



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

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

POR

**Sofía MÉNDEZ FERNÁNDEZ
Cecilia MORA BONJOUR
Rosina SÁNCHEZ SOLÉ**

**TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria**

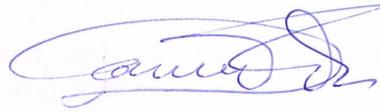
MODALIDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL

Montevideo
Uruguay
2017

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Danilo Fila

Segundo miembro (Tutor):



Dra. Paula Pessina

Tercer miembro:



Dra. Claudia Della Cella

Fecha:

18/5/2017

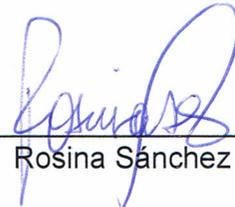
Autores:



Cecilia Mora Bonjour



Sofía Méndez Fernández



Rosina Sánchez Solé

AGRADECIMIENTOS

Les agradecemos a nuestras familias y amigos, por el apoyo de siempre.

A nuestra tutora Dra. Paula Pessina por la paciencia, dedicación y generosidad en la realización de esta tesis y en nuestra formación como profesionales.

A Isabel por su aporte para el entendimiento y desarrollo de las técnicas moleculares utilizadas.

A Ana Meikle, por su tiempo dedicado.

A todo el equipo del LEMA, por los espacios de aprendizaje e intercambio compartidos que fueron muchos y muy enriquecedores.

Al personal de biblioteca y audiovisuales por la buena disposición.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
1.RESUMEN.....	7
2.SUMMARY.....	8
3.INTRODUCCIÓN.....	9
4.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
4.1 LA GLÁNDULA TIROIDES.....	12
4.1.1 Anatomía.....	12
4.1.2 Histología.....	13
4.1.3 Embriología.....	14
4.1.4 Fisiología de la glándula tiroides.....	14
4.1.4.1 Síntesis y secreción de hormonas metabólicas tiroideas.....	14
4.1.4.2 Biosíntesis de las hormonas tiroideas.....	14
4.1.4.3 Almacenamiento de la tiroglobulina.....	16
4.1.4.4 Liberación de tiroxina y triyodotironina de la glándula tiroides.....	16
4.1.4.5 Funciones fisiológicas de las hormonas tiroideas.....	16
4.1.4.6 Regulación de la secreción de las hormonas tiroideas.....	17
4.1.4.7 Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.....	19
4.2 CANCER EN CANINOS.....	20
4.3 CARCINOMA TIROIDEO.....	21
4.3.1 Etiología.....	22
4.3.2 Antecedentes y Epidemiología.....	22
4.3.3 Tipos Histopatológicos.....	23
4.3.4 Diagnóstico.....	24
4.3.4.1 Signos clínicos.....	24
4.3.4.2 Evaluación de la masa cervical.....	25
4.3.4.3 Estatus hormonal tiroideo.....	25
4.3.4.4 Ultrasonografía cervical/Tomografía computarizada/ Resonancia magnética.....	26
4.3.4.5 Biopsia y citología.....	26
4.3.5 Tratamiento del carcinoma tiroideo.....	26

5.OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivo específico.....	30
6.HIPÓTESIS.....	31
7.MATERIALES Y MÉTODOS	32
7.1 Diseño experimental.....	32
7.2 Muestras de tejido	32
7.3 Inmunohistoquímica.....	32
7.4 Análisis de imagen.....	33
7.5 Análisis estadístico	34
8.RESULTADOS.....	35
8.1 Número de vasos sanguíneos y densidad celular.....	35
8.2 Localización de proteínas.....	35
9.DISCUSIÓN.....	39
10.CONCLUSIONES.....	42
11.BIBLIOGRAFÍA.....	43
12.ANEXO	55
<i>Proliferation, angiogenesis and differentiation related markers in compact and follicular-compact thyroid carcinomas in dogs</i>	

P. Pessina, V.A. Castillo, D. César, I. Sartore, A. Meikle

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Figura N°1. Ubicación anatómica de la glándula tiroides.....	12
Figura N°2. Histología de la glándula tiroides.....	13
Figura N°3. Proceso de incorporación y oxidación de yoduro en la célula..... folicular tiroidea. Biosíntesis de hormonas tiroideas.	15
Figura N°4. Regulación endócrina del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo.....	19
Figura N°5. Las características-Hallmark-del cáncer.....	20
Figura N°6. Aspecto microscópico del carcinoma folicular y papilar.....	24
Figura N° 7. Inmunorreactividad de IGF- 1 (A) y de IGF- 1R (B) en el carcinoma tiroideo compacto.	35
Figura N° 8. Tinción citoplasmática de VEGF (A) y FGF- 2 (B) en carcinoma tiroideo compacto.....	36
Figura N° 9. Inmunomarcaje citoplasmático de RAR α (A) y RXR (B) en carcioma tiroideo compacto.....	36
Figura N° 10. Gráfica intensidad de tinción de IGF-1 (A) e IGF -1R (B).....	37
Figura N° 11. Gráfica intensidad de tinción de VEGF (A) y FGF- 2 (B).....	37
Figura N°12. Gráfica intensidad de tinción de RAR α (A) y RXR (B).....	38
Tabla N°1. Estadificación Clínica de los Tumores Tiroideos Caninos.....	25
Tabla N°2. Anticuerpos primarios utilizados para la localización de los antígenos.....	33

1.RESUMEN

Esta tesis tuvo por objetivo determinar mediante la técnica de inmunohistoquímica si la expresión proteica de marcadores como VEGF, FGF-2, IGF-1 y su receptor (IGF-1R) así como los receptores de ácido retinoico (RAR α y RXR) en muestras de tejido tiroideo canino sano y carcinomas tiroideos se asociaban con un patrón histológico diferencial (folicular-compacto vs compacto). Los resultados mostraron que 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.

2.SUMMARY

The objective was to determine if the protein expression of markers like VEGF, FGF-2, IGF-1 and its receptor (IGF-1R) as well as retinoic acid receptors (RAR α and RXR) by immunohistochemistry in samples of healthy canine thyroid tissue and thyroid carcinomas was related to a differential histological pattern (follicular-compact vs compact). The results show that IGF-1, IGF-1R and VEGF expression was greater in fibroblasts and endothelial cells of compact carcinomas than healthy glands. IGF-1R expression in fibroblasts and FGF-2 in endothelial cells of compact carcinoma were greater than follicular-compact carcinoma. The greater expression of factors related to oncogenesis in endothelial cells and fibroblasts found in compact carcinomas supports the relevance of the stromal cells on tumor generation.

3.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). Las principales afecciones tiroideas en los perros son el hipotiroidismo 70.5%, luego carcinoma tiroideo 16.7%, tiroiditis autoinmune 5.6%, hipertiroidismo 4.5% y tiroiditis no autoinmune 2.7% (Castillo, 2006). En esta tesina nos enfocaremos a describir el carcinoma tiroideo, que si bien su incidencia no es muy alta, se ha visto aumentada en los últimos años no solo en el perro sino también en humanos (Castillo 2010, comunicación personal; Harris y Bible, 2011).

De forma similar a lo que ocurre en humanos, el cáncer de tiroides es la neoplasia endocrina maligna más común de los caninos y representa la principal causa de muerte entre los tumores endocrinos. (Barber, 2007).

El 90% de los tumores tiroideos caninos son carcinomas, y el 16-38% de los pacientes (Wucherer y Wilke, 2010) o incluso hasta un 60% (Campos y col., 2012) muestran evidencia de metástasis en el momento del diagnóstico. En los perros, los tumores tiroideos derivan en su mayoría de las células epiteliales foliculares, y los patrones histológicos más frecuentes son folicular, folicular-compacto y compacto (Ramos-Vara y col., 2002; Nadeau y Kitchell, 2011). La mayoría de los tumores tiroideos caninos están bien a moderadamente diferenciados (Klein y col., 1995).

Aunque la cirugía a menudo tiene éxito en las primeras etapas de la enfermedad, se obtienen resultados insatisfactorios en los tumores avanzados. Por lo tanto, una mejor comprensión de los mecanismos moleculares y las redes intracelulares asociadas con la oncogénesis puede contribuir a implementar nuevas opciones terapéuticas para estos últimos (Malaguarnera y col., 2012).

Las alteraciones en la expresión de factores de crecimiento tales como factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF-2), y sus receptores, juegan un papel importante en la progresión del cáncer de tiroides tanto en humanos como en caninos (de Araujo-Filho y col., 2009, Redler y col., 2013, Campos y col., 2014). La activación del sistema IGF se asocia con la patogénesis de una variedad de neoplasias en humanos debido a la acción mitogénica y las propiedades antiapoptóticas que presenta al unirse a su receptor (Vella y col., 2001; Ciampolillo y col., 2007). El IGF-1, un mitógeno potente en muchos tipos celulares, promueve la progresión de la mitosis a través de la inducción de la síntesis de ADN y tiene efectos a largo plazo sobre la proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Jones y Clemmons, 1995). La evidencia experimental sugiere que el IGF-1 desempeña un papel significativo en la transformación, el crecimiento infiltrativo y la metástasis de las células tumorales (LeRoith y Roberts, 2003; Liu y Brown, 2011). Por otra parte, IGF-1 / IGF-1R están sobreexpresados en algunos tipos de carcinomas de tiroides en los seres humanos, y este aumento se correlaciona con mal pronóstico (Liu y col., 2013).

Por otro lado se sabe también que en ausencia de soporte vascular, los tumores se tornan necróticos e incluso mueren por apoptosis (Holmgren y col., 1995). El nuevo

crecimiento de la red vascular es importante debido a que la proliferación, así como la diseminación metastásica de las células cancerosas depende de un suministro adecuado de oxígeno y nutrientes y de la eliminación de los desechos (Nishida y col., 2006). En este sentido Restucci y col. (2003) mostraron que los marcadores tumorales vasculares, como la expresión de VEGF, se incrementan en asociación con un resultado deficiente en algunos tumores compactos caninos. Se sabe que las células de un carcinoma tiroideo pueden secretar potencialmente muchos factores provasculares para promover la angiogénesis. VEGF es esencial para el crecimiento de nuevos vasos en condiciones fisiológicas normales, así como en las células tumorales, y desempeña un papel importante en el desarrollo de metástasis a distancia (Lin y Chao, 2005). En los perros, se vio una mayor expresión de VEGF en las células endoteliales del tejido tiroideo carcinomatoso que en las glándulas tiroideas caninas sanas, lo cual es consistente con el mayor número de vasos sanguíneos y la mayor densidad celular observada en los carcinomas (Campos y col., 2014; Pessina y col., 2014). Se ha visto también que el FGF-2 está implicado en el crecimiento anormal de la tiroides humana, tanto como potencial mitógeno de células foliculares así como estimulando el crecimiento de células endoteliales tiroideas. Los informes sobre los niveles de FGF-2 en el carcinoma tiroideo son contradictorios (Kondo y col., 2007), y su expresión puede depender del grado de diferenciación (Boelaert y col., 2003).

Por otro lado se ha visto que, en la patogenia del cáncer, los llamados factores de diferenciación, cumplen un importante rol, ya que redirigen las células hacia su fenotipo normal y pueden revertir o suprimir la carcinogénesis (Miller, 1998). Un ejemplo de estos son los retinoides, compuestos derivados naturales o sintéticos de la vitamina A que modulan el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (de Mello Souza y col., 2014). En caninos, los retinoides vienen siendo utilizados en el tratamiento de varios tipos de cáncer, tales como linfomas cutáneos, tumores de mastocitos y adenocorticotropinomas (White y col., 1993; Miyajima y col., 2006; Castillo y Gallelli, 2010), y recientemente en el carcinoma tiroideo (Castillo y col., 2016). La acción del ácido retinoico está mediada por dos tipos de receptores, los receptores ácido retinoico (RARs) y los receptores de retinoides X (RXRs) (Kasimanickam y col., 2013). En caninos se ha reportado la expresión de ambos receptores en linfoma cutáneo (de Mello Souza y col., 2010). Sin embargo, su expresión en la glándula tiroides canina sana y/o carcinomatosa no ha sido descrita hasta la fecha.

En base a la evidencia de que existe una conversación (*cross-talk*) entre los distintos tipos celulares que forman un tumor, es esencial comprender como es que las diferentes células contribuyen a la progresión tumoral a través de señales de proliferación y/o facilitando el acceso a nutrientes (Dvorak, 1986; Gribben y col., 2010). De hecho, se ha demostrado que el estroma es capaz de desencadenar tumores y en los últimos años la investigación se ha enfocado en el estudio de la funcionalidad de las células que lo conforman (Bissell y Radisky, 2001)

Además del tipo celular, debe tenerse en cuenta que la expresión de los factores mencionados (VEGF, FGF-2, IGF-1, IGF-1R, RAR α y RXR) implicados en la oncogénesis también dependerá del tipo de tumor. Si bien en general se han establecido patrones específicos que están asociados a malignidad y pronóstico del paciente (Hanhan y Weinberg, 2011), hay muy pobre y aislada información respecto

a la relevancia del tipo de carcinoma tiroideo canino sobre la funcionalidad, recurrencia, sobrevida y la respuesta a la terapia.

Por lo expuesto anteriormente esta tesina de grado tiene como objetivo general contribuir al conocimiento de cuáles son los mecanismos moleculares que pueden estar alterados en el carcinoma tiroideo canino, y la terapéutica del mismo, y de forma específica localizar y semicuantificar la expresión de receptores de ácido retinoico ($RAR\alpha$ y RXR), VEGF, FGF-2, IGF-1, IGF-1R en tejido tiroideo sano y carcinomatoso con diferentes patrones histológicos (compactos y foliculares-compactos) y en los distintos tipos celulares (células foliculares, endoteliales y fibroblastos).

4.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 LA GLÁNDULA TIROIDES

4.1.1 Anatomía

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

La tiroides es una glándula endocrina típica de los vertebrados, impar y simétrica, de origen endodérmico, formada por dos lóbulos definidos, ubicados en sentido lateral y algo en ventral respecto del quinto al octavo anillo traqueal (Scavelli y Peterson, 1992). El istmo que conecta ambos lóbulos es indefinido o inexistente en perros adultos, siendo a veces la excepción razas grandes o braquicéfalas (Belshaw, 1989), a diferencia del humano, donde ambos lóbulos están anatómicamente unidos. (Figura 1). El tamaño es variable, en perros adultos cada lóbulo tiene aproximadamente 5 cm de largo y 1,5 cm de ancho (Scavelli y Peterson, 1992) y el volumen tiroideo oscila entre 0,2 a 1,5 cm³ según el tamaño del animal (Peterson y Ferguson, 1992). Los lóbulos son proporcionalmente más grandes en perros inmaduros y razas braquicéfalas.

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

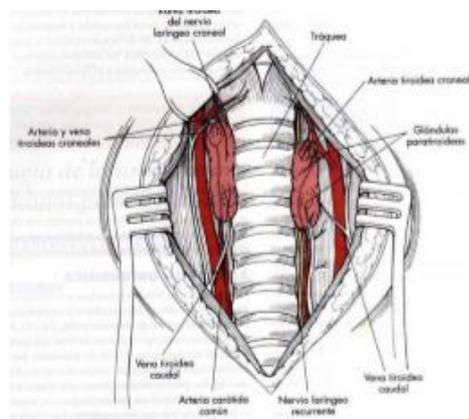


Figura 1. Ubicación de la glándula tiroides.

Extraído de: <https://soyunperro.com/hipotiroidismo-en-perros/> (Fossum, 2004).

El tejido tiroideo ectópico se presenta en muchos perros y gatos, éste puede residir en cualquier punto, desde la base de la lengua hasta la base cardíaca, ya que guarda relación con el desarrollo de la tiroides en la etapa embrionaria (Belshaw, 1989; Peterson y Ferguson, 1992). El tejido ectópico es significativo, por cuanto la tiroidectomía quirúrgica no lo eliminará, lo cual lleva a su hiperplasia y finalmente reaparición del funcionamiento glandular (Belshaw, 1989).

4.1.2 Histología

Desde el punto de vista histológico la glándula está formada por la agrupación de folículos. El folículo es la unidad funcional, donde se produce la síntesis de las hormonas tiroideas T4 (tiroxina) y T3 (3,5,3'-triyodotironina) (Pocock y Richards, 2005). El yodo es un elemento fundamental en la síntesis de estas hormonas, siendo utilizado para la yodación de la proteína específica de la célula epitelial tiroidea, la tiroglobulina (Tg) y así obtener las formas finales de dichas hormonas.

Cada folículo tiene una apariencia más o menos esférica, de 15-150 µm de diámetro, con una cavidad central, ocupada por una sustancia coloide que constituye el reservorio de la Tg. Cada folículo está rodeado por un epitelio cúbico simple, cuya célula se denomina tirocito (Mayayo y col., 2000). Cuando las células están en reposo tienen una apariencia plana, cuando están estimuladas aumentan en altura, tomando una apariencia columnar y disminuye el volumen ocupado por el coloide.

La cara del tirocito en contacto con el coloide o cara apical está constituida por una membrana festoneada de microvellosidades. La cara opuesta o basal está orientada hacia el exterior del folículo y está delimitada por una membrana basal gruesa en contacto con los capilares sanguíneos fenestrados. Las caras celulares laterales están unidas por desmosomas a las caras laterales de otros tirocitos.

Entre los folículos encontramos también otro tipo de células, las parafoliculares o células C, productoras de calcitonina (Figura 2).

