48-58.
- Gribben, J., Rosenwald, A., Gascoyne, R., Lenz, G., 2010, Targeting the microenvironment. *Leukemia and Lymphoma* 51(Suppl 1): 34–40.
- Griffey, S.M., Kraegel, S.A., Madewell, B.R., 1999, Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67 (MIB1) and mitotic counts. *Journal of Comparative Pathology* 120: 321–332.

- Hanahan, D., Weinberg, R. A. , 2011, Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144, DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hansen, L.A., Sigman, C.C., Andreola, F., Ross, S.A., Kelloff, G.J., De Luca, L.M., 2000, Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. Carcinogenesis Jul;21(7):1271-9.
- 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.
- Harris, P.J., Bible, K.C., 2011, Emerging therapeutics for advanced thyroid malignancies: rationale and targeted approaches. Expert Opin Investig Drugs 20(10):1357-75. doi: 10.1517/13543784.2011.614230. Review.
- Haugen, B.R., Larson, L.L., Pugazhenti, U., Hays, W.R., Klopper, J.P., Kramer, C.A., Sharma, V., 2008, Retinoic acid and retinoid X receptors are differentially expressed in thyroid cancer and thyroid carcinoma cell lines and predict response to treatment with retinoids. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Jan;89(1):272-80. Erratum in: J Clin Endocrinol Metab. Nov; 93(11):4553.
- Haynik, D.M., and 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.
- Jeglum, K.A., and Whereat, A., 1983, Chemotherapy of canine thyroid carcinoma. Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian 5:96-8.
- Joyce, J.A., and Pollard J.W., 2009, Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer April ; 9(4): 239-252. doi:10.1038/nrc2618.
- 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.
- Keefe, S.M., Cohen ,M.A., Brose, M.S., 2010, Targeting vascular endothelial growth factor receptor in thyroid cancer: the intracellular and extracellular implications. Clin Cancer Res;16:778-783.

- Kiupel, M., Capen, C., Miller, M., Smedley, R., 2008, Histological classification of the endocrine system of domestic animals. In: Schulman FY, ed. WHO international histological classification of tumors of domestic animals. Washington: Armed Forces Institute of Pathology 25-39.
- 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.
- Konturek, A., Barczyński, M., Nowak, W., Richter, P., 2012, Prognostic factors in differentiated thyroid cancer – a 20-years surgical outcome study. *Langenbeck's Archives of Surgery* 397: 809–815.
- 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.
- 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.
- Lengfelder, E., Saussele, S., Weisser, A., Buchner, T., and Hehlmann, R., 2005, Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 56, 261-274.
- Liptak, J.M., 2007, Canine thyroid carcinoma. *Clin Tech Small Anim Pract* 22, 75-81.
- Liu, J., and Brown, R.E., 2011, Immunohistochemical expressions of fatty acid synthase and phosphorylated c-Met in thyroid carcinomas of follicular origin. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 4(8): 755-764.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25, 402-408.
- London, C., Mathie, T., Stingle, N., Clifford, C., Haney, S., Klein, M.K., Beaver, L., Vickery, K., Vail, D.M., Hershey B, Ettinger S, Vaughan A, Alvarez F, Hillman L, Kiselow M, Thamm D, Higginbotham ML, Gauthier M, Krick E, Phillips B, Ladue T, Jones P, Bryan J, Gill V, Novasad A, Fulton L, Carreras



- J, McNeill C, Henry C, Gillings S., 2012, Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia(R)) in solid tumours. *Vet Comp Oncol*;10:194-205.
- 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.
- Masunaga, R., Kohno, H., Dhar, D.K., et al. 2000, Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 6:4064-8.
- 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.
- Meissner, W.A., and Warren, S., 1969, Tumors of the thyroid gland. *Atlas of Tumor Pathology, Second series. Fascicle 4.* Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology.
- 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.
- Mooney, C.T., and Boyd, R.J., 2007, Trastornos Tiroideos poco frecuentes. En *Manual de Endocrinología en pequeños animales*. 3a ed. cap. 19, pág. 279-288. Ediciones S, España.
- 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.
- Moretti, F., Nanni, S., Pontecorvi, A., 2000, Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14, 517-539.
- Muscella, A., Urso, L., Calabriso, N., Vetrugno, C., Fanizzi, F.P., Storelli, C., Marsigliante, S., 2009, Functions of epidermal growth factor receptor in cisplatin response of thyroid cells. *Biochemical Pharmacology* 77, 979-992.
- 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.

