



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**CARCINOMA TIROIDEO EN CANINOS  
EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES ESPECÍFICOS DE TIROIDES**

**Por**

**Manuela ARAÚJO RIVERO<sup>o</sup>**



**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  
2012**



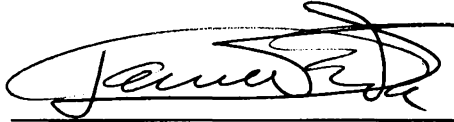
**FV-29502**

TG  
295


**PÁGINA DE APROBACIÓN**

TESIS aprobada por:

Presidente de mesa:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Danilo Fila

Segundo Miembro (Tutor):

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Paula Pessina

Cotutor:

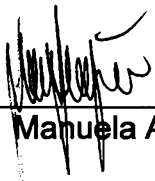
\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Meikle

Tercer Miembro:

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Llambí

Fecha: 20 de Abril de 2012

Autor:

  
\_\_\_\_\_  
Manuela Araújo Rivero

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y QUÍMICAS  
Cursado con 12 (doce) años

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a las Dras. Paula Pessina y Ana Meikle por guiarme, ayudarme y por las enseñanzas que me han dejado a lo largo de este proyecto.

A todo el equipo del Laboratorio de Técnicas Nucleares por su gran colaboración.

A la Ing. Agr. Mariana Carrquiry por su aporte para el entendimiento y desarrollo de las técnicas moleculares utilizadas.

A mi familia y amigos.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
LA GLÁNDULA TIROIDEA	11
Anatomía	11
Histología	11
Embriología de la glándula tiroides	12
Eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo	12
Fisiología de la glándula tiroides	13
TSH y mecanismo de acción	13
Control de la secreción de hormonas tiroideas por la TSH	14
Regulación de la expresión génica por la TSH	15
Regulación del crecimiento de la tiroides	16
CARCINOMA TIROIDEO	16
Antecedentes y Epidemiología	16
Diagnóstico	17
Tratamiento	18
OBJETIVOS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20
HIPÓTESIS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Muestras de tejido tiroideo y sangre	22
Determinaciones de TSH y FT4	23
Aislamiento de RNA y transcripción reversa	23
Cuantificación	23
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	26
Efecto del género sobre los transcritos en tiroides de animales sanos	26
Expresión de los transcritos en tiroides en animales sanos, en lóbulo tiroideo carcinomatoso y contralateral	26

Análisis de las correlaciones	27
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31
ANEXO 1	37
<i>Expression of thyroid-specific transcription factors in thyroid carcinoma,contralateral thyroid lobe and healthy thyroid gland in dogs</i>	37
P. Pessina, V. Castillo, M. Araújo, M. Carriquiry, A. Meikle	

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura N°1. Regulación endócrina del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo.	12
Figura N°2. Ciclos a la línea de base del transcripto RPL19 determinado por PCR en tiempo real en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo tiroideo contralateral.	25
Figura N°3. Nivel de expresión de los transcriptos (normalizados por RPL19) de TSH-R, Tg, TPO, y TTF-1 en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo contralateral.	26
Figura N°4. Nivel de expresión de los transcriptos (normalizados por RPL19) de PAX-8a, PAX-8g, IGF-1 y ER $\alpha$ en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo contralateral.	27
Tabla N°1. Descripción del tumor luego del examen histopatológico y concentraciones de tiroxina libre (fT4) y tirotropina (TSH).	22
Tabla N°2. Secuencias de los pares de primers usados para PCR en tiempo real.	24

## **RESUMEN**

El objetivo fue determinar mediante la técnica de RT-PCR la expresión de transcritos (TSH-R, Tg, TPO, PAX8, TTF- 1, IGF-1 y ER $\alpha$ ) en muestras de glándula tiroides caninas sanas y glándula tiroides de perros con carcinoma tiroideo del lóbulo carcinomatoso y del lóbulo contralateral sano. Los resultados muestran que la expresión de mRNA para TSH-R, PAX8, y ER $\alpha$  no difiere entre grupos. Si se encontró efecto sobre la expresión de mRNA, Tg y TPO siendo el grupo carcinoma el de menor expresión de dichos transcritos en relación a los grupos sanos y contralateral, no encontrándose diferencias entre estos últimos grupos. La expresión de mRNA TTF-1 es mayor en el grupo contralateral que en el grupo sano y carcinoma, que no difirieron entre sí. La expresión del transcritos IGF-1 es mayor en el lóbulo contralateral que en el grupo carcinoma. Los hallazgos revelan que el lóbulo carcinomatoso presenta afectada la expresión del transcritos de Tg y TPO respecto a la glándula sana, sugiriendo que la síntesis de hormonas tiroideas en el carcinoma puede estar alterada; mientras que en el lóbulo contralateral muestran un comportamiento diferencial de la expresión génica los factores mitogénicos (TTF-1 e IGF-1). Esto podría indicar que el lóbulo contralateral trabaja intentando compensar la pérdida de función del lóbulo enfermo.