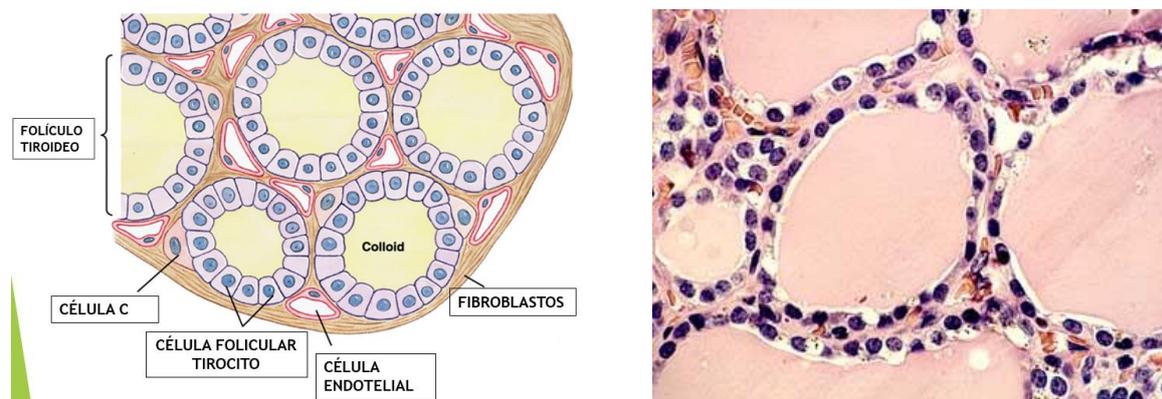


Figura 2. Histología de la glándula tiroides.

Extraído de: <https://www.slideshare.net/Carolingio91/glandula-tiroides-5461392>
<http://slideplayer.es/slide/3385295/>

4.1.3 Embriología

La tiroides es la primera glándula endocrina que aparece en el desarrollo embrionario de los mamíferos (Mansberger y Wei, 1993). El origen de esta glándula es endodérmico y se forma como un apéndice en la cuarta y quinta bolsas faríngeas. El desarrollo de la tiroides empieza por un engrosamiento medio en el suelo de la faringe primitiva que acaba siendo un divertículo que se expande caudalmente. Las células tiroideas están al final del divertículo o conducto tirogloso. Luego la glándula se torna bilobulada, va creciendo y descendiendo, el conducto tirogloso se adelgaza, elonga y degenera. Después de fracturarse el tirogloso, la tiroides alcanza su localización anatómica definitiva.

Las células tiroideas se van diferenciando y comienzan a expresarse los genes que son esenciales para la síntesis de hormonas tiroideas: receptor de TSH (TSH-R), Tg, y tiroperoxidasa (TPO), simporter yodo/sodio (NIS).

4.1.4 Fisiología de la glándula tiroides

La tiroides secreta dos hormonas importantes, la tiroxina y la triyodotironina, conocidas como T4 y T3 respectivamente.

Ambas hormonas inducen un notable aumento del metabolismo en el organismo. La ausencia completa de secreción tiroidea induce un descenso del metabolismo hasta el 40- 50% por debajo de lo normal, mientras que la secreción excesiva incrementa el metabolismo en un 60-100%. La secreción tiroidea está controlada fundamentalmente por la tirotrópina (TSH) secretada por la adenohipófisis (Guyton y Hall, 2001).

4.1.4.1 Síntesis y secreción de hormonas metabólicas tiroideas

Alrededor del 93% de las hormonas con actividad metabólica secretadas por la tiroides corresponden a la tiroxina (T4), mientras que el 7% restante corresponde a la triyodotironina (T3). No obstante, casi toda la T4 se transforma en T3 en los tejidos, por acción de la enzima desyodasa, y en éstos desempeñan funciones similares, que difieren únicamente en la intensidad de la acción. La T3 es 4 veces más potente que la T4, pero su vida media es más corta, por lo que se detecta en menor concentración en sangre (Guyton y Hall, 2001).

4.1.4.2 Biosíntesis de las hormonas tiroideas

En el proceso de biosíntesis de hormonas tiroideas, el yodo es un oligoelemento esencial. La principal fuente de yodo proviene de los alimentos y del agua, constituyendo éste el factor limitante para la síntesis hormonal en condiciones fisiológicas. Los requerimientos diarios de yodo en caninos oscilan entre 100-150 µg/día (Belshaw, 1989; Edney, 1992). El yodo ingerido en la dieta alcanza la circulación en forma de yoduro (I⁻) y se absorbe como tal en el tracto gastrointestinal.

La primera etapa de la formación de las hormonas tiroideas consiste en el transporte de los yoduros desde la sangre hacia las células foliculares. La membrana basal de estas células posee la capacidad de bombear activamente el yoduro al interior celular a través de un transportador Na/I Symporter (NIS), y de un segundo transportador en la membrana apical denominado pendrina (PDS). Este proceso es denominado *atrapamiento de yoduro*. La hormona TSH estimula la actividad de la bomba de yoduro en las células tiroideas.

Dentro del tirocito, el retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi secretan una gran molécula proteica denominada tiroglobulina, con un peso molecular de 660 kDa. Cada molécula de tiroglobulina contiene unas 70 tirosinas que son los principales sustratos que se combinan con el yodo para formar las hormonas tiroideas.

El primer paso crítico de la formación consiste en la conversión de iones yoduro en una forma oxidada de yodo (activa) que posteriormente es capaz de combinarse directamente con el aminoácido tirosina. La oxidación del yodo está catalizada por la enzima peroxidasa y su peróxido de hidrógeno acompañante, que constituyen un sistema eficaz para oxidar los yoduros.

La enzima peroxidasa se encuentra en la región apical del tirocito, así proporciona el yodo oxidado justo en el momento en que la tiroglobulina abandona el aparato de Golgi, atraviesa la membrana celular y se almacena en el coloide (Figura 3).

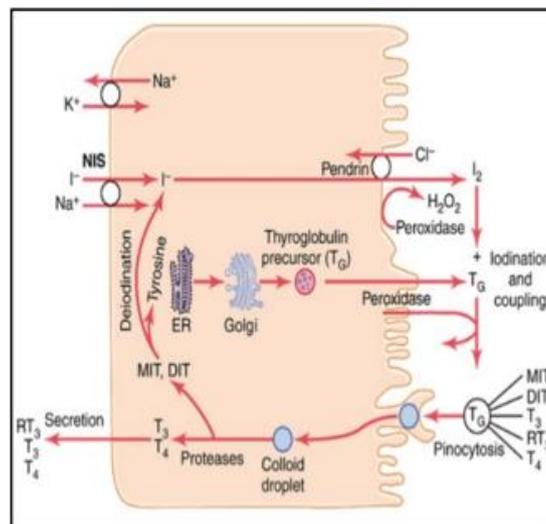


Figura 3. Proceso de incorporación y oxidación de yoduro en la célula folicular tiroidea. Biosíntesis de hormonas tiroideas (Guyton-Hall, 2001).

La unión del yodo con la molécula de tiroglobulina recibe el nombre de *organificación de la tiroglobulina*. El yodo oxidado se une directamente, aunque con lentitud con el aminoácido tirosina. Para acelerar el proceso, el yodo oxidado se une a una enzima llamada yodasa, y se realiza en segundos o minutos.

Por consiguiente, a medida que la tiroglobulina se libera del aparato de Golgi o se secreta al folículo a través de la membrana apical de la célula, el yodo se une con la sexta parte de las tirosinas contenidas en la molécula de tiroglobulina.

A continuación, la yodación de la tirosina ocurre en etapas sucesivas: la tirosina se yoda primero a monoyodotirosina (MIT) y luego a diyodotirosina (DIT).

El principal producto hormonal es la molécula de tiroxina, que aún forma parte de la molécula de tiroglobulina. En otras ocasiones, aunque en la minoría de los casos, una molécula de MIT se une a un DIT formando triyodotirosina.

4.1.4.3 Almacenamiento de la tiroglobulina

La glándula tiroidea es una de las pocas glándulas endocrinas capaces de almacenar grandes cantidades de hormona. Una vez finalizada la síntesis, cada tiroglobulina contiene hasta 30 moléculas de tiroxina y algunas de triyodotirosina. De esta forma, los folículos almacenan en el coloide una cantidad necesaria para cubrir las necesidades del organismo.

4.1.4.4 Liberación de tiroxina y triyodotironina de la glándula tiroidea

Para que este proceso se lleve a cabo, en primer lugar, es necesario la liberación de la tiroxina y triyodotirosina de la molécula de Tiroglobulina, y así estas hormonas serán liberadas hacia la sangre en forma libre.

Cabe recordar que estas moléculas se encuentran en el coloide, rodeadas de células foliculares. Estas últimas emiten proyecciones en su parte apical que rodean porciones del coloide, formando vesículas pinocíticas, que penetran en la célula tiroidea fundiéndose con los lisosomas. El resultado de esto, es la formación de vesículas digestivas. Las enzimas proteinasas presentes en estas vesículas digieren moléculas de tiroglobulina y liberan T3 y T4 en forma libre. Estas difunden a través de la base del tirocito hacia los capilares circundantes, llegando al torrente sanguíneo.

Las tirosinas yodadas también se liberan de las moléculas de tiroglobulina en este proceso. Una enzima desyodasa actúa escindiendo el yodo, el cual es reciclado por las células foliculares para formar nuevas hormonas tiroideas.

4.1.4.5 Funciones fisiológicas de las hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas aumentan la transcripción de un gran número de genes, y como consecuencia se sintetizan en las células blanco diversas enzimas, proteínas estructurales, proteínas transportadoras y otras sustancias. Esto se debe a que sus receptores son nucleares, se encuentran unidos a las hebras de ADN o están cerca de éstas. Al producirse la unión hormona - receptor, se activa la formación de ARN mensajero, el cual es transportado hacia los ribosomas para iniciar la traducción.

Cabe aclarar que si bien la mayoría de la hormona tiroidea secretada por la glándula corresponde a la tiroxina, los receptores intracelulares tienen más afinidad con la triyodotirosina, por lo que la mayoría de la tiroxina dentro de las células blanco pierden un yoduro (Guyton y Hall, 2001).

Otra de las funciones de las hormonas tiroideas es elevar la actividad metabólica celular, actuando en casi todos los tejidos del organismo. Esto ocurre como consecuencia del aumento del número y de la actividad de las mitocondrias, con el consiguiente aumento de la formación de ATP en la respiración celular.

En este mismo sentido, aumentan el transporte de iones a través de la membrana celular, sobre todo de ion K y Na actuando sobre la bomba Na- K ATPasa, enzima que mediante el transporte activo requiere energía, produce calor y acelera el metabolismo.

Las hormonas tiroideas también tienen su acción frente al crecimiento; estimulan el metabolismo de los glúcidos aumentando la captación de glucosa por parte de las células, de los lípidos aumentando la remoción de los depósitos de TAG, incrementando los AG libres, aumentando así la oxidación en las células para formar ATP. A su vez, disminuye la concentración de colesterol, ya que aumenta su excreción biliar, de fosfolípidos y TAG plasmáticos.

Aumenta la necesidad de vitaminas, sobre todo las que actúan como coenzimas de proteínas secretadas en mayor cantidad, aumenta el metabolismo basal y reduce el peso corporal.

Como consecuencia del aumento de energía, el incremento de las hormonas tiroideas ejerce su acción frente a diversos sistemas del organismo. En el sistema cardiovascular aumenta el gasto cardíaco, la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción. También aumenta la frecuencia respiratoria porque aumenta la demanda de oxígeno; aumenta la motilidad digestiva y aumenta además la secreción de otras glándulas endocrinas.

En esencia, ningún tejido u órgano escapa a los efectos del exceso o insuficiencia de hormona tiroidea (Coates, 1997).

4.1.4.6 Regulación de la secreción de hormona tiroidea

La función tiroidea está finamente regulada por la hormona estimulante de la tiroides (TSH), secretada por la hipófisis, que se encuentra a su vez bajo control hipotalámico (eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides) (Figura 4).

La TRH es una amida tripeptídica: *piroglutamil-histidil-prolina-amida*. Actúa directamente sobre las células tirotropas de la adenohipófisis incrementando a través de un sistema de segundos mensajeros la secreción de TSH. Esta hormona es sintetizada en el hipotálamo, en las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular, y es transportada hacia la adenohipófisis por el sistema porta

hipotálamo–hipofisario, donde interactúa con su receptor de membrana. La producción y liberación hipotalámica de TRH está controlada por rutas neurales desde centros cerebrales superiores (Chastain, 1990). La TRH tiene dos acciones principales sobre las células tirotropas, produce la liberación al torrente sanguíneo de la TSH ya sintetizada y almacenada en los gránulos de secreción y a su vez activa la síntesis de TSH.

La TSH o tirotropina, segregada por la hipófisis en las células tirotropas adenohipofisarias, es una glicoproteína con un peso molecular de 28.000 D, compuesta de dos cadenas, α y β que deben estar unidas para que la molécula tenga actividad biológica. La cadena α es idéntica a la de otras trofinas hipofisarias (LH y FSH), en tanto que la cadena β es la que le confiere la especificidad funcional, ya que es quien reconoce el receptor de membrana en el tirocito. Una vez sintetizada, la TSH es almacenada en los gránulos secretorios y liberada a la circulación por acción de la TRH. La vida media sérica de la TSH es relativamente corta, aproximadamente 10 a 15 minutos.

La interacción entre la TSH y su receptor localizado en la membrana basal del tirocito eleva la proteólisis de tiroglobulina que está almacenada en los folículos, incrementa la actividad de la bomba de yoduro, intensifica la yodación de la tirosina, aumenta el tamaño y la actividad secretora de las células tiroideas, y eleva el número de células tiroideas. Es decir, dicha interacción aumenta la síntesis de hormonas tiroideas (T4 y T3) en los folículos, puesto que participa en todos los pasos biosintéticos además de estimular la liberación de T4 y T3 hacia la circulación sistémica.

El efecto precoz más importante del incremento de la TSH consiste en comenzar la proteólisis de tiroglobulina y la consiguiente liberación hacia el torrente sanguíneo de T3 y T4 libres.

El AMPc actúa como mediador del efecto estimulador de la TSH. La acción de la TSH en las células tiroideas se explica a través del mecanismo de acción hormonal mediante segundo mensajero. Este consiste primero en la unión de la TSH con la adenilciclase de la membrana en el dominio citosólico y esto a su vez incrementa la formación de AMPc en la célula. Por último, el AMPc actúa como segundo mensajero en la célula, incrementando la secreción de hormonas tiroideas.

Además, la TSH vía AMPc promueve el crecimiento del tirocito directamente a través de la unión a su receptor e indirectamente estimulando la secreción de factores de crecimiento o de receptores de factores de crecimiento (Guyton y Hall, 2001).

A pesar del papel central del AMPc existe cooperación con otras vías de señalización, necesarias para que los tirocitos desarrollen una actividad mitógena completa en respuesta a TSH (Kimura, 2001; Medina, 2000).

Esta vía de señalización es activada en células tiroideas por varios factores de crecimiento tales como la insulina/IGF-1, el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) o el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Kimura, 2001). El más

importante en el metabolismo tiroideo es el IGF- 1, ya que permite el efecto mitógeno de la TSH y estimula por sí mismo la síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Deleu y col., 1999).

Una vez en sangre, las hormonas tiroideas se combinan en más de un 99% con proteínas plasmáticas sintetizadas por el hígado, como la globulina ligadora de hormona tiroidea, albúmina y prealbúmina ligadora tiroidea con gran afinidad, haciendo que la liberación hacia los tejidos sea lenta. Sólo una pequeña cantidad de la hormona permanece libre; esta fracción es la biológicamente activa y se encuentra disponible para actuar a nivel tisular (Kaptein y col., 1994).

Aproximadamente el 0.1% de la T4 y el 1% de la T3 se encuentran libres en suero (Scavelli y Peterson, 1992; Kaptein y col., 1994). Toda la T4 normalmente es elaborada en la tiroides, mientras que la mayor parte de la T3 se forma mediante la desyodinación extratiroidea de la T4, en los tejidos periféricos (hígado, músculo, riñones) por la acción de la enzima desyodasa tipo I.

4.1.4.7 Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides

Con el fin de mantener una actividad metabólica normal es preciso que en todo momento se secrete una cantidad adecuada de hormona tiroidea. Para lograrlo, existen mecanismos específicos de retroalimentación que actúan a través del hipotálamo y de la adenohipófisis y controlan la secreción tiroidea (Figura 4).

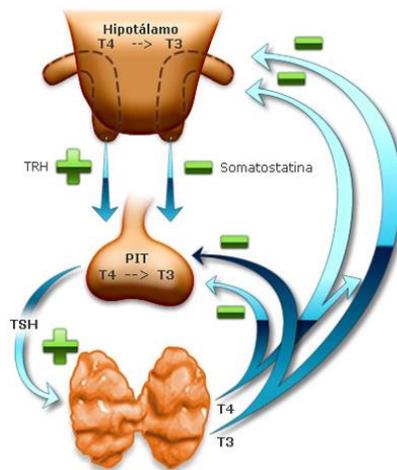


Figura 4. Regulación endócrina del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

Extraído de: http://www.e-sanitas.edu.co/Diplomados/endocrino/modulo_5/fisiologia1.html

Los niveles circulantes de T4 y T3 regulan la secreción tanto de TRH como de TSH a través de una retroalimentación negativa. La molécula efectora de dicha retroalimentación negativa es fundamentalmente la T3. A nivel de la pituitaria, la T3 inhibe la liberación de TSH inducida por TRH y la expresión de los genes de TSH α y β (Dieguéz y Aguilar, 1997). A nivel hipotalámico existen receptores para T3 y esta

hormona inhibe la expresión del gen de TRH así como su síntesis. La T3 reduce aún más la liberación de TSH al disminuir el número de receptores de TRH.

La T4 puede también puede sufrir desactivación a través de otra enzima, desyodasa tipo III, presente en cerebro, placenta y vasos sanguíneos que la convierte en T3 reversa (T3r), inactiva biológicamente. La proporción de conversión de T4 a T3 o T3r depende del estado metabólico del organismo (Larsen y Berry, 1994).

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

4.2 CÁNCER EN CANINOS

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

Vogelstein y Kinzler (2004), definen al cáncer como una enfermedad de origen genético. Si bien el proceso de oncogénesis es complejo y difícil de entender, se ha demostrado que se produce por la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumores y alteraciones en la expresión génica. Todos los genotipos tumorales comparten disfunciones de la fisiología celular que conducen a la malignidad: autosuficiencia en generar sus propios factores de crecimiento, insensibilidad a los factores inhibitorios de crecimiento, resistencia a la apoptosis, capacidad replicativa ilimitada e inmortalización, angiogénesis continua, e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000) (Figura 5).