- Nadeau, M., and Kitchell, B.E., 2011, Evaluation of the use of chemotherapy and other prognostic variables for surgically excised canine thyroid carcinoma with and without metastasis. *Canadian Veterinary Journal* 52: 994–998.
- 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.
- Oh, S.W., Moon, S.H., Park, do J, Cho, B.Y., Jung, K.C., Lee, D.S., Chung, J.K., 2011, Combined therapy with <sup>131</sup>I and retinoic acid in Korean patients with radioiodine-refractory papillary thyroid cancer, 38(10):1798-805. doi: 10.1007/s00259-011-1849-2.
- 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.
- Panciera, D.L., Lanz, O.I., Vail, D.M., 2004, Treating thyroid and parathyroid neoplasia in dogs and cats. *Vet Med* 99: 154.
- Patel, V.A., Logan, A., Watkinson, J.C., Uz-Zaman, S., Sheppard, M.C., Ramsden, J.D., et al., 2003, Isolation and characterization of human thyroid endothelial cells. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 284: 168–176.
- Patnaik, A.K., and Lieberman, P.H., 1991, Gross, histologic, cytochemical, and immunocytochemical study of medullary thyroid carcinoma in sixteen dogs. *Vet Pathol* 28, 223-233.
- Peña, L.L., Nieto, A.I., Pérez-Alenza, D., Cuesta, P., Castaño, M., 1998, Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*; 10: 237–246.
- Pisarev, M.A., and Juvenal, G., 2010, Cáncer de Tiroides: Aspectos Moleculares y Nuevas Terapias. En *Separata Montpellier 2010 - Vol.18 N°3*.
- Radlinsky, M.G., 2007, Thyroid surgery in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 37:789-798.
- 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.
- Rivas, M., Santisteban, P., 2003, TSH-activated signaling pathways in thyroid tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol* 213, 31-45.

- Roger, P.P., and 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.
- Rzeszutko, M., Rzeszutko, W., Dziegiel, P., 2004, The morphological analysis of vasculature in thyroid tumours: immunoexpression of CD34 antigen. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 42:235–240.
- Simon, D., Körber, C., Krausch, M., Segering, J., Groth, P., Görges, R., Grünwald, F., Müller-Gärtner, H.W., Schmutzler, C., Köhrle, J., Röher, H.D., Reiners, C., 2002, Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. *European Journal Nuclear Medicine* 29:775–782.
- Sipos, J.A., Mazzaferi, E.L., 2008, Differentiated thyroid carcinoma. In: Cooper DS, ed. *Medical Management of Thyroid Disease*, Second ed. New York: Informa Healthcare, 237-295.
- Short, C.S., Suovuori, A., Cook, G., Viviany, G., Harmer, C., 2004, A phase II study using retinoids as redifferentiation agents to increase iodine uptake in metastatic thyroid cancer. *Clinical Oncology* 16: 569–574.
- 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.
- Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Meikle, A., Kamimura, S., Bilby, T., Kowalski, A.A., Badinga, L., Pershing, R., Bartolome, J., Santos J.E.P., 2003, Regulation of embryo survival in cattle *Reproduction (Suppl)* 61, 253–266.
- 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.
- Tomozawa, S., Tsuno, N.H., Sunami, E., et al. 2000, Cyclooxygenase-2 over-expression correlates with tumour recurrence, especially haema-togenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer* 83:324-8.

- Trojanowicz, B., Sekulla, C., Lorenz, K., Köhrle, J., Finke, R., Dralle, H., Hoang-Vu, C., 2010, Proteomic approach reveals novel targets for retinoic acid-mediated therapy of thyroid carcinoma. *Molecular and Cellular Endocrinology* 325, 110–117.
- Tuohy, J.L., Worley, D.R., Withrow, S.J., 2012, Outcome following simultaneous bilateral thyroid lobectomy for treatment of thyroid gland carcinoma in dogs: 15 cases (1994-2010). *J Am Vet Med Assoc*; 241:95-103.
- 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.
- Vella, V, Sciacca, L., Pandini, G., Mineo, R., Squatrito, S., Vigneri, R., Belfiore, A. 2001, The IGF system in thyroid cancer: new concepts. *Molecular Pathology* 54: 121-124.
- Verschueren, 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.
- Worth, A.T., Zuber, R.M., Hockin, M., 2005, Radioiodide (131I) therapy for the treatment of canine thyroid carcinoma. *Aust Vet J*;83:208–14.
- Wucherer, K.L., and Wilke, V., 2010, Thyroid cancer in dogs: an update based on 638 cases (1995-2005). *J Am Anim Hosp Assoc* 46, 249-254.
- Yonemaru, K., Sakai, H., Murakami, M., Yanai, T., Masegi, T., 2006, Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and their receptors (flt-1, flk-1, and flg-1) in canine vascular tumors. *Veterinary Pathology* 43: 971–980.
- Yu, C.H., Yhee, J.Y., Kim, J.H., Im, K.S., Kim, N.H., Kwon, S.Y., et al., 2012, Increased expression of vascular endothelial growth factor in neovascularized canine brain tissue. *Canadian Journal of Veterinary Research*; 76: 62–68.
- 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.
- Zatelli, M.C., Luchin, A., Piccin, D., Tagliati, F., Bottoni, A., Vignali, C., Bondanelli, M., degli Uberti, E.C., 2005, Cyclooxygenase-2 inhibitors reverse chemoresistance phenotype in medullary thyroid carcinoma by a

permeability glycoprotein-mediated mechanism. J Clin Endocrinol Metab;90:5754-5760.

## *Anexos*

# *Artículo I*

## *Artículo II*



## *Artículo III*

## *Artículo IV*