Figura 5. Las características-Hallmark-del cáncer.

Extraído de: <http://eatthisroot.blogspot.com.uy/2015/05/67-seis-sellos-del-cancer.html>

Con respecto a la epidemiología, se sabe que el cáncer es una de las causas de muerte más comunes en perros geriátricos y la casuística sigue aumentando. Bronson (1982), plantea que un 45% de los perros que vivieron 10 años o más murieron de cáncer.

El género es otro factor a tener en cuenta: el riesgo tumoral en hembras y machos parecería ser similar exceptuando algunos tipos de cáncer como el de mama más prevalente en hembras y el tumor de glándulas perineales más frecuente en machos. Por otro lado, la participación de factores genéticos como la raza podría determinar la aparición de cáncer. Existen razas más susceptibles a desarrollar tumores como la Boxer; así como hay otras que son poco afectadas por éstos como la raza Beagle (Withrow y Vail, 2007). Se deben considerar además otros factores de riesgo que predispondrían a la aparición de tumores, tales como la falta de pigmentación de la piel y mucosas, tamaño y peso corporal (Flores, 1986) y factores de tipo extrínseco medioambientales por ser pesticidas, humo de tabaco, luz solar, ciclofosfamida, radiaciones.

4.3 CARCINOMA TIROIDEO

En caninos, el carcinoma de tiroides es la patología que afecta con mayor frecuencia a la glándula tiroides después del hipotiroidismo (Castillo, 2006). Generalmente se presenta como una masa voluminosa, indolora, afuncional y unilateral, ya que en el perro los lóbulos tiroideos no están unidos anatómicamente como sucede en los seres humanos. Cuando la implicancia es bilateral, el tumor suele ser más invasivo y de peor pronóstico (Mooney y Boyd, 2007).

Estos tumores suelen ser localmente invasivos (tráquea, músculos cervicales, esófago, laringe y vasos sanguíneos) y si bien la mayoría de las veces se originan en la tiroides (región cervical), pueden residir en cualquier parte, desde la base de la lengua hasta la base cardíaca. Los signos clínicos presentes en perros con tumores de tiroides benignos o malignos son similares y están relacionados en su mayoría a la compresión de la masa tumoral sobre los órganos que rodean la tiroides provocando disfagia, disnea, tos, disfonía, pérdida de peso y anorexia (Birchard y col., 1981., Harari y col., 1986).

Las masas neoplásicas que se encuentran en la tiroides derivan de las células foliculares tiroideas, de vestigios del conducto tirogloso ó de las células parafoliculares (células C) (Capen, 2002).

Desde el punto de vista endocrino, en la mayoría de los casos los perros se mantienen eutiroides hasta que se destruye más del 75% del parénquima tiroideo (Mooney y Boyd, 2007). En este mismo sentido, Pessina y col. (2012) estudiaron la expresión de transcritos por Rt-PCR en tejido tiroideo canino (sano vs carcinoma), demostrando que la expresión de TTF-1 y IGF-1 fue mayor en el grupo contralateral sano con respecto a la glándula carcinomatosa, lo que sugiere un mecanismo compensatorio para mantener la condición de eutiroides en los perros con cáncer. Un porcentaje menor de pacientes con carcinoma tiroideo pueden cursar con hipotiroidismo (16 a 30%) y un 10% son hipertiroideos (Castillo y col., 2006; Barber, 2007).

Es frecuente que el único motivo de consulta sea la presencia de una masa en el área anatómica de la tiroides detectada 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).

4.3.1 Etiología

En caninos, en los tumores tiroideos, como en muchas otras condiciones neoplásicas se desconoce la etiología exacta (Bailey y Page, 2009). Si bien el cáncer es una enfermedad de base genética como se mencionó, numerosos estudios sugieren una asociación entre neoplasia tiroidea y 1) deficiencia o exceso de yodo, 2) radiación ionizante, 3) hipersecreción crónica de TSH (Feldman y Nelson, 2007).

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

Los perros han sido utilizados como modelo para investigar la dosis y el tiempo de exposición a la radiaciones capaces de desarrollar neoplasias de tiroides y otros cánceres en humanos (Benjamin, 1997), y Verschueren (1992) demostrándose que la irradiación puede ser causa de neoplasia tiroidea en el perro.

Devilee y col., (1994) identificaron una mutación del p53 (gen supresor, que detiene el ciclo celular en la fase G1, lo que permite la reparación del ADN dañado o la inducción de la apoptosis si el daño es irreparable), en uno de 23 casos de carcinoma de tiroides en caninos.

4.3.2 Antecedentes y Epidemiología

Los tumores de tiroides representan sólo el 1 a 2% de las neoplasias reportadas en perros (Brodey y Kelly, 1968; Birchard y Roesel, 1981; Harari y col., 1986). A pesar de su baja incidencia, tiene gran trascendencia en endocrinología, ya que es la neoplasia maligna más común del sistema endocrino (Barber, 2007).

Si bien el cáncer en general ha disminuido en el mundo, la incidencia de este tumor ha ido en aumento. Datos estadísticos indican que su incidencia ha aumentado en particular en las últimas dos décadas, tanto en humanos como en caninos, con reportes que evidencian que se ha duplicado (Castillo, 2006; Harris y Bible, 2011) o

inclusive quintuplicado en algunos países del mundo (Instituto Nacional de Cáncer, 2004).

Los tumores de tiroides en el perro se presentan en pacientes de mediana a avanzada edad (9 a 10 años) (Brodey, 1968; Leav, 1976; Patnaik y Lieberman, 1991; Turrel y col., 2006). No se ha encontrado una predilección sexual franca en caninos (Harari y col., 1986), a diferencia de lo reportado en humanos en que la mujer tienen una probabilidad mayor (4:1) de desarrollar cáncer de tiroides que el hombre (Henderson y col., 1982; Bukhari y col., 2010). Algunos estudios consideran que ciertas razas caninas (Bóxer, Beagle, y el Golden Retriever) tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de tiroides (Barber, 2007).

En el Uruguay, son escasos los estudios sobre carcinoma tiroideo canino que aborden aspectos epidemiológicos. Elgue y col. (2012), estudiaron la casuística y frecuencia de los diferentes tipos de cáncer en los pacientes atendidos en el período 2005-2010 reportando que el 11-15% del total de los perros atendidos presentaron cáncer y solo un porcentaje menor correspondió al carcinoma tiroideo por lo que se agrupó en “otros cánceres”. Además, se demostró que el sexo y la edad son factores asociados a la presencia del cáncer, siendo las hembras y los perros gerontes seguidos de los de mediana edad los más afectados. A su vez, las razas Rottweiler y Bóxer tendieron a presentar mayor proporción de cáncer que las demás razas. El otro trabajo evaluó específicamente la casuística del carcinoma tiroideo en el período 2005-2014 y concluyó que estos tumores fueron en su mayoría carcinomas de tipo folicular, lo que coincide con la bibliografía internacional. Asimismo, no se encontró predisposición de sexo para este tipo de cáncer, y una de las razas más afectadas fue el Golden Retriever con una edad promedio de 9 años. (Tesis de grado, Daniela Rodríguez VÍctora, 2015).

4.3.3 Tipos Histopatológicos

Más del 90% de los tumores tiroideos detectables en caninos son carcinomas y un porcentaje significativo de estos son grandes, invasores, palpables y clínicamente inquietantes (Lurye y Behrend, 2001). Los tumores tiroideos pueden clasificarse de diferentes maneras, pero utilizando una clasificación sencilla podemos mencionar 3 formas de cáncer según el grado de diferenciación: bien diferenciados, pobremente diferenciados e indiferenciados o anaplásicos (DeLellis, 2004; Kiupel y col., 2008). En caninos, la mayoría de los tumores están bien o moderadamente diferenciados, se originan en el epitelio folicular y por lo general son subclasificados como folicular, folicular-compacto, compacto (sólido) y papilar acorde al patrón histológico (Brodey y Kelly, 1968; Leav y col., 1976; Harari y col., 1986; Mitchell y Tjian, 1989; Klein y col., 1995) (Figura 6).

Los carcinomas diferenciados se caracterizan por conservar las funciones propias de la glándula, como la captación de yodo, la biosíntesis hormonal, la de Tg, TPO y NIS. El pronóstico de estos tumores no es tan severo como el indiferenciado, que es muy agresivo, no concentra el yodo y produce tempranamente metástasis (Pisarev y Juvenal, 2010). El carcinoma papilar, si bien es el cáncer de tiroides más común en los seres humanos (70 a 90% de los casos), se presenta en forma esporádica en

perros (Leav y col., 1976; Worth y col., 2005). Los carcinomas de origen medular, que asientan en las células parafoliculares, estarían menos representados, sin embargo, algunos autores consideran que estarían subdiagnosticados, ya que es difícil diferenciarlos histológicamente del tipo compacto (Carver y col., 1995; Campos y col., 2014).

Además de los mencionados pueden presentarse otros tumores tiroideos de baja incidencia en caninos como los que derivan de vestigios de conducto tirogloso y los de origen no epitelial (linfoma, sarcoma, etc.) (Capen, 2002).

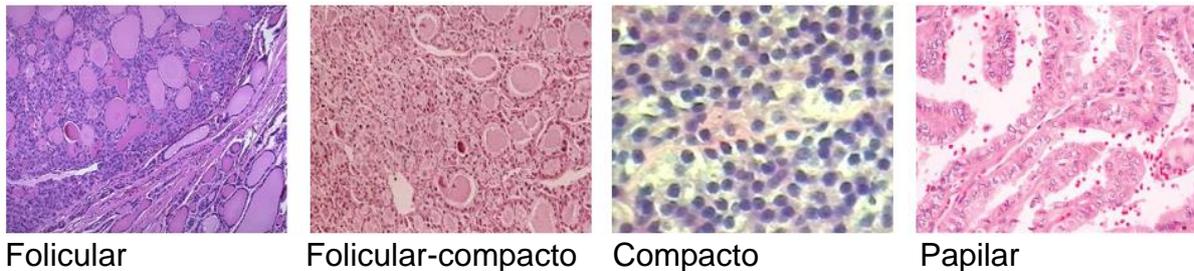


Figura 6. Aspecto microscópico del carcinoma folicular y papilar. Tomado de Aspectos Histológicos del cáncer diferenciado de Tiroides, Cano Valdez, 2009.

4.3.4 Diagnóstico del carcinoma tiroideo

Generalmente es el dueño quien detecta la presencia de una masa cervical en su perro (Worth y col., 2005) y el tiempo que transcurre entre este hallazgo y el diagnóstico es en promedio 1 a 2 meses pudiendo llegar a 1 a 2 años. Estas masas tienden a ser firmes y no dolorosas, pueden estar bien circunscriptas, ser móviles o fijas.

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

El descubrimiento incidental de una masa cervical en el examen físico de rutina es poco común, quizá esto se deba a que la palpación cuidadosa de la glándula no forma parte del examen físico de rutina para muchos veterinarios clínicos (Barber, 2007).

4.3.4.1 Signos clínicos

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

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

Los oncólogos veterinarios utilizan un sistema de estadificación clínica de los tumores, inicialmente desarrollado por la Organización Mundial de la Salud. (Tabla 1).

Tabla 1. Estadificación Clínica de los Tumores (tomada de Withrow, 2009).

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

* RLN= ganglios linfáticos mandibular y cervical superficial.

4.3.4.3 Estatus Hormonal tiroideo

La mayoría de los perros con carcinoma de tiroides no muestran signos de función tiroidea alterada, manifestándose como eutiroideos (70%), al evaluar la función de la glándula tiroides mediante la medición de las hormonas T4 total/libre y TSH. Un porcentaje menor de pacientes puede cursar con hipotiroidismo (16-30%). La hipofunción del lóbulo sano se debe a la liberación por parte del tumor de citoquinas y óxido nítrico que tienen un efecto inhibitor de la función tiroidea (Dumont y col., 1991; Cocks y col., 2000; Kimura y col., 2001). Además, conforme la célula tiroidea se va indiferenciando más, va perdiendo sus características funcionales, siendo la última en perderse la captación de yodo.

Por otro lado, Leav y col. (1976), reportaron en perros con tumores tiroideos un 22% de animales clínicamente hipertiroideos. Esto podría deberse a la activación persistente de la adenilato ciclasa, estando la vía sintética de hormonas exacerbada, pudiendo ser la causa de esto una mutación en el TSH-R o menos frecuentemente en el gen de la proteína Gs α como ha sido reportado en humanos (Palos –Paz y col. 2008).

Por tanto la medición de las hormonas tiroideas no es de gran ayuda para un diagnóstico certero de carcinoma, sí lo es para evaluar el estatus hormonal del paciente y proceder al respecto.

4.3.4.4 Ultrasonografía cervical / Tomografía computarizada / Resonancia magnética

La ultrasonografía es un procedimiento simple, no invasivo, accesible y no más costoso que las radiografías o patología clínica. El uso rutinario de esta herramienta modificará la frecuencia del diagnóstico de este tipo de lesiones en el perro. La tomografía computarizada (CT) y particularmente de la resonancia magnética (MRI) aporta mayor información en cuanto al grado de invasión de la masa tiroidea sobre estructuras vecinas. La escintigrafía con pertecnetato de tecnecio-99m (Tc^{99m}) o menos frecuentemente yodo radioactivo (I^{131}), si se dispone de ella podría ser de utilidad para evaluar la funcionalidad de la glándula, identificar enfermedad local residual después de la cirugía, tumores ectópicos o metástasis.

4.3.4.5 Biopsia y citología

A diferencia de lo que ocurre en humanos (Schlumberger, 1998; Fraker y King, 2001), la precisión de la citología en caninos con masas tiroideas no es buena, sólo la mitad de las veces confirma que la masa es de origen tiroideo y a menudo no es posible reconocer un tumor maligno de forma definitiva (Harari y col., 1986; Feldman y Nelson, 2004). Dado que los tumores tiroideos malignos tienen una densidad vascular mayor que el tejido tiroideo normal y los tumores benignos, la hemodilución es un problema común en estas citologías (Kent y col., 2002).

4.3.5 Tratamiento del carcinoma tiroideo

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). La escisión quirúrgica produce el mejor resultado con la menor morbilidad cuando el tumor se mueve libremente sin invasión de tejidos profundos (Carver y col., 1995; Panciera y col., 2004); pero 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). En perros sin tratar, el tiempo de supervivencia medio es de sólo 3 meses (Worth y col., 2005), pero la cirugía en tumores móviles no metastásicos aumenta el tiempo de supervivencia significativamente (Klein y col., 1995). La recurrencia post-cirugía va a depender además del tipo de tumor, siendo de peor pronóstico los carcinomas anaplásicos, los compactos o foliculares-compactos (Klein y col., 1995; Radinsky, 2007).

Las neoplasias tiroideas no quirúrgicas se pueden manejar con radioterapia, siendo la de tipo externa la utilizada con mayor frecuencia. Si bien hay reportes que sostienen que los tumores tiroideos caninos son relativamente resistentes a la irradiación, algunos estudios han demostrado que la radiación externa ayuda en el control local del tumor en aquellos casos en que la resección quirúrgica no es total (Brearley y col., 1999; Theon y col., 2000; Pack y col., 2001; Barber, 2007). La

terapia con I^{131} postcirugía, tanto en humanos como en caninos, se recomienda para destruir carcinoma microscópico local oculto o metastásico en aquellos casos en que el tumor muestra captación de $99mTc$, de lo contrario la radiación no es efectiva como ocurre en casos de carcinomas pobremente diferenciados o anaplásicos, (Adams y col., 1995; Schlumberger, 1998; Fraker y col., 2001; Panciera y col., 2004; Worth y col., 2005; 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.

Respecto al uso de tirotropina recombinante humana (rhTSH), en humanos se vio que mejora la absorción de yodo radioactivo en pacientes con cáncer de tiroides diferenciado (Pisarev y Juvenal, 2010). En perros, si bien la experiencia es limitada, Campos y col. (2012) no encontraron un claro beneficio con el protocolo que ellos utilizaron. Estos autores mencionan que esto podría deberse no solo 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 en el perro.

El rol de la quimioterapia en el manejo de tumores tiroideos en caninos no está del todo aclarado. Los estudios publicados son pocos y con un bajo número de animales. La quimioterapia se puede considerar en pacientes con carcinomas no quirúrgicos y/o con metástasis macroscópicas. La doxorrubicina ha sido la droga más utilizada, pero su eficacia se aplica a carcinoma tiroideo diferenciado. Hay trabajos que mencionan que el 30-50% de los perros tratados mostraron una respuesta parcial (reducción del volumen mayor al 50%) (Jeglum y Wreat, 1983; Ogilvie y col., 1989). Resultados similares se reportaron con el uso de 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 sobrevida (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 quimioterápicos, 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 medular, no siendo tan específicos para el carcinoma tiroideo folicular (Zatelli y col., 2005;

Campos y col., 2014). En caninos el uso de AINES en el tratamiento de carcinoma tiroideo necesita una mayor investigación.

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 o nulos 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 sobrevida. Un estudio reciente evaluó el efecto de la terapia con Levotiroxina sobre el tiempo de sobrevida en caninos con carcinomas tiroideos luego de diferentes tratamientos, no encontrando un beneficio en la sobrevida de los pacientes (Campos y col., 2014).

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 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). Castillo y col. (2016) evaluaron la recurrencia tumoral y la sobrevida de caninos con carcinoma tiroideos con distinto patrón histopatológico sometidos a diferentes tratamientos: cirugía (control), cirugía + isotretinoína 9-cis (AR9-cis) y cirugía + doxorrubicina. En este estudio se demostró que el tratamiento con AR9-cis post-cirugía aumenta de forma significativa el tiempo de recurrencia y sobrevida al compararlo con los otros dos tratamientos. Además se vió que el tipo histológico de tumor modificó la respuesta al tratamiento, 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 control). 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 que el 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 proteica en diferentes tipos celulares (tirocitos, fibroblastos y células endoteliales) y en diferentes tipos de carcinoma (folicular, folicular-compacto y compacto). 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.

5.OBJETIVOS

5.1 General

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

5.2 Específico

Localizar y semicuantificar la expresión de VEGF, FGF-2, IGF-1 y su receptor así como los receptores de ácido retinoico (RAR α /RXR), en tejido tiroideo sano y carcinomatoso con diferentes patrones histológicos (folicular-compacto y compacto) y distintos tipos celulares (foliculares, fibroblastos y células endoteliales).

6.HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo es que existen alteraciones en la expresión de proteínas vinculadas a la carcinogénesis tiroidea que son dependientes del tipo celular así como también del tipo de tumor presente (grado de diferenciación).

Existen marcadores con valor predictivo respecto al pronóstico del paciente.

Las tiroides caninas sanas y carcinomatosas expresan receptores de ácido retinoico.

7.MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño experimental

Todos los procedimientos del ensayo 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 participación de sus perros en este estudio.

7.2 Muestras de tejido

Las muestras de tejido fueron colectadas en la unidad de Endocrinología de la Facultad de Medicina Veterinaria, de la Universidad de Buenos Aires, Argentina y del Hospital Veterinario de Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.

Se utilizaron dos grupos de muestras: tejido tiroideo normal obtenido a partir de pacientes eutanasiados por razones ajenas a patologías tiroideas como ser politraumatismos severos o agresividad (grupo sano, n=8); y carcinomas tiroideos de origen folicular que fueron obtenidos post-cirugía (grupo carcinoma, n=16). Los carcinomas se dividieron en dos subgrupos acorde al patrón histopatológico predominante: carcinomas foliculares-compactos (n = 8) y carcinomas compactos (n = 8). Las muestras fueron fijadas con formaldehído al 4% en PBS (fosfato buffer salino) y embebidas en parafina para su posterior utilización en la técnica de inmunohistoquímica. Se realizó tinción con hematoxilina/eosina para el estudio histopatológico y los tumores se clasificaron según los criterios descritos por Mesissner y Warren (1969). Los tumores fueron evaluados por un único anatomopatólogo acorde a los criterios establecidos por la World Health Organization (WHO). Además, para una correcta clasificación se determinó tiroglobulina y calcitonina por inmunohistoquímica acorde a lo reportado por Patnaik y Lieberman (1991). Se incluyeron en esta tesis todos los carcinomas de origen folicular es decir, positivos para tiroglobulina y negativos para calcitonina.

7.3 Inmunohistoquímica

La inmunorreactividad para VEGF, FGF-2, IGF-1, IGF-1R, RAR α , RXR, tiroglobulina y calcitonina se visualizó en secciones transversales de 5- μ m tanto en el tejido tiroideo sano como en los carcinomas usando la técnica inmunohistoquímica avidina-biotinaperoxidasa. Las secciones de tejido embebidas en parafina fueron desparafinadas y rehidratadas, y se realizó la recuperación antigénica. Las secciones fueron pretratadas en un horno de microondas a 900 W en tampón de citrato de sodio 0,01 M (pH 6,0) durante 9 minutos, y después se dejó enfriar durante 20 min. Después de lavar en tampón (PBS 0,01 M, pH 7,4), la actividad de peroxidasa endógena no específica se bloqueó por exposición a peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 10 min a temperatura ambiente. Después de otro lavado en tampón (10 min), las secciones se bloquearon en suero normal de caballo o cabra diluido en PBS (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara humidificada.

Las secciones de tejido se incubaron con los anticuerpos primarios durante una hora en una cámara de humedad a temperatura ambiente. Después de la unión del

anticuerpo primario, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (IgG de caballo anti-ratón o de cabra anti-conejo), diluido 1:200 en caballo normal (tiroglobulina e IGF-1) o suero de cabra (los anticuerpos restantes). Se utilizó un kit Vectastain ABC (Vector Laboratories) para la detección de todas las proteínas. El sitio de la enzima unida se visualizó mediante la aplicación de 3, 3'-diaminobencidina (DAB) en H₂O₂, un cromógeno que produce un precipitado marrón insoluble cuando se incubaba con la enzima, usando un kit DAB (Vector Laboratories). Los controles negativos para cada proteína se obtuvieron mediante la sustitución del anticuerpo primario con una IgG no inmune homóloga a concentraciones equivalentes, diluido 1:100 en PBS. (Santa Cruz). Se adjunta tabla con los anticuerpos utilizados para cada proteína.

Tabla 2. Información de Anticuerpos primarios utilizados para la localización de los antígenos.

Antígeno	Proveedor	Ac. Primario	Ac. Secundario	Dilución
TG	Santa Cruz Biotechnology	Monoclonal Mouse	Horse anti-mouse IgG	1:75
VEGF	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal Rabbit	Goat anti-rabbit IgG	1:200
FGF-2	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal Rabbit	Goat anti-rabbit IgG	1:200
IGF-1	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal Goat	Horse anti-Goat IgG	1:50
IGF-1R	Abcam	Policlonal Rabbit	Goat anti-rabbit IgG	1:50
RAR α	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal Rabbit	Goat anti-rabbit IgG	1:100
RXR	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal Rabbit	Goat anti-rabbit IgG	1:100
Calcitonina	Dako	Policlonal Rabbit	Goat anti-rabbit IgG	1:1000

7.4 Análisis de imagen

La densidad celular, los vasos sanguíneos y la inmunotinción de proteínas inmunorreactivas en los diferentes tipos celulares se estimaron en quince fotografías a lo largo del slide a 40X tomado de cada corte histológico. La evaluación fue realizada por dos observadores independientes cegados al grupo. Se evaluaron tres tipos de células: foliculares, 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 (Pessina y col., 2014), donde 0 es la ausencia de tinción y 10 es la intensidad de tinción máxima.

La intensidad media de tinción se calculó como $(1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)$, donde n es la proporción de células en cada campo exhibiendo, tinción débil (n_1) moderada (n_2) e intensa (n_3) (Boos y col., 1996). El promedio de las variables mencionadas en las 15 imágenes capturadas de cada sección histológica se utilizó para el análisis estadístico.

7.5 Análisis estadístico

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

La intensidad de tinción promedio se analizó con un modelo estadístico que incluyó el efecto de la condición de los animales (sanos, carcinoma folicular-compacto y carcinoma compacto), tipo celular (foliculares, fibroblastos y células endoteliales) y sus interacciones.

Los datos se presentaron como promedios \pm SEM. El nivel de significación es de $P < 0,05$.

8.RESULTADOS

8.1 Número de vasos sanguíneos y densidad celular

La densidad celular de los carcinomas 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 (células por campo: 288 ± 24 , 221 ± 24 y 142 ± 24 , respectivamente, $P < 0,03$).

Se observó un significativo efecto de grupo en cuanto al número de vasos sanguíneos ($P= 0,007$), los carcinomas foliculares-compactos presentaron y los compactos tendieron a presentar un mayor número de vasos que las glándulas tiroideas sanas ($P= 0,01$ y $P < 0,1$, respectivamente).

8.2 Localización de proteínas

VEGF, FGF-2, IGF-1, IGF-1R, RAR α , RXR presentaron tinción citoplasmática en las células foliculares, endoteliales y fibroblastos (Figuras 7, 8 y 9), pero se observó además tinción nuclear de IGF-1R, RAR α y RXR en algunas muestras de carcinomas, y únicamente en células foliculares. Más específicamente en cinco muestras analizadas de carcinoma (dos compactos y tres foliculares-compactos) presentaron una tinción nuclear positiva para IGF-1R, aunque el porcentaje de células positivas era demasiado bajo para analizarlo estadísticamente.

La tinción nuclear para RAR α (3 carcinomas compactos y 5 foliculares-compactos) y RXR (un carcinoma compacto y un folicular-compacto) también se detectó únicamente en células foliculares

Para todos los ensayos no se observó inmunotinción positiva cuando el anticuerpo primario fue reemplazado por una IgG no específica (control negativo).

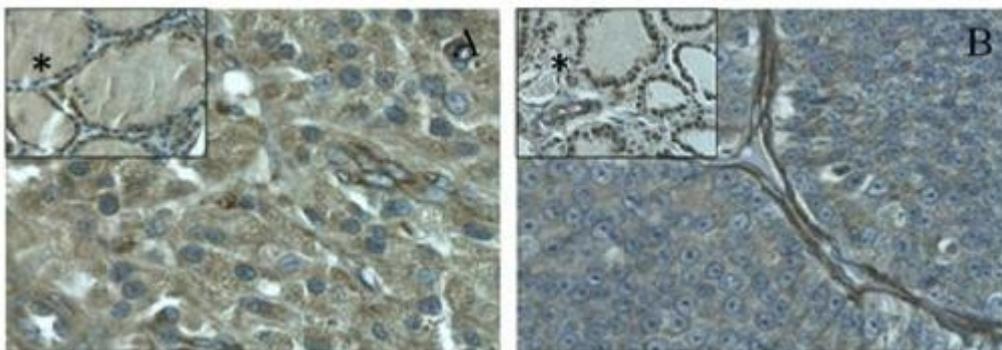


Figura 7. Inmunorreactividad del factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1, A) y el receptor del factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1R, B) en el carcinoma tiroideo compacto. Se muestra el marcaje citoplasmático en células foliculares. El asterisco (*) muestra la expresión en el tejido tiroideo sano. Todas las imágenes fueron capturadas con una ampliación de 400 x.

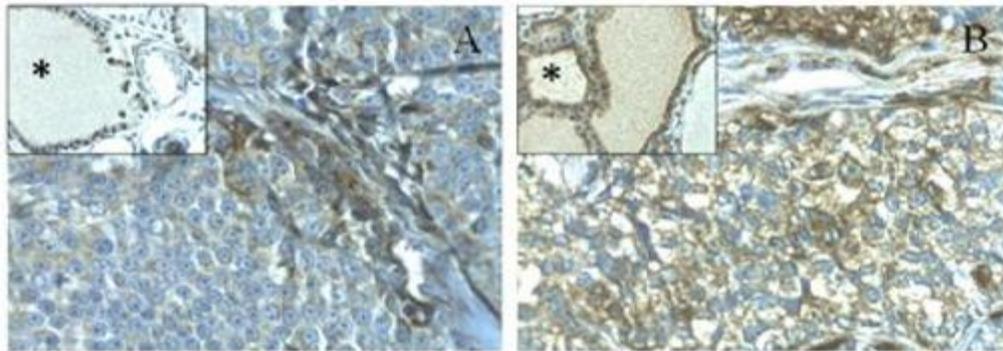


Figura 8. Inmunotinción citoplasmática del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, A) y factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2, B) en carcinoma tiroideo compacto. El asterisco (*) muestra expresión en el tejido tiroideo sano. Todas las imágenes fueron capturadas con un aumento de 400 x.

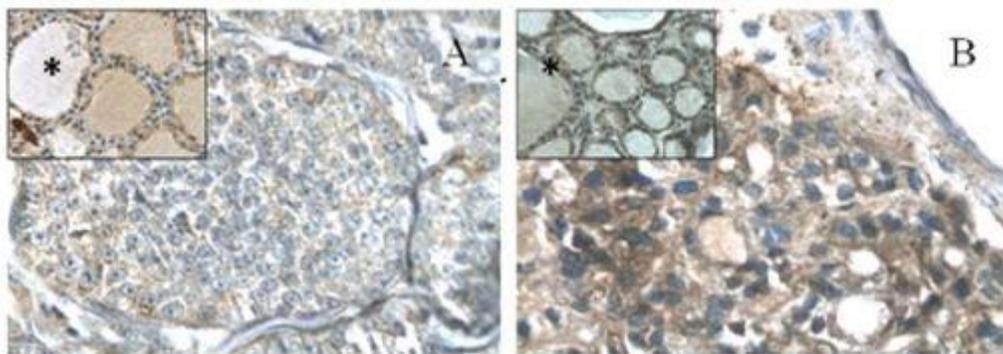


Figura 9. Inmunomarcaje citoplasmático del receptor de ácido retinoico alfa (RAR α , A) y receptor de retinoides X (RXR, B) en carcinoma tiroideo compacto. El asterisco (*) muestra expresión en el tejido tiroideo sano. Todas las imágenes fueron capturadas con una ampliación de 400 x.

La intensidad de tinción de IGF-1 e IGF-1R fueron mayores en carcinomas compactos que en los tejidos tiroideos sanos, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística ($P= 0,09$ y $P= 0,07$, respectivamente). Si se observaron diferencias significativas entre grupos acorde al tipo celular ($P < 0,001$). La expresión de IGF-1 e IGF-1R fue mayor en fibroblastos y células endoteliales de carcinomas compactos que en los tejidos tiroideos sanos ($P < 0,05$), mientras que no se observaron diferencias en las células foliculares. (Figura 10 A y B).

Las células endoteliales de los carcinomas foliculares-compactos presentaron mayor tinción de IGF-1R que la de las glándulas tiroideas sanas ($P < 0,05$). No se encontraron diferencias entre los carcinomas compactos y foliculares-compactos, excepto en los fibroblastos de los carcinomas compactos que presentaron mayor tinción de IGF-1R ($P < 0,05$).

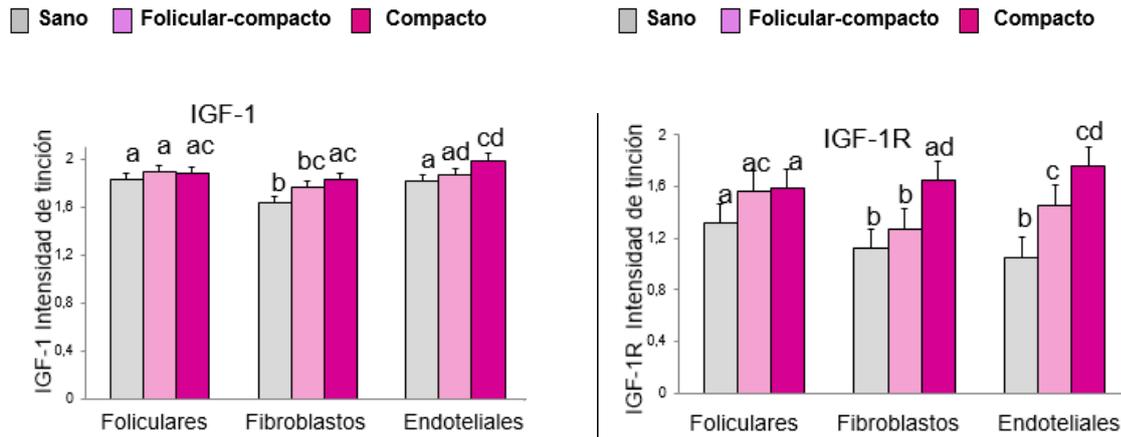


Figura 10. Intensidad de tinción del factor de crecimiento similar a insulina -1 (IGF-1, A) y del receptor del factor de crecimiento similar a insulina -1 (IGF-1R, B). Los datos se expresan como la mínima cuadrada \pm S.E.M. Las letras dentro del mismo gráfico indican diferencias.

En general, la expresión de VEGF fue mayor en los carcinomas que en los tejidos tiroideos sanos ($P < 0,05$); no encontrándose diferencias significativas entre grupos para FGF-2. El tipo celular y la interacción tipo celular / grupo fue significativa para VEGF y FGF-2 ($P < 0,05$). Los fibroblastos y las células endoteliales de los carcinomas compactos mostraron una marcación más fuerte para el VEGF que en los tejidos tiroideos sanos ($P < 0,05$) (Figura 11A). No se detectaron diferencias en la intensidad de marcado de FGF-2 en células foliculares y fibroblastos, mientras que las células endoteliales de carcinomas compactos mostraron mayor inmunomarcaje FGF-2 que los otros dos grupos ($P < 0,05$) (Figura 11B).

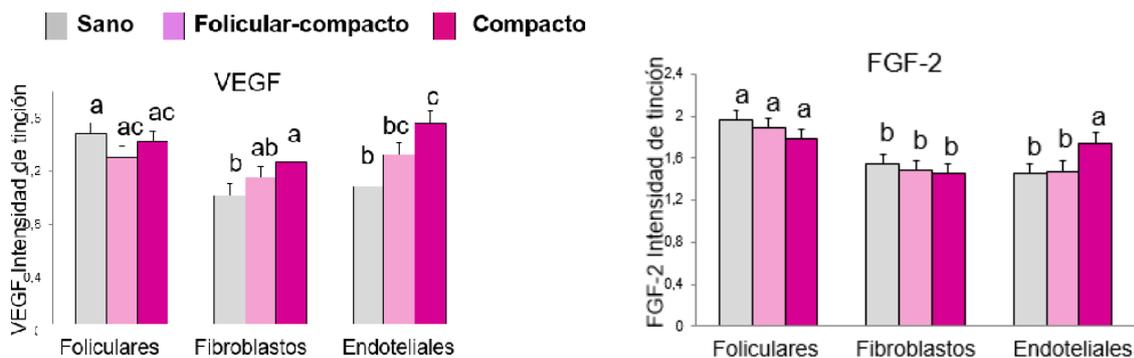


Figura 11. Intensidad de tinción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, A) y factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2, B). Los datos se expresan como la mínima cuadrada \pm S.E.M. Las letras dentro del mismo gráfico indican diferencias, ($P < 0,05$) (cuadrado de las medias más/menos error estándar).

La inmunotinción para RAR α y RXR fue significativa para ambos factores al considerar el tipo celular y la interacción tipo celular / grupo ($P < 0,01$) Las células

endoteliales de los tumores compactos presentaron una mayor marcación de RAR α que los tumores folicular-compacto y las glándulas sanas ($P < 0,01$). Se observó un patrón de expresión de RAR α alterado de acuerdo a los grupos (interacción tipo de tumor y tipo celular) ($P < 0,05$). Mientras que en las glándulas sanas se encontró una mayor tinción en las células foliculares que en los fibroblastos y las endoteliales ($P < 0,05$), no se encontraron diferencias en el carcinoma folicular-compacto respecto al tipo de célula. Se observó un perfil similar de expresión de RXR, con marcado más fuerte en células foliculares que fibroblastos y células endoteliales de glándulas sanas ($P < 0,05$). No se encontraron diferencias en la expresión de RXR entre los tipos celulares en ambos tipos de carcinoma (Figura 12 A y B).

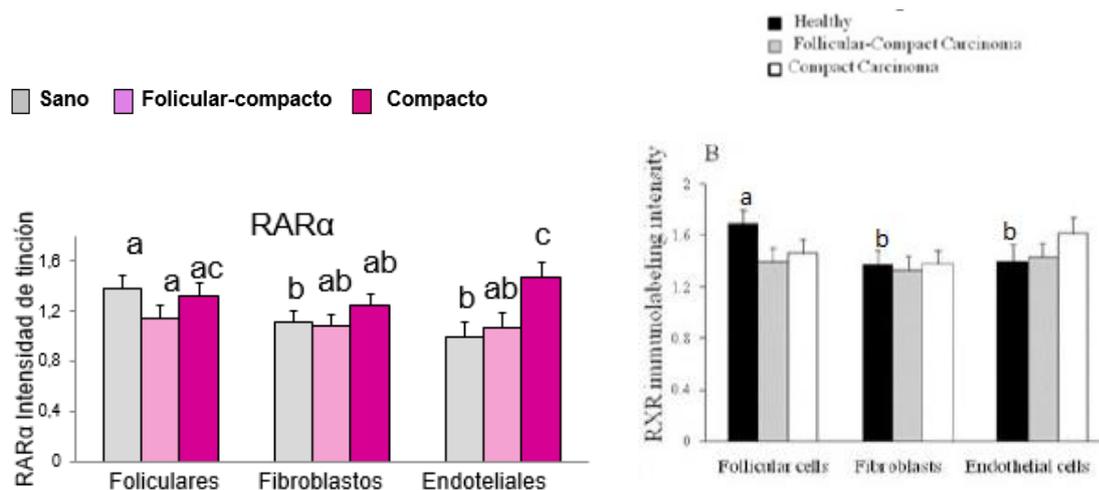


Figura 12. Intensidad de inmunotinción del receptor de ácido retinoico alfa (RAR α , A) y receptor de retinoides X (RXR, B). Los datos se expresan como la mínima cuadrada \pm S.E.M. Las letras dentro del mismo gráfico indican diferencias.

En general, la inmunotinción en los diferentes tipos celulares dependió del estatus del animal. En animales sanos, la expresión de VEGF, FGF-2 e IGF-1R 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.

9.DISCUSIÓN

La mayoría de los tumores tiroideos caninos se originan del epitelio folicular y se clasifican como foliculares, compactos o folicular-compacto (una mezcla de ambos patrones) (Barber, 2007). Como fue reportado previamente (Pessina y col., 2014), la densidad celular y el número de vasos sanguíneos fueron mayores en los carcinomas tiroideos que en las glándulas sanas. La densidad celular se incrementó en los carcinomas compactos en comparación con los carcinomas foliculares compactos, lo cual es consistente con su correspondiente clasificación histológica.

Hasta donde sabemos, este es el primer informe que muestra la detección simultánea de IGF-1 / IGF-1R en glándulas tiroideas sanas y carcinomatosas en perros. La inmunorreactividad citoplasmática de ambos factores se observó en células foliculares, fibroblastos y células endoteliales, como se informó anteriormente para otros cánceres en perros (Buishand y col., 2012; Maniscalco y col., 2014). En los carcinomas, una porción de las células foliculares de la tiroides tenía inmunomarcación nuclear positiva para IGF-1R, lo cual es consistente con los hallazgos de Sarfstein y col. (2012), quien describió la translocación de IGF-1R al núcleo en células de cáncer de mama e identificó un nuevo mecanismo de autorregulación del gen del IGF-1R. En el presente estudio, la intensidad de tinción de IGF-1 y IGF-1R fue mayor en los fibroblastos y las células endoteliales de los carcinoma compacto que en los de los tejidos tiroideos sano, mientras que el carcinoma folicular-compacto tenía intensidad de marcado intermedio.

Estos hallazgos son consistentes con los estudios en seres humanos, como el reporte de Vella y col. (2001), quienes mostraron que el IGF-1 y su receptor están sobreexpresados en el cáncer de tiroides, lo que sugiere que el IGF-1R se activa de forma autocrina / paracrina. El aumento simultáneo de la expresión de IGF-1 e IGF-1R en el estroma (fibroblastos y células endoteliales) apoya la existencia de un *crosstalk* (conversación) entre estos tipos celulares. Esto puede conducir a la activación de señales de proliferación y/o facilitar el acceso de nutrientes, contribuyendo así al crecimiento tumoral (Bissell y Radisky, 2001; Gribben y col., 2010). Estos factores se expresaron a un nivel intermedio en los carcinomas foliculares-compactos, lo cual es consistente con el grado de diferenciación de este tipo de tumor en comparación con el carcinoma compacto. De hecho, se ha demostrado recientemente (Castillo y col., 2016) que los carcinomas foliculares compactos tiroideos tuvieron un mayor tiempo libre de enfermedad que los carcinomas compactos en perros.

En el presente estudio, hemos demostrado que el patrón de expresión de VEGF fue similar a la de IGF-1 / IGF-1R en los diferentes grupos, como lo demuestra la upregulation (regulación en más) de la expresión de VEGF en fibroblastos y células endoteliales de los carcinomas compactos. La mayor expresión de VEGF en las células endoteliales en los carcinomas compactos en comparación con el tejido tiroideo sano concuerda con lo reportado previamente por Pessina y col. (2014). Estos resultados coinciden con los resultados de Campos y col. (2014), que sugieren que el VEGF puede desempeñar un papel importante en la progresión del cáncer de tiroides canino. Nuestros resultados actuales mostraron que la expresión de FGF-2 fue mayor en las células endoteliales de los carcinomas compactos que en las de las glándulas sanas y los tumores foliculares- compactos. Estos datos son consistentes

con el patrón de expresión de VEGF en el mismo tipo de célula y apoyan el hecho de que el VEGF estimula a las células endoteliales a producir FGF-2, lo que favorece aún más el proceso de angiogénesis (Pallares y col., 2006).

En general, los datos sugieren una retroalimentación positiva entre VEGF y FGF-2 que contribuye a la progresión tumoral, a pesar de la mayor eficacia del sistema VEGF para la neovascularización en comparación con FGF-2 como se informó anteriormente (Giavazzi y col., 2003).

En este trabajo, no se encontraron diferencias en la expresión de IGF-1 / IGF-1R, VEGF y FGF-2 en las células foliculares entre los grupos, mientras que la expresión de estos factores en las células del estroma si difirió. La progresión del tumor se promueve por un *crosstalk* entre las células tumorales y el tejido de soporte circundante, ya sea por contacto célula a célula, o mediada por moléculas secretadas (Bouziges y col., 1991). De hecho, el propio estroma puede desencadenar el desarrollo tumoral (Bissell y Radisky, 2001), y una hipótesis sobre la oncogénesis se basa en la funcionalidad de las células estromales, a pesar de que los mecanismos por los cuales el tumor y las células estromales coevolucionan no están del todo claros (Gribben y col., 2010).

La expresión de RAR α y RXR en glándulas tiroideas sanas y carcinomatosas en caninos no había sido reportada previamente. En los seres humanos, se ha descrito la expresión de estos receptores de ácido retinoico en tejido tiroideo sano, en líneas celulares tiroideas y en adenomas y carcinomas tiroideos (Hoftijzer y col., 2009). Sin embargo, la expresión de estos receptores en perros sólo había sido descrita en el linfoma, el melanoma y el osteosarcoma (Miyajima y col., 2006, y de Mello Souza y col., 2010, 2014). En el presente estudio, no se encontraron diferencias en la expresión de RAR α en las células tumorales, pero las células endoteliales de los tumores compactos presentaron mayor expresión de RAR α que los otros grupos (folicular-compactos y sanos). La expresión de RAR α en células foliculares no difirió entre los carcinomas y las glándulas tiroideas sanas. El papel de este receptor en la progresión del carcinoma tiroideo aún no está claro y se necesitan más estudios para ayudar a entender dicho mecanismo.

Estos hallazgos van en el mismo sentido con lo reportado recientemente por Castillo y col. (2016), quienes sostienen que el tipo de tumor modifica la respuesta a los tratamientos. Mientras que en los carcinomas foliculares no se encuentran diferencias entre tratamientos, los perros con carcinomas foliculares-compactos y compactos tratados con isotretinoína 9-cis (RA9-cis) presentaron un mayor tiempo de recurrencia y sobrevida que los tratados con doxorrubicina post-cirugía o cirugía solamente. Miyajima y col. (2006) demostraron que en las células mastocíticas de los caninos, la expresión de RAR α se correlacionó positivamente con la respuesta al tratamiento con ácido retinoico. Si bien los datos para RXR son preliminares debido a que el presente estudio no evaluó todas las isoformas de RXR, y solo algunas se modifican en el cáncer (Haugen y col., 2004), se observó una alteración en el patrón. En las glándulas tiroideas sanas se encontró un mayor contenido de RXR en las células foliculares respecto a 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. De hecho, Haugen y col. (2004) demostraron que mientras RXR γ se expresaba en diferentes líneas celulares de tumores tiroideos humanos, no se expresaba en tejido

tiroideo normal. Además, ninguna de las isoformas RXR se expresa en linfocitos caninos no tumorales, mientras que RXR γ se expresa en el 78% de las células T tumorales (de Mello Souza y col., 2014).

En conclusión, los factores relacionados con la proliferación y la angiogénesis estudiados en esta tesis, se expresaron a niveles más altos en fibroblastos y/o células endoteliales de carcinomas compactos que en los de las glándulas sanas, con expresión principalmente intermedia en carcinomas foliculares compactos, lo que sugiere un papel importante de las células estromales en la progresión tumoral.

10.CONCLUSIONES

El mayor contenido proteico de factores vinculados con la proliferación y angiogénesis (IGF1, 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 conformando la base de la oncogénesis.

La cantidad de proteína depende del patrón histopatológico, siendo mayor el contenido de factores mitogénicos (IGF-1/IGF-1R) y angiogénicos (VEGF/FGF-2) en las células del estroma en los cánceres compactos.

Estos resultados sostienen el rol de las células del estroma (fibroblastos y células endoteliales) en la progresión del tumor.

Las glándulas tiroides sanas y carcinomatosas (folicular-compacto y compacto) expresan receptores RAR α y RXR.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, W. H.; Walker, M. A.; Daniel, G. B.; Petersen M. G.; Legendre, A. M. (1995) Treatment of differentiated thyroid carcinoma in 7 dogs utilizing 131I. *Vet Rad Ultrasound*; 36(5):417-424.
2. Bailey, D.B.; Page, R. L. (2009) Neoplasias específicas en pequeños animales. En: Withrow, S.J., Vail, D.M. *Oncología clínica de pequeños animales*. 4a ed. Barcelona. Ed. Elsevier, pp. 579-583.
3. Barber, L.G. (2007) Thyroid tumors in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 37: 755-773.
4. Benjamin, S.A.; Saunders, W.J.; Lee, A.C.; Angleton, G.M.; Stephens, L.C.; Mallinckrodt, C.H. (1997) Non-neoplastic and neoplastic thyroid disease in beagles irradiated during prenatal and postnatal development. *Radiat Res*; 147: 422-430.
5. Belshaw, B.F. (1989) Enfermedades tiroideas. En: Ettinger, S. *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*. 2a ed. Buenos Aires, Ed. Inter-Médica, pp. 1491-1494.
6. Biondi, B.; Cooper, D.S. (2010) Benefits of thyrotropin suppression versus the risks of adverse effects in differentiated thyroid cancer. *Thyroid*; 20:135-146.
7. Birchard, S.J.; Roesel, O.F. (1981) Neoplasia of the thyroid gland in the dogs. A retrospective study of 16 cases. *J Am Anim Hosp Assoc*; 17: 369-372.
8. Bissell, M.J.; Radisky, D. (2001) Putting tumors in context. *Nat. Rev. Cancer*; 1: 46-54.
9. Boelaert, K.; McCabe, C.J.; Tannahill, L.A.; Gittoes, N.J.; Holder, R.L.; Watkinson, J.C.; Bradwell, A.R.; Sheppard, M.C.; Franklyn, J.A. (2003) Pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor-2 expression: potential prognostic indicators in differentiated thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab*; 88(5): 2341-2347.
10. Boos, A.; Meyer, W.; Schwarz, R.; Grunert, E. (1996) Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci*; 44: 11–21.
11. 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. *Int J Cancer*; 48: 101-108.
12. 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.

13. Brodey, R.S.; Kelly, D.F. (1968) Thyroid neoplasms in the dog. A clinicopathologic study of fifty-seven cases. *Cancer*; 22: 406-416.
14. Bronson, R.T. (1982) Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *Am J Vet Res*; 43: 2057-2059.
15. Buishand, F.O.; van Erp, M.G.; Groenveld, H.A.; Mol, J.A.; Kik, M.; Robben, J.H.; Kooistra, H.S.; Kirpensteijn, J. (2012) Expression of insulin-like growth factor-1 by canine insulinomas and their metastases. *Vet. J*; 191(3): 334-340.
16. 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.
17. 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 (123I) in dogs with thyroid tumors. *PLoS One*; 7: 503-544.
18. Campos, M. (2014) Pathogenesis and Treatment of Canine Thyroid Tumors. Tesis, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, 248p.
19. Campos, M.; Ducatelle, R.; Kooistra, H.S.; Rutteman, G.; Duchateau, L.; Polis, I.; Daminet, S. (2014) Immunohistochemical expression of potential therapeutic targets in canine thyroid carcinoma. *J Vet Intern Med*; 28(2): 564-570.
20. Capen, CC. (2002) Tumors of the endocrine glands. En: Capen, C. *Tumors in Domestic Animals*. 4^a ed. Iowa, Meuten DJ, pp. 638–684.
21. 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.
22. 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.
23. Castillo, V.A.; Lalia, J.C.; Junco, M.; Sartorio, G.; Marquez, A.; Rodriguez, M.S.; Pisarev, M.A. (2001) Changes in thyroid function in puppies fed a high iodine commercial diet. *Vet J*; 161: 80-84.
24. Castillo, V.; Pisarev, M.; Lalia, J.; Rodriguez, MS.; Cabrini, R.; Márquez, A. (2001) Commercial diet induced hypothyroidism due to high iodine. A histological and radiological analysis. *Vet Quart*; 23 (4): 218-223.
25. Castillo, V.; Lalia, J.; Rodriguez, MS.; Pisarev, M. (2003) Morphologic changes in the thyroid glands of puppies fed a high-iodine commercial diet. *J Appl Res Vet Med*; 1 (1): 45-50.

26. Castillo, V. (2006) Epidemiología Endócrina. En: Gómez N.; Feijoo, S. Clínica Médica de Pequeños Animales I. Buenos Aires, Aniwa, pp.121-122.
27. Castillo, V.A.; Gallelli, M.F. (2010) Corticotroph adenoma in the dog: pathogenesis and new therapeutic possibilities. *Res Vet Sci*; 88(1): 2632.
28. Castillo, V.; Pessina, P.; Hall, P.; Blatter, M.F.; Miceli, D.; Arias, E.S.; Vidal, P. (2016) Postsurgical treatment of thyroid carcinoma in dogs with retinoic acid 9 cis improves patient outcome. *Open Vet. J*; 6 (1): 6-14.
29. Chastain, C.B. (1990) Canine pseudohypothyroidism and covert hypothyroidism. *Probl Vet Med*; 2: 693-716.
30. Ciampolillo, A.; De Tullio, C.; Perlino, E.; Maiorano, E. (2007) The IGF-I axis in thyroid carcinoma. *Curr. Pharm. Des*; 13(7): 729-735.
31. Cian D.; Demarchi R.; Gay C.; Pérez M. (2004) Patología tiroidea. Casuística de patología benigna y maligna. *Rev Posgr Vla Cát Med*; 135:17-20. Disponible en: http://med.unne.edu.ar/revista/revista135/pat_tiroi.pdf Fecha de consulta 6/4/2017.
32. Coates, J. (1997) Hipotiroidismo: manifestaciones neurologicas. *Selec Vet*; 5 (4): 314.
33. Cocks, H.C.; Ramsden, J.D.; Watkinson, J.C.; Eggo, M.C. (2000) Thyroid stimulating hormone increases angiogenic growth factor expression in rat thyrocytes. *Clin Otolaryngol Allied Sci*; 25: 570-576.
34. 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*; 44(1):73-7.
35. de Araujo-Filho, V.J.; Alves, V.A.; de Castro, I.V.; Lourenço, S.V.; Cernea, C.R.; Brandão, L.G.; Ferraz, A.R. (2009) Vascular endothelial growth factor expression in invasive papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*; 19: 1233–1237.
36. 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; 320p.
37. 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.

38. de Mello Souza, C.H.; Valli, V.E.; Selting, K.A.; Kiupel, M.; Kitchell, B.E. (2010) Immunohistochemical detection of retinoid receptors in tumors from 30 dogs diagnosed with cutaneous lymphoma. *J. Vet. Inter. Med*; 24(5): 1112-1117.
39. de Mello Souza, C.H.; Valli, V.E.; Kitchell, B.E. (2014) Detection of retinoid receptors in nonneoplastic canine lymph nodes and in lymphoma. *Can. Vet. J*; 55(1): 1219-1224.
40. Devilee, P.; Van Leeuwen, I.S.; Voesten, A.; Rutteman, G.R.; Vos, J.H.; Cornelisse, C.J. (1994) The canine p53 gene is subject to somatic mutations in thyroid carcinoma. *Anticancer Res*; 14: 2039-2046.
41. Dieguéz C, Aguilar E. (1997) Integración neuroendócrina y regulación hormonal de la secreción adenohipofisaria. En: Pombo, M. *Tratado de Endocrinología pediátrica*. 2ª ed. Madrid, McGraw-Hill / Interamericana, pp25-60.
42. 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. *Mol Cel Endocrinol*; 370 (1-2):113-118.
43. Dumont, J.E.; Maenhaut, C.; Pirson, I.; Baptist, M.; Roger, P.P. (1991) Growth factors controlling the thyroid gland. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*; 5: 727-754.
44. Dvorak, H.F. (1986) Tumors: wound that do not heal. *N Engl J Med*; 315:1650-1659.
45. Edney, A.T. (1992) Companion animals and human health. *Vet Rec*; 130: 285-287.
46. Elgue, V.; Piaggio, J.; Amaral, C.; Pessina, P. (2012) Factores asociados a la presentación del tipo de cáncer en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria de Uruguay. *Veterinaria*; 48:23-28.
47. 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. *J Clin Endocrinol Metab*; 78 (4): 867-871.
48. Eng, P.H.; Cardona, G.R.; Fang, S.L.; Previti, M.; Alex, S.; Carrasco, N.; Chin, W.W.; Braverman, L.E. (1999) Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology*; 140: 3404-3410.
49. Feldman, E.; Nelson, R. (2004) Canine thyroid tumors and hyperthyroidism. En: Feldman, E.; Nelson, R, (ed.) *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3a ed. St. Louis: Saunders, p. 219-249.

50. Feldman, E.; Nelson, R. (2007) Neoplasias tiroideas e Hipertiroidismo en caninos. En: Feldman, E.; Nelson, R. *Endocrinología y Reproducción Canina y Felina*. 3a. ed. Buenos Aires, Ed. Intermedica, pp. 244-278.
51. Ferris, J.; García, J.; Berbel, O. (2001) Dieta y cáncer pediátrico. *Rev. Esp. Pediatr*; 57:7592.
52. Fineman, L.S.; Hamilton T.A.; de Gortari A.; Bonney, P. (1998) Cisplatin chemotherapy for treatment of thyroid carcinoma in 13 cases. *J Am Anim Hosp Assoc*; 34: 109-112.
53. Flores, E. (1986) Epidemiología del cáncer en perro y gato. *Monogr Med Vet*; 8(2): 39-48.
54. Fossum, T.W.; Hedlund, C.H.; Hulsén, D.A. (2004) Cirugía de la tiroides y glándulas paratiroides. En: Fossum, T.W.; Hedlund, C.H.; Hulse, D.A.; Jonhson, A.L.; Seim, H.B.; Willard, M.D.; Gwendolyn, L.C. *Cirugía en pequeños animales*. 2ª ed. Buenos Aires, Ed. Intermédica, pp.552-567.
55. Fraker, P.J.; King, L.E. (2001) A distinct role for apoptosis in the changes in lymphopoiesis and myelopoiesis created by deficiencies in zinc. *FASEB J*; 15:2572-2578.
56. Frascaroli, G.C. (2007) Terapia de Rediferenciación en Cáncer de Tiroides. *Rev Argentina Endocrinol Metab*, 44. Disponible en: <http://www.raem.org.ar/numeros/2007-vol44/suplemento/vol44-sup-003-esp.html>. Fecha de consulta: 25/3/2017.
57. Garcia-Gonzalez, M.; Abdulkader, I.; Boquete, A.V.; Neo, X.M.; Forteza, J.; CameselleTeijeiro, J. (2005) Cyclooxygenase-2 in normal, hyperplastic and neoplastic follicular cells of the human thyroid gland. *Virchows Arch*; 447: 12-17.
58. 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. *Americ J Pathol*; 162:1913-1926.
59. Gottesman, M.M.; Fojo, T.; Bates, S.E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*; 2:48-58.
60. Gribben, J.; Rosenwald, A.; Gascoyne, R.; Lenz, G. (2010) Targeting the microenvironment. *Leuk. Lymphoma*; 51(Suppl 1): 34–40.
61. Guyton, A.; Hall, J. (2001) Hormonas metabólicas tiroideas. En: Guyton, A.; Hall, J. *Tratado de fisiología médica*. 10a ed, Ciudad de México, Mc Graw-Hill/Interamericana, pp 1031-1061.
62. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell Press* 100: 57-70.

63. 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.
64. 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.
65. Haugen, B.R.; Jensen, D.R.; Sharma, V.; Pulawa, L.K.; Hays, W.R.; Krezel, W.; Chambon, P.; Ecke, R.H. (2004) Retinoid X receptor gamma-deficient mice have increased skeletal muscle lipoprotein lipase activity and less weight gain when fed a highfat diet. *Endocrinology*; 145(8): 3679-3685.
66. Haynik, D.M.; Prayson, R.A. (2005) Immunohistochemical expression of cyclooxygenase 2 in follicular carcinomas of the thyroid. *Arch Pathol Lab Med*; 129: 736-741.
67. 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.
68. Hoftijzer, H.C.; Liu, Y.Y.; Morreau, H.; van Wezel, T.; Pereira, A.M.; Corssmit, E.P.; Romijn, J.A.; Smit, J.W. (2009) Retinoic acid receptor and retinoid X receptor subtype expression for the differential diagnosis of thyroid neoplasms. *Eur. J. Endocrinol*; 160(4): 631-638.
69. Holmgren, L.; O'Reilly, M.S.; Folkman, J. (1995) Dormancy of micrometastases: balance proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med*; 1(2): 149-153.
70. 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.
71. Jeglum, K.A.; Wreath, A. (1983) Chemotherapy of canine thyroid carcinoma. *Comp Cont Educ Pract Vet*; 5:96-98.
72. Jones, J.I.; Clemmons, D.R. (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev*; 16(1): 3-34.
73. Joyce, J.A.; Pollard J.W. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*; 9(4): 239-252.
74. Kaptein, E.M.; Hays, M.T.; Ferguson, D.C. (1994) Thyroid hormone metabolism. A comparative evaluation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 24: 431-466.
75. Kasimanickam, V.R.; Kasimanickam, R.K.; Rogers, H.A. (2013) Immunolocalization of retinoic acid receptor-alpha, -beta, and -gamma, in bovine and canine sperm. *Theriogenology*; 79(6): 1010-1018.

76. 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.
77. Kent, M.S.; Griffery, S.M.; Verstraete, F.J.M.; Naydan, D.; Madewell, B.R. (2002) Computer-assisted image analysis of neovascularization in thyroid neoplasms from dogs. *Am J Vet Res*; 63:363–369.
78. Klein, M.K.; Powers, B.S.; 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.
79. Kimura, T.; Van Keymeulen, A.; Golstein, J.; Fusco, A.; Dumont, J.E.; Roger, P.P. (2001) Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev*; 22: 631-656.
80. Kiupel, M.; Capen, C.; Miller, M.; Smedley, R. (2008) Histological classification of the endocrine system of domestic animals. En: Schulman FY. *International histological classification of tumors of domestic animals*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, pp. 25-39.
81. 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.
82. Larsen, P.R.; Berry, M.J. (1994) Type I iodothyronine deiodinase: unexpected complexities in a simple deiodination reaction. *Thyroid*. Fall; 4(3):357-62.
83. 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.
84. LeRoith, D.; Roberts, C.T. (2003) The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett*; 195(2):127-137.
85. Lin, J.D.; Chao, T.C. (2005) Vascular endothelial growth factor in thyroid cancers. *Cancer Biother. Radiopharm*; 20(6):648-661.
86. Liu, J.; Brown, R.E, (2011) Immunohistochemical expressions of fatty acid synthase and phosphorylated c-Met in thyroid carcinomas of follicular origin. *International J Clin Exp Pathol*; 4(8):755-764.
87. 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.
88. Lurye, J.C.; Behrend, E.N. (2001) Endocrine tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 31:1083-1110.
 89. Maniscalco, L.; Iussich, S.; Morello, E.; Martano, M.; Gattino, F.; Miretti, S.; Biolatti, B.; Accornero, P.; Martignani, E.; Sánchez-Céspedes, R.; Buracco, P.; De Maria, R. (2014) Increased expression of insulin-like growth factor-1 receptor is correlated with worse survival in canine appendicular osteosarcoma. *Vet. J*; 205(2):272-280.
 90. Mansberger, A.R.; Jr.; Wei, J.P. (1993) Surgical embryology and anatomy of the thyroid and parathyroid glands. *Surg Clin North Am*; 73:727-746.
 91. Mayayo, E.; Santisteban, P.; Vincens-Calvet, E.; (2000) Patología Tiroidea fetal y noenatal. En: Argente Olivers, J.; Carrascosa Lezcano, A.; García Bouthelier, R.; Rodríguez Hierro, F.; Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia. 2a ed. Barcelona, Ed. Doyma, pp.647-700.
 92. Medina, D.L.; Santisteban, P. (2000) Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems. *Eur J Endocrinol*; 143:161-178.
 93. Meissner, W.A.; Warren, S. (1969) Tumors of the thyroid gland. Atlas of Tumor Pathology, Second series. Fascicle 4. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology. Disponible en: [https://books.google.com.uy/books?id=wyF664URAbcC&pg=PA261&lpg=PA261&dq=Meissner,+W.A.;+Warren,+S.++\(1969\)+Tumors+of+the+thyroid+gland.+Atlas+of+Tumor+Pathology,+Second+series.+Fascicle+4.+Washington+DC,+Armed+Forces+Institute+of+Pathology.&source=bl&ots=smJxWd3sqb&sig=h_ooeFCGrOZo3hHhCZjl_dYb2c0&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiE5NXh75DTAhWJkZAKHZLtBekQ6AEIGjAA#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.uy/books?id=wyF664URAbcC&pg=PA261&lpg=PA261&dq=Meissner,+W.A.;+Warren,+S.++(1969)+Tumors+of+the+thyroid+gland.+Atlas+of+Tumor+Pathology,+Second+series.+Fascicle+4.+Washington+DC,+Armed+Forces+Institute+of+Pathology.&source=bl&ots=smJxWd3sqb&sig=h_ooeFCGrOZo3hHhCZjl_dYb2c0&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiE5NXh75DTAhWJkZAKHZLtBekQ6AEIGjAA#v=onepage&q&f=false). Fecha de consulta 12/12/2016.
 94. Miller, W.H.Jr. (1998) The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer*; 83(8):1471-1482.
 95. Mitchell, P.J.; Tjian, R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*; 245:371-378.
 96. Miyajima, N.; Watanabe, M.; Ohashi, E.; Mochizuki, M.; Nishimura, R.; Ogawa, H.; Sugano, S.; Sasaki, N. (2006) Relationship between retinoic acid receptor a gene expression and growth-inhibitory effect of all-trans retinoic acid on canine tumor cells. *J. Vet. Intern. Med*; 20(2):348-354.
 97. Mooney, C.T. (1998) Canine thyroid tumors and hyperthyroidism. En Torrence, A.G., Mooney, C.T. (eds.): *BSAVA Manual of small animal endocrinology*, 2a ed. Gloucester, British small animal veterinary association, 255p.

98. Mooney, C.T.; Boyd, R.J., (2007) Trastornos Tiroideos poco frecuentes. En: Mooney C.T.; Peterson, M.E. Manual de Endocrinología en pequeños animales. 3a ed. Barcelona, Ediciones S, pp. 279-288.
99. Mooney, C.T.; Jones B.R. (2012) Trastornos tiroideos poco frecuentes. En: Mooney C.T.; Peterson, M.E. Manual de endocrinología en pequeños animales, 3a ed., BSAVA, pp. 279-288.
100. 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. *Biochem Pharmacol*; 77:979– 992.
101. Nadeau, M.; 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 Vet J*; 52:994–998.
102. Nishida, N.; Yano, H.; Nishida, T.; Kamura, T.; Kojiro, M. (2006) Angiogenesis in Cancer. *Vasc. Health Risk Manag*; 2(3):213-219.
103. 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.
104. 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.
105. Pallares, J.; Rojo, F.; Iriarte, J.; Morote, J.; Armadans, L.I.; de Torres, I. (2006) Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *Histol. Histopathol*; 21(8):857-865.
106. Palos-Paz, F.; Perez-Guerra, O.; Cameselle-Teijeiro, J.; Rueda-Chimeno, C.; BarreiroMorandeira, F.; Lado-Abeal, J.; Araujo Vilar, D.; Argueso, R.; Barca, O.; Botana, M.; Cabezas-Agricola, J.M.; Catalina, P.; Dominguez Gerpe, L.; Fernandez, T.; Mato, A.; Nuno, A.; Penin, M.; Victoria, B. (2008) Prevalence of mutations in TSHR, GNAS, PRKAR1A and RAS genes in a large series of toxic thyroid adenomas from Galicia, an iodine-deficient area in NW Spain. *Eur J Endocrinol*; 159:623-631.
107. Panciera, D.L.; Lanz, O.I.; Vail, D.M. (2004) Treating thyroid and parathyroid neoplasia in dogs and cats. *Vet Med*; 99:154-168.
108. Patnaik, A.K.; Lieberman, P.H. (1991) Gross, histologic, cytochemical, and immunocytochemical study of medullary thyroid carcinoma in sixteen dogs. *Vet Pathol*; 28:223-233.

109. Pessina Serdio, A.P. (2011) Carcinoma tiroideo en perros: aspectos moleculares. Tesis Facultad de Veterinaria, UDeLaR, Uruguay, 76p.
110. Pessina, P.; Castillo, V.; Araújo, M.; Carriquiry, M.; Meikle, A.; (2012) Expression of thyroidspecific transcription factors in thyroid carcinoma, contralateral thyroid lobe and healthy thyroid gland in dogs. *Res Vet Sci* 93(1):108-3.
111. Pessina, P.; Castillo, V.; Sartore, I.; Borrego, J.; Meikle, A. (2014) Semiquantitative immunohistochemical marker staining and localization in canine thyroid carcinoma and normal thyroid gland. *Vet. Comp. Oncol*; 14(3): e102-e112.
112. Peterson, M.; Ferguson, D. (1992) Tiropatías. En: Ettinger, S (ed): *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*. 3a ed. Buenos Aires, Inter-vet, pp.1716-1725.
113. Pisarev, M. A.; Juvenal, G.; (2010) Cáncer de Tiroides: Aspectos Moleculares y Nuevas Terapias. *Separata Montpellier* 18 (3): 1-36.
114. Pocock, G.; Richards, C.D. (2005) Regulación hormonal del organismo. En: *Fisiología Humana: La base de la Medicina*. Barcelona, Ed. Elsevier, pp. 229-230.
115. Radlinsky, M.G. (2007) Thyroid surgery in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 37:789-798.
116. 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.
117. Redler, A.; Di Rocco, G.; Giannotti, D.; Frezzotti, F.; Bernieri, M.G.; Ceccarelli, S.; D'Amici, S.; Vescarelli, E.; Mitterhofer, A.P.; Angeloni, A.; Marchese, C. (2013) Fibroblast growth factor receptor-2 expression in thyroid tumor progression: potential diagnostic application. *PLoS One*. 8(8), e72224. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23977259>. Fecha de consulta: 5/1/2017.
118. Restucci, B.; Maiolino, P.; Paciello, O.; Martano, M.; De Vico, G.; Papparella, S. (2003) Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. *J. Comp. Pathol*; 128(4):252-259.
119. Rodríguez VÍctora, D. (2015) Carcinoma tiroideo en caninos: casuística en el hospital de pequeños animales (2005-2014) Tesis Facultad de Veterinaria, UdelaR, 46p.
120. Sarfstein, R.; Pasmanik-Chor, M.; Yeheskel, A.; Edry, L.; Shomron, N.; Warman, N.; Wertheimer, E.; Maor, S.; Shochat, L.; Werner, H. (2012) Insulinlike growth

factor-I receptor (IGF-IR) translocates to nucleus and autoregulates IGF-IR gene expression in breast cancer cells. *J. Biol. Chem*; 287(4):2766-2776.

121. Scavelli, T.D.; Peterson, M.E. (1992) The thyroid. En: Slatter D (ed): *Textbook of Small Animal Surgery*, 2a ed. Philadelphia, WB Saunders, 1514 p.
122. Schereiderman, M.A.; Levin, D.L. (1980) Needs, problems and prospects in cancer epidemiology. *Cancer Epidemiology in the USA and USSR*. Us dep. Of Health and Human Services Natr. Canc. Inst. Bethesda. Maryland.
123. 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. *Clin Oncol*; 16:569–574.
124. Schlumberger, M.J. (1998) Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med*; 338:297-306.
125. 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. *Eur J Nucl Med*; 29:775–782.
126. Sipos, J.A.; Mazzaferi, E.L. (2008) Differentiated thyroid carcinoma. En: Cooper DS, (ed). *Medical Management of Thyroid Disease*, 2a ed. New York, Informa Healthcare, pp.237-295.
127. 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.
128. 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.
129. 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. *Mol Cell Endocrinol*; 325:110–117.
130. 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.
131. Turrel, J.M.; McEntee, M.C.; Burke, B.P.; Page, R.L. (2006) Sodium iodide I131 treatment of dogs with nonresectable thyroid tumors: 39 cases (1990-2003). *J Am Vet Med Assoc*; 229:542-548.

132. Vella, V.; Sciacca, L.; Pandini, G.; Mineo, R.; Squatrito, S.; Vigneri, R.; Belfiore, A. (2001) The IGF system in thyroid cancer: new concepts. *Mol Pathol*; 54:121-124.
133. Verschueren, C. (1992) Thyroid cancer research in the dog: anno 1992. *Tijdschr Diergeneeskd* 117 (Suppl 1): 26S-27S.
134. 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.
135. Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*; 10:789-799.
136. White, S.D.; Rosychuk, R.A.; Scott, K.V.; Trettien, A.L.; Jonas, L.; Denerolle, P. (1993) Use of isotretinoin and etretinate for the treatment of benign cutaneous neoplasia and cutaneous lymphoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc*; 202(3):387-391.
137. Withrow, S.J., Vail, D.M. (2007) *Oncología clínica de pequeños animales*. 4a ed. Barcelona. Elsevier, p.814.
138. Worth, A.T.; Zuber, R.M.; Hockin, M. (2005) Radioiodide (¹³¹I) therapy for the treatment of canine thyroid carcinoma. *Aust Vet J*; 83:208–214.
139. Wucherer, K.L.; Wilke V. (2010) Thyroid cancer in dogs: an update based on 638 cases (1995-2005). *J Am Anim Hosp Assoc*; 46(4):249-254.
140. 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 (10): 5754-5760.

12.ANEXO

Open Veterinary Journal, (2016), Vol. 6(3): 247-254

ISSN: 2226-4485 (Print) Original Article

ISSN: 2218-6050 (Online) DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ovj.v6i3.15>

Submitted: 19/06/2016

Accepted: 13/12/2016

Published: 19/12/2016

Proliferation, angiogenesis and differentiation related markers in compact and follicular-compact thyroid carcinomas in dogs

P. Pessina^{1,*}, V.A. Castillo², D. César³, I. Sartore¹ and A. Meikle¹

¹Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplaces 1550, Montevideo, Uruguay

²Cat. Clin. Méd. Peq. An. and U. Endocrinología, Escuela Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias,

Universidad de Buenos Aires. Av. Chorroarín 280, C. Autónoma de Buenos Aires, Argentina

³Instituto Plan Agropecuario, Br. Artigas 3802, Montevideo, Uruguay

Abstract

Immunohistochemical markers (IGF-1, IGF-1R, VEGF, FGF-2, RAR α and RXR) were evaluated in healthy canine thyroid glands (n=8) and in follicular-compact (n=8) and compact thyroid carcinomas (n=8). IGF-1, IGF-1R and VEGF expression was higher in fibroblasts and endothelial cells of compact carcinoma than in healthy glands ($P < 0.05$). Compared to follicular-compact carcinoma, compact carcinoma had higher IGF-1R expression in fibroblasts, and higher FGF-2 expression in endothelial cells ($P < 0.05$). RAR α expression was higher in endothelial cells of compact carcinoma than in those of other groups ($P < 0.05$). The upregulation of these proliferation- and angiogenesis-related factors in endothelial cells and/or fibroblasts and not in follicular cells of compact carcinoma compared to healthy glands supports the relevance of stromal cells in cancer progression.

Keywords: Canine, Histology, Immunohistochemistry, Thyroid carcinoma.

Introduction

Similar to humans, thyroid cancer is the most common endocrine malignancy in dogs and the leading cause of death among endocrine cancers (Barber, 2007). Ninety percent of canine thyroid tumours are carcinomas, and 16–38%, and even up to 60%, of patients show evidence of metastasis at the time of diagnosis (Wucherer and Wilke, 2010; Campos et al., 2012). In dogs, the most frequent thyroid tumour types are derived from follicular epithelial cells, and the most common histological patterns are follicular, follicularcompact and compact (Ramos-Vara et al., 2002; Nadeau and Kitchell, 2011). Most canine thyroid tumours are well to moderately differentiated (Klein et al., 1995). Although surgery is often successful in the early stages of the disease, unsatisfactory results are obtained in advanced tumours. Therefore, a better understanding of the molecular mechanisms and intracellular networks associated with oncogenesis may help discover new therapeutic options for these malignancies (Malaguarnera et al., 2012).

Alterations in the expression of growth factors such as insulin-like growth factor (IGF)-1, vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF)-2, and their receptors, play a role in the progression of thyroid cancer in humans and dogs (de Araujo-Filho et al., 2009; Redler et al., 2013; Campos et al., 2014). The activation of the IGF system is associated with the pathogenesis of a variety of human neoplasias because of the mitogenic and anti-apoptotic properties of its cognate receptor (Vella et al., 2001; Ciampolillo et al., 2007). IGF-1, a potent mitogen in many cell types, promotes the progression of mitosis via the induction of DNA synthesis and has long-term effects on cell proliferation, differentiation and apoptosis (Jones and Clemmons, 1995). Experimental evidence suggests that IGF-1 plays a significant role in the transformation, infiltrative

growth and metastasis of tumour cells (LeRoith and Roberts, 2003; Liu and Brown, 2011). Moreover, IGF-1/IGF-1R are overexpressed in some types of thyroid carcinomas in humans, and it is correlated with poor prognosis (Liu *et al.*, 2013).

In the absence of vascular support, tumours may become necrotic or even apoptotic (Holmgren *et al.*, 1995). New growth in the vascular network is important because the proliferation, as well as metastatic spread, of cancer cells depends on an adequate supply of oxygen and nutrients, and the removal of waste products (Nishida *et al.*, 2006). In addition, tumour angiogenesis is controlled by positive and negative modulators produced by neoplastic, stromal and tumour-infiltrating cells (Carmeliet and Jain, 2000). Studies showed that vascular tumour markers, such as VEGF expression, are increased in association with poor outcome in some canine compact tumours (Restucci *et al.*, 2003). VEGF is essential for the growth of new vessels under normal physiological conditions as well as in tumour cells, and it plays an important role in the development of distant metastases (Lin and Chao, 2005). In dogs, VEGF is expressed at higher levels in endothelial cells of canine thyroid glands with carcinoma than in those of healthy glands, which is consistent with the higher number of blood vessels and cell density (Campos *et al.*, 2014; Pessina *et al.*, 2014). FGF-2 is also implicated in abnormal human thyroid growth, both as a potential follicular cell mitogen and as a stimulator of thyroid endothelial cell growth. Reports on FGF-2 levels in thyroid carcinoma are contradictory (Kondo *et al.*, 2007), and its expression may depend on the degree of differentiation (Boelaert *et al.*, 2003).

Differentiating factors redirect cells toward their normal phenotype and may reverse or suppress carcinogenesis (Miller, 1998). Retinoids are natural or synthetic derivatives of vitamin A that modulate cell growth, differentiation and apoptosis (de Mello Souza *et al.*, 2014). In dogs, retinoids are used to treat various types of cancer such as cutaneous lymphoma, mast cell tumours and corticotroph adenoma of the pituitary (White *et al.*, 1993; Miyajima *et al.*, 2006; Ohashi *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2006; Castillo and Gallelli, 2010), and recently in thyroid carcinoma (Castillo *et al.*, 2016). The action of retinoic acid is mediated by retinoic acid receptors (RARs) and the retinoid X receptors (RXRs) (Kasimanickam *et al.*, 2013). Both receptors are expressed in cutaneous lymphoma in dogs (de Mello Souza *et al.*, 2010); however, their expression in the thyroid gland has not been described to date.

Based on evidence showing that primary tumours are composed of a multitude of stromal cell types in addition to cancerous cells (Tlsty and Coussens, 2006), we investigated different markers (VEGF, FGF-2, IGF-1, IGF-1R, RAR α and RXR) in compact and follicular-compact canine thyroid carcinomas.

Materials and Methods

Experimental design

All experiments were performed in accordance with the regulations of the Animal Experimentation Committees of the Faculty of Veterinary Medicine, Universidad de la República, Uruguay, and the Faculty of Veterinary Sciences, University of Buenos Aires, Argentina. **Tissue samples**

Tissue samples were collected from the Endocrinology Unit, Faculty of Veterinary Medicine, University of Buenos Aires, Argentina, and the Veterinary Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, University of Uruguay. Canine tissue samples were selected as follows: normal thyroid tissues were obtained from dogs that had been euthanised for reasons unrelated to thyroid disease (traumatized or aggressive patients) and had histopathologically normal thyroid glands (healthy group, n = 8); thyroid follicular carcinomas were obtained postsurgically (carcinoma group, n = 16). Tumours were classified according to the World Health Organization (WHO).

Haematoxylin and eosin stained specimens were classified into two categories, namely, follicularcompact carcinoma (n = 8) and compact carcinoma (n = 8), according to the predominant histological pattern and following established criteria for thyroid neoplasms. Classification of thyroid tumours according to thyroglobulin and calcitonin immunohistochemistry was performed as previously described (Patnaik and Lieberman, 1991); all tumours included in this study were positive for the former and negative for the latter. All samples were processed in the Laboratory of Nuclear Techniques, Faculty of Veterinary Medicine, University of Uruguay

Immunohistochemistry

Samples were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) and embedded in paraffin for immunohistochemistry. Immunoreactivity against VEGF, FGF-2, IGF-1, IGF-1R, RAR α , RXR, thyroglobulin and calcitonin was assessed in transverse

5 µm sections of healthy thyroid gland and thyroid carcinoma specimens using the avidin-biotin peroxidase immunohistochemical technique, as previously described (Pessina *et al.*, 2014). Paraffin embedded tissue sections were de-waxed and rehydrated, and antigen retrieval was performed. Sections were pretreated in a microwave oven at 900 W in 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) for 9 min, and then allowed to cool for 20 min. After washing in buffer (0.01 M PBS, pH 7.4), non-specific endogenous peroxidase activity was blocked by exposure to 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 min at room temperature. After another wash in buffer (10 min), sections were blocked in normal horse or goat serum diluted in PBS (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 30 min at room temperature in a humidified chamber. Sections were incubated with the primary antibodies for one hour a humidity chamber at room temperature (Table 1).

Negative control immunolabeling was performed for each receptor by replacing the primary antibody with non-immune IgG (Santa Cruz Biotechnology), diluted 1:100 in PBS. After primary antibody binding, sections were incubated with a biotinylated secondary antibody (horse anti-mouse or goat anti-rabbit IgG; Vector Laboratories), diluted 1:200 in normal horse (thyroglobulin and IGF-1) or goat serum (the remaining antibodies). A Vectastain ABC kit (Vector Laboratories) was used for the detection of all proteins. The site of the bound enzyme was visualised by 3, 3'-diaminobenzidine (DAB), a chromogen that produces a brown insoluble precipitate when incubated with the enzyme, in H₂O₂ using a DAB kit (Vector Laboratories).

Table 1. Primary antibodies used for immunohistochemistry.

Antibody	Antibody Name	Antibody Type	Dilution
Calcitonin	A 0576 ^a	Rabbit polyclonal	1:1000
Thyroglobulin	sc-365997 ^b	Mouse monoclonal	1:75
VEGF	sc-152 ^b	Rabbit polyclonal	1:200
FGF-2	sc-79 ^b	Rabbit polyclonal	1:200
IGF-1	sc-1422 ^b	Goat polyclonal	1:50
IGF-1R	ab 5497 ^c	Rabbit polyclonal	1:50
RARα	sc-551 ^b	Rabbit polyclonal	1:100
RXR	sc-831 ^b	Rabbit polyclonal	1:100

^aDako, Glostrup, Denmark. ^bSanta Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, TX. ^cAbcam, Cambridge, USA.

Sections were counterstained with haematoxylin and dehydrated before mounting with Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany). For each protein, all samples were analysed using same immunohistochemical assay.

Image analysis

Cell density (number of cells/field) and number of blood vessels were counted in 15 images captured from each histological section at 40× magnification. Three cell types, namely, follicular cells, endothelial cells and fibroblasts, were evaluated in the same images. Immunolabeling of the nucleus or cytoplasm was scored as negative (-), faint (+), moderate (++) or intense (+++) by two independent observers who were blinded to the treatment groups (Pessina *et al.*, 2014). The average labeling intensity was calculated as $(1 \times n1) + (2 \times n2) + (3 \times n3)$, where n is the number of cells in each field exhibiting faint (n1), moderate (n2) and intense (n3) labeling (Boos *et al.*, 1996). The average of the abovementioned variables in the 15 images captured from each histological section was used for statistical analysis. **Statistical analysis**

Univariate analyses were performed on all variables to identify outliers and to verify the normality of residuals. Antigen immunolabeling intensity was evaluated by analysis of variance using a mixed model (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, NC). The statistical model used to assess labeling intensity included observer effects, animal group (healthy thyroid gland, follicular-compact carcinoma and compact carcinoma), and cell type (follicular cells, fibroblasts and endothelial cells) and their interactions. Cell density was analysed by PROC MIXED (SAS, V9.0) with the animal group included in the model. Since blood vessels were not detected in the images of most healthy animals (7/8), the number of blood vessels was analysed by PROC GENMOD using a binomial distribution (presence or not of vessels) including the animal group in the model. Data are presented as the least square mean ± pooled S.E.M. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Number of blood vessels and cell density Cell density was higher in compact carcinomas and follicular-compact carcinomas than in healthy glands (cells per field: 288 ± 24 , 221 ± 24 and 142 ± 24 , respectively, $P < 0.03$). Moreover, the number of cells per field tended to be higher in compact carcinomas than in follicular-compact carcinomas ($P = 0.06$). A significant group effect was observed regarding the number of blood vessels ($P = 0.007$), with a greater number of blood vessels observed in thyroid follicularcompact carcinomas than in healthy thyroid tissue ($P = 0.01$), and in compact carcinomas than in the healthy group ($P < 0.1$), although the latter did not reach statistical significance.

Protein localisation

Positive immunolabeling for IGF-1, IGF-1R, VEGF, FGF-2, RAR α and RXR was observed in the cytoplasm in all cell types analysed (Figs. 1, 2 and 3). Five carcinoma samples (two compact and three follicularcompact) had positive labeling for nuclear IGF-1R, although the percentage of positive cells was too low for statistical analysis. Nuclear RAR α and RXR labeling was also detected in follicular cells in eight (three compact and five follicular-compact) and two (one compact and one follicular-compact) carcinoma samples. For all assays, no immunolabeling was observed when the primary antibody was replaced by non-specific IgG.

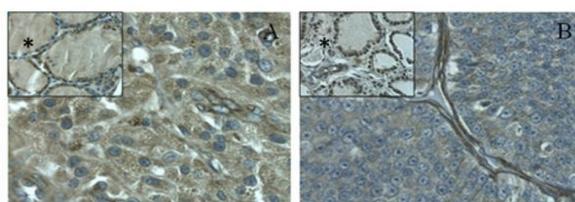


Fig. 1. Immunoreactivity of insulin-like growth factor-1 (IGF-1, A) and insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R, B) in thyroid compact carcinoma. Cytoplasmic labeling in follicular cells is shown. The asterisk (*) shows expression in healthy thyroid tissue. All images were captured at a magnification of 400 \times .

Overall, IGF-1 and IGF-1R labeling intensities were higher in compact carcinoma than in healthy thyroid tissues, although the differences did not reach statistical significance ($P = 0.09$ and $P = 0.07$, respectively). IGF1 and IGF-1R expression was higher in fibroblasts and endothelial cells of compact carcinomas than in those of healthy thyroid tissues ($P < 0.05$), whereas no differences were observed for follicular cells (Fig. 4A and B).

No differences were observed between compact and follicular-compact carcinomas, except in fibroblasts, where compact carcinomas showed higher IGF-1R labeling intensity ($P < 0.05$).

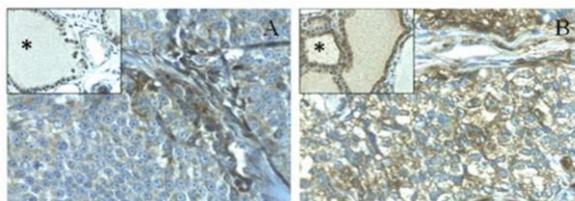


Fig. 2. Vascular endothelial growth factor (VEGF, A) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2, B) cytoplasmic labeling in thyroid compact carcinoma. The asterisk (*) shows expression in healthy thyroid tissues. All images were captured at a magnification of 400 \times .

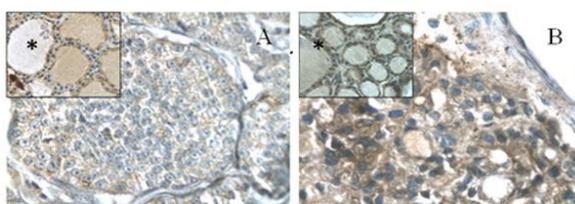


Fig. 3. Cytoplasmic immunolabeling of retinoic acid receptor alpha (RAR α , A) and retinoid X receptor (RXR, B) in thyroid compact carcinoma. All images were captured at a magnification of 400 \times .

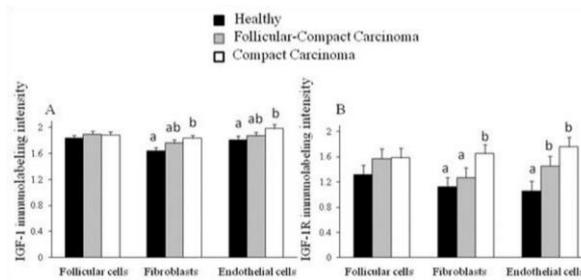


Fig. 4. Immunolabeling intensity of insulin-like growth factor-1 (IGF-1, A) and insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R, B). Data are expressed as the least square mean \pm pooled S.E.M. Different letters within the same cell type indicate differences, $P < 0.05$.

Overall, VEGF expression was higher in compact carcinomas than in healthy thyroid tissues ($P < 0.05$) and follicular-compact carcinomas ($P < 0.1$). Stronger labeling for VEGF was detected in fibroblasts and endothelial cells of compact carcinomas than in those of normal thyroid tissues ($P < 0.05$) (Fig. 5A). No differences in FGF-2 labeling intensity were detected in follicular cells and fibroblasts, whereas endothelial cells of compact carcinomas showed higher FGF-2 immunolabeling than the other two groups ($P < 0.05$) (Fig. 5B).

In endothelial cells, RAR α immunolabeling was higher in compact carcinomas than in the other two groups ($P < 0.01$). An altered pattern of RAR α expression in different cells types according to group was observed; a stronger labeling in follicular cells than fibroblasts and endothelial cells of healthy glands was found ($P < 0.05$), whereas no differences according to cells types in follicular compact carcinoma were observed, and endothelial cells presented greater RAR α labeling than fibroblasts in compact carcinoma ($P < 0.05$) (Fig. 6A). Similar profile of RXR expression was observed, with stronger labeling in follicular cells than fibroblasts and endothelial cells of healthy glands ($P < 0.05$), whereas RXR expression in both types of carcinomas did not differ according to cell type (Fig. 6B).

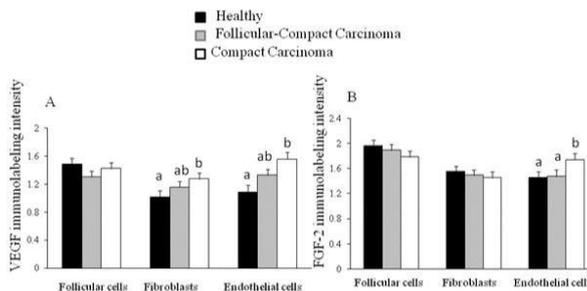


Fig. 5. Immunolabeling intensity of vascular endothelial growth factor (VEGF, A) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2, B). Data are expressed as the least square mean \pm pooled S.E.M. Different letters within the same cell type indicate differences, $P < 0.05$.

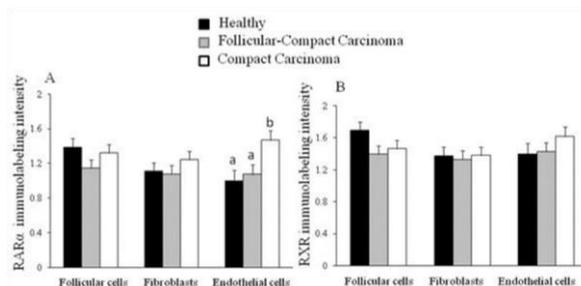


Fig. 6. Immunolabeling intensity of retinoic acid receptor alpha (RAR α , A) and retinoid X receptor (RXR, B). Data are expressed as the least square mean \pm pooled S.E.M. Different letters within the same cell type indicate differences, $P < 0.05$.

Discussion

Most canine thyroid tumours arise from the follicular epithelium and are classified as follicular, compact or a mixture of the two patterns (follicular-compact) (Barber, 2007). As reported previously (Pessina *et al.*, 2014), cell density and the number of blood vessels were higher in thyroid carcinoma tissues than in healthy glands. Cell density was increased in compact carcinomas when compared to follicular-compact carcinomas, which is consistent with their corresponding histological classification.

To the best of our knowledge, this is the first report showing simultaneous detection of immunoreactive IGF-1/IGF-1R in healthy and carcinomatous thyroid glands in dogs. Cytoplasmic immunoreactivity of both factors was observed in follicular cells, fibroblasts and endothelial cells, as reported previously for other cancers in dogs (Buishand *et al.*, 2012; Maniscalco *et al.*, 2014). In carcinomas, a portion of thyroid follicular cells had positive immunolabeling for nuclear IGF-1R, which is consistent with the findings of Sarfstein *et al.* (2012), who described the translocation of IGF-1R to the nucleus in breast cancer cells and identified a novel mechanism of IGF-1R gene autoregulation. In the present study, IGF-1 and IGF-1R labelling intensity was higher in fibroblasts and endothelial cells of compact carcinoma than in those of healthy thyroid tissues, while follicular-compact carcinoma had intermediate labelling intensity. These findings are consistent with human studies, such as the report by Vella *et al.* (2001), who showed that IGF-1 and its receptor are overexpressed in thyroid cancer, suggesting that IGF-1R is activated in an autocrine/paracrine manner. The simultaneous increase of IGF-1 and IGF-1R expression in the stroma (fibroblasts and endothelial cells) supports the existence of crosstalk between these cell types; this can lead to the activation of proliferation signals and/or facilitate nutrient access, thus contributing to tumour growth (Bissell and Radisky, 2001; Gribben *et al.*, 2010). These factors were expressed at an intermediate level in follicular-compact carcinomas, which is consistent with the degree of differentiation of this type of tumour compared with compact carcinoma. Indeed, we have recently shown (Castillo *et al.*, 2016) that thyroid follicular compact carcinomas had a greater time to recurrence than compact carcinomas in dogs. In the present study, we showed that the pattern of expression of VEGF was similar to that of IGF-1/IGF1R in the different groups, as demonstrated by the upregulation of VEGF expression in fibroblasts and endothelial cells of compact carcinoma. The upregulation of VEGF in endothelial cells in compact carcinoma when compared to the healthy thyroid tissue was consistent with the findings of our previous study (Pessina *et al.*, 2014). This is in agreement with Campos *et al.* (2014) that suggested that VEGF may play an important role in the progression of canine thyroid cancer. Our present results showed that FGF-2 expression was higher in endothelial cells of compact carcinoma than in those of healthy glands or follicularcompact glands. These data were consistent with the pattern of VEGF expression in the same cell type, and support the fact that VEGF stimulates endothelial cells to produce FGF-2, which further enhances angiogenesis (Pallares *et al.*, 2006). Overall, data suggest a positive feedback loop between VEGF and FGF-2 that contributes to tumour progression, despite the higher efficacy of the VEGF system for neovascularization compared to FGF-2 as reported previously (Giavazzi *et al.*, 2003). In the present study, no differences in follicular cell expression of IGF1/IGF-1R, VEGF and FGF-2 were found among groups, whereas the expression of these factors in stromal cells differed. Tumour progression is promoted by crosstalk between the tumour and its surrounding supporting tissue either via cell-to-cell contact, or mediated by secreted molecules (Bouziges *et al.*, 1991). Indeed, the stroma itself can trigger tumour development (Bissell and Radisky, 2001), and one hypothesis on oncogenesis is based on stromal cell functionality, despite the fact that the mechanisms by which tumour and stromal cells co-evolve remain unclear (Gribben *et al.*, 2010).

The expression of RAR α and RXR in healthy thyroid glands and thyroid carcinomas in dogs has not been reported previously. In humans, the expression of these retinoic receptors in healthy thyroid tissue, thyroid cell lines, and in thyroid adenomas and carcinomas has been reported (Hoftijzer *et al.*, 2009); however, the expression of these receptors in dogs has only been described in lymphoma, melanoma and osteosarcoma (Miyajima *et al.*, 2006; Ohashi *et al.*, 2006; de Mello

Souza *et al.*, 2010, 2014). In the present study, RAR α expression in follicular cells did not differ in carcinomas and healthy thyroid glands. However, endothelial cells of compact carcinomas showed higher expression of RAR α than those of the other groups (healthy and follicular-compact carcinomas), and further studies are needed to help our understanding of the role of this receptor in carcinoma progression. Retinoic receptor expression in thyroid carcinoma is consistent with our recent study (Castillo *et al.*, 2016) in which isotretinoin 9-cis (RA9-cis) treatment increased time of recurrence and survival time in dogs with follicular-compact and compact thyroid carcinoma when compared to doxorubicin after surgery. Miyajima *et al.* (2006) showed that in canine mast cells, RAR α expression was positively correlated with response to retinoic acid treatment. Because the present study did not test all isoforms of RXR, these data should be considered preliminary. Indeed, Haugen *et al.* (2004) showed that while RXR γ was expressed in different cell lines of thyroid human tumours, it was not expressed in normal thyroid tissue. Moreover, none of the RXR isoforms are expressed in canine nontumoural lymphocytes, whereas RXR γ is expressed in 78% of tumour T cells (de Mello Souza *et al.*, 2014). In conclusion, factors related to proliferation and angiogenesis were expressed at higher levels in fibroblasts and/or endothelial cells of compact carcinomas than in those of healthy glands, with mostly intermediate expression in follicular-compact carcinomas, suggesting a role of stromal cells in tumour progression.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the technical assistance of Lic. Claudia Menezes and Rosina Sánchez for immunohistochemical evaluation of samples. This work was supported in part by Project No. 277 CSICUdelaR (Uruguay).

Conflict of interest

The authors declare that there is not conflict of interest.

References

- Barber, L.G. 2007. Thyroid tumors in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 37(4), 755-773.
- Bissell, M.J. and Radisky, D. 2001. Putting tumors in context. *Nat. Rev. Cancer* 1(1), 46-54.
- Boelaert, K., McCabe, C.J., Tannahill, L.A., Gittoes, N.J., Holder, R.L., Watkinson, J.C., Bradwell, A.R., Sheppard, M.C. and Franklyn, J.A. 2003. Pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor-2 expression: potential prognostic indicators in differentiated thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(5), 2341-2347.
- 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. *Anim. Reprod. Sci.* 44, 11-21.
- Bouziges, F., Simo, P., Simon-Assmann, P., Haffen, K. and Kedinger, M. 1991. Altered deposition of basement membrane molecule in co-culture of colonic cancer cells and fibroblast. *Int. J. Cancer* 48(1), 101-108.
- Buishand, F.O., van Erp, M.G., Groenveld, H.A., Mol, J.A., Kik, M., Robben, J.H., Kooistra, H.S. and Kirpensteijn, J. 2012. Expression of insulin-like growth factor-1 by canine insulinomas and their metastases. *Vet. J.* 191(3), 334-340.
- Campos, M., Peremans, K., Vandermeulen, E., Duchateau, L., Bosmans, T., Polis, I. and Daminet, S. 2012. Effect of Recombinant Human Thyrotropin on the Uptake of Radioactive Iodine (123I) in Dogs with Thyroid Tumors. *PLoS ONE* 7(11): e50344. doi:10.1371/journal.pone.0050344.
- Campos, M., Ducatelle, R., Kooistra, H.S., Rutteman, G., Duchateau, L., Polis, I. and Daminet, S. 2014. Immunohistochemical expression of potential therapeutic targets in canine thyroid carcinoma. *J. Vet. Intern. Med.* 28(2), 564-570.
- Carmeliet, P. and Jain, R.K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
- Castillo, V.A., Giacomini, D., Páez-Pereda, M., Stalla, J., Labeur, M., Theodoropoulou, M., Holsboer, F., Grossman, A.B., Stalla, G.K. and Arzt, E. 2006. Retinoic Acid as a Novel Medical Therapy for Cushing's Disease in Dogs. *Endocrinology* 147(9), 4438-4444.
- Castillo, V.A. and Gallelli, M.F. 2010. Corticotroph adenoma in the dog: pathogenesis and new therapeutic possibilities. *Res. Vet. Sci.* 88(1), 2632.
- Castillo, V., Pessina, P., Hall, P., Blatter, M.F., Miceli, D., Arias, E.S. and Vidal, P. 2016. Postsurgical treatment of thyroid carcinoma in dogs with retinoic acid 9 cis improves patient outcome. *Open Vet. J.* 6(1), 6-14.
- Ciampolillo, A., De Tullio, C., Perlino, E. and Maiorano, E. 2007. The IGF-I axis in thyroid carcinoma. *Curr. Pharm. Des.* 13(7), 729-735.
- de Araujo-Filho, V.J., Alves, V.A., de Castro, I.V., Lourenço, S.V., Cernea, C.R., Brandão, L.G. and Ferraz, A.R. 2009. Vascular endothelial growth factor expression in invasive papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 19(11), 1233-1237.
- de Mello Souza, C.H., Valli, V.E., Selting, K.A., Kiupel, M. and Kitchell, B.E. 2010. Immunohistochemical detection of retinoid receptors in tumors from 30 dogs diagnosed with cutaneous lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 24(5), 1112-1117.
- de Mello Souza, C.H., Valli, V.E. and Kitchell, B.E. 2014. Detection of retinoid receptors in nonneoplastic canine lymph nodes and in lymphoma. *Can. Vet. J.* 55(1), 1219-1224.
- Giavazzi, R., Sennino, B., Coltrini, D., Garofalo, A., Dossi, R., Ronca, R., Tosatti, M.P. and Presta, M. 2003. Distinct role of fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor on tumor growth and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 162(6), 1913-1926.
- Gribben, J., Rosenwald, A., Gascoyne, R. and Lenz, G. 2010. Targeting the microenvironment. *Leuk. Lymphoma* 51 Suppl. 1, 34-40. doi: 10.3109/10428194.2010.500072.
- Haugen, B.R., Jensen, D.R., Sharma, V., Pulawa, L.K., Hays, W.R., Krezel, W., Chambon, P. and Ecker, R.H. 2004. Retinoid X receptor gamma-deficient mice have increased skeletal muscle lipoprotein lipase activity and less weight gain when fed a highfat diet. *Endocrinology* 145(8), 3679-3685.
- Hoftijzer, H.C., Liu, Y.Y., Morreau, H., van Wezel, T., Pereira, A.M., Corssmit, E.P., Romijn, J.A. and Smit, J.W. 2009. Retinoic acid receptor and retinoid X receptor subtype expression for the differential diagnosis of thyroid neoplasms. *Eur. J. Endocrinol.* 160(4), 631-638.

- Holmgren, L., O'Reilly, M.S. and Folkman, J. 1995. Dormancy of micrometastases: balance proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med.* 1(2), 149-153.
- Jones, J.I. and Clemmons, D.R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16(1), 3-34.
- Kasimanickam, V.R., Kasimanickam, R.K. and Rogers, H.A. 2013. Immunolocalization of retinoic acid receptor-alpha, -beta, and -gamma, in bovine and canine sperm. *Theriogenology* 79(6), 10101018.
- Klein, M.K., Powers, B.E., Withrow, S.J., Curtis, C.R., Straw, R.C., Ogilvie, G.K., Dickinson, K.L., Cooper, M.F. and Baier, M. 1995. Treatment of thyroid carcinoma in dogs by surgical resection alone: 20 cases (1981-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 206(7), 1007-1009.
- Kondo, T., Zheng, L., Liu, W., Kurebayashi, J., Asa, S.L. and Ezzat, S. 2007. Epigenetically controlled fibroblast growth factor receptor 2 signaling imposes on the RAS/BRAF/mitogen activated protein kinase pathway to modulate thyroid cancer progression. *Cancer Res.* 67(11), 5461-5470.
- LeRoith, D. and Roberts, C.T. 2003. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 195(2), 127-137.
- Lin, J.D. and Chao, T.C. 2005. Vascular endothelial growth factor in thyroid cancers. *Cancer Biother. Radiopharm.* 20(6), 648-661.
- Liu, J. and Brown, R.E. 2011. Immunohistochemical expressions of fatty acid synthase and phosphorylated c-Met in thyroid carcinomas of follicular origin. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 4(8), 755764.
- Liu, Y.J., Qiang, W., Shi, J., Lv, S.Q., Ji, M.J. and Shi, B.Y. 2013. Expression and significance of IGF-1 and IGF-1R in thyroid nodules. *Endocrine* 44(1), 158-164.
- Malaguarnera, R., Morcavallo, A. and Belfiore, A. 2012. The insulin and igf-I pathway in endocrine glands carcinogenesis. *J. Oncol.* 2012:635614. doi: 10.1155/2012/635614.
- Maniscalco, L., Iussich, S., Morello, E., Martano, M., Gattino, F., Miretti, S., Biolatti, B., Accornero, P., Martignani, E., Sánchez-Céspedes, R., Buracco, P. and De Maria, R. 2014. Increased expression of insulin-like growth factor-1 receptor is correlated with worse survival in canine appendicular osteosarcoma. *Vet. J.* 205(2), 272-280.
- Miller, W.H.Jr. 1998. The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer* 83(8), 1471-1482.
- Miyajima, N., Watanabe, M., Ohashi, E., Mochizuki, M., Nishimura, R., Ogawa, H., Sugano, S. and Sasaki, N. 2006. Relationship between retinoic acid receptor a gene expression and growth-inhibitory effect of all-trans retinoic acid on canine tumor cells. *J. Vet. Intern. Med.* 20(2), 348-354.
- 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. *Can. Vet. J.* 52(9), 994-998.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. and Kojiro, M. 2006. Angiogenesis in Cancer. *Vasc. Health Risk Manag.* 2(3), 213-219. Ohashi, M., Miyajima, N., Nakagawa, T., Takahashi, T., Kagechika, H., Mochizuki, M., Nishimura, R. and Sasaki, N. 2006. Retinoids induce growth inhibition and apoptosis in mast cell tumor cell lines. *J. Vet. Med. Sci.* 68(8), 797-802.
- Pallares, J., Rojo, F., Iriarte, J., Morote, J., Armadans, L.I. and de Torres, I. 2006. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *Histol. Histopathol.* 21(8), 857-865.
- Patnaik, A.K. and Lieberman, P.H. 1991. Gross, histologic, cytochemical, and immunocytochemical study of medullary thyroid carcinoma in sixteen dogs. *Vet. Pathol.* 28(3), 223-233.
- Pessina, P., Castillo, V., Sartore, I., Borrego, J. and Meikle, A. 2014. Semiquantitative immunohistochemical marker staining and localization in canine thyroid carcinoma and normal thyroid gland. *Vet. Comp. Oncol.* 14(3), e102-12. doi: 10.1111/vco.12111.
- Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., Johnson, G.C. and 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(4), 480-487.
- Redler, A., Di Rocco, G., Giannotti, D., Frezzotti, F., Bernieri, M.G., Ceccarelli, S., D'Amici, S., Vescarelli, E., Mitterhofer, A.P., Angeloni, A. and Marchese, C. 2013. Fibroblast growth factor receptor-2 expression in thyroid tumor progression: potential diagnostic application. *PLoS One.* 8(8), e72224. doi: 10.1371/journal.pone.0072224.
- Restucci, B., Maiolino, P., Paciello, O., Martano, M., De Vico, G. and Papparella, S. 2003. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. *J. Comp. Pathol.* 128(4), 252-259.
- Sarfstein, R., Pasmanik-Chor, M., Yeheskel, A., Edry, L., Shomron, N., Warman, N., Wertheimer, E., Maor, S., Shochat, L. and Werner, H. 2012. Insulinlike growth factor-I receptor (IGF-IR) translocates to nucleus and autoregulates IGF-IR gene expression in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*

- 287(4), 2766-2776.
- Tlsty, T.D. and Coussens, L.M. 2006. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 119-150.
- Vella, V., Sciacca, L., Pandini, G., Mineo, R., Squatrito, S., Vigneri, R. and Belfiore, A. 2001. The IGF system in thyroid cancer: new concepts. *Mol. Pathol.* 54(3), 121-124.
- White, S.D., Rosychuk, R.A., Scott, K.V., Trettien, A.L., Jonas, L. and Denerolle, P. 1993. Use of isotretinoin and etretinate for the treatment of benign cutaneous neoplasia and cutaneous lymphoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202(3), 387-391.
- 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(4), 249-254.