## **SUMMARY**

The objective was to determine the expression of transcripts (TSH-R, Tg, TPO, PAX8, TTF-1, IGF-1 and ERa) by RT-PCR of healthy canine thyroid gland and thyroid gland with carcinoma and its contralateral lobe. The results show that expression of mRNA for TSH-R, PAX8, and ERa did not differ between groups. There was an effect of the expression of the carcinoma group, where mRNA Tg and TPO was lower than the healthy groups and the contralateral, but there were no differences between them. The mRNA expression of TTF-1 is higher in the contralateral than in the healthy group and carcinoma, which does not differ among themselves. Transcript expression of IGF-1 is greater in the contralateral lobe than in the carcinoma group. The findings show that the expression of TPO and Tg transcript of the carcinomatous lobe was affected in relation to the healthy gland, suggesting that the thyroid hormone synthesis in the carcinoma may be altered. In this sense the contralateral lobe shows a different expression of the mitogenic factor gene (TTF-1 and IGF-1). This could indicate that the contralateral lobe works trying to compensate the loss of sick lobe function.





## **INTRODUCCIÓN**

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). Si bien la incidencia del carcinoma de tiroides no es muy alta, se ha visto aumentada en los últimos años (Castillos 2010, comunicación personal).

Los carcinomas tienen en general una afectación unilateral debido a que los lóbulos tiroideos en el perro en general no están unidos anatómicamente como sucede en los seres humanos, cuando la implicación es bilateral el tumor suele ser más invasivo (Mooney, 2007). Los carcinomas tiroideos generalmente se extienden dentro o alrededor de la tráquea, músculos cervicales, esófago, laringe, nervios, vasos, etc. Las manifestaciones clínicas están relacionadas en su mayoría a la compresión de la masa tumoral sobre los órganos que rodean la tiroides provocando disfagia, disnea, tos, etc. En la mayoría de los casos los animales se mantienen eutiroideos hasta que se destruye más del 75% del parénquima (Mooney, 2007). Por esta razón, la determinación de hormonas tiroideas cuando nos enfrentamos a esta patología no es de gran valor diagnóstico.

La regulación de la función tiroidea se realiza principalmente a través del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides. Las hormonas tiroideas (triiodotironina, T3 y tiroxina, T4) están reguladas por la hormona estimulante de la tiroides (TSH) secretada por la hipófisis que a su vez es controlada por la tirotrópina (TRH) secretada por el hipotálamo. Por otro lado la T3 y T4 ejercen un efecto inhibitorio a nivel de hipotálamo e hipófisis. La TSH a través de la unión a su receptor en la membrana celular (TSH-R) estimula la síntesis de hormonas tiroideas (Dremier y col. 2002). Para que esta síntesis ocurra es necesario también el transporte activo del yodo hacia el interior del tirocito. La biosíntesis de hormonas tiroideas es un proceso secuencial en el que primero se produce la activación del yoduro por parte de una glicoproteína de membrana, la enzima Tiroperoxidasa (TPO). El yodo activado reacciona con los residuos tirosilos de la Tiroglobulina (Tg), que es la glicoproteína más abundante de la tiroides, generando monoiodo o diiodotirosina (MIT o DIT respectivamente). Seguidamente se produce el acoplamiento de estas moléculas para formar T3 y T4. Estas hormonas se acumulan en la luz de los folículos (coloide) y a medida que el organismo lo requiere son secretadas al torrente sanguíneo (Maenhaut, 1992).

Existen factores de transcripción presentes en pocos tipos celulares, específicos; participando en la regulación transcripcional de genes expresados sólo en esas células. Se han identificado dos factores de transcripción cuya expresión está restringida a las células foliculares tiroideas: factor de transcripción tiroidea 1 (TTF-1, Guazzi y col., 1990) y gen pareado box 8 (PAX8, Plachov y col., 1990). Si bien, en animales adultos estos factores se expresan en pulmón y riñón respectivamente, su expresión conjunta es única en las células foliculares tiroideas. TTF-1 y PAX8 se unen a secuencias promotoras de los genes de Tg y TPO y son capaces de activar la transcripción de genes mencionados (Zannini y col., 1992).

Los tumores tiroideos (benignos o malignos) se caracterizan por alterar la expresión de genes específicos involucrados en el metabolismo del yodo (Di Lauro y col., 1995; Moretti, 2000). Estos genes incluyen la Tiroglobulina (Tg), la Tiroperoxidasa (TPO) y el receptor de TSH (TSH-R) (Lazar y col., 1999; Lacroix y col., 2001 ). Estudios en seres humanos indican que en los tumores tiroideos benignos la expresión de PAX8 y TTF-1 no es diferente en comparación con el tejido tiroideo normal, pero sí se encontró una disminución de estos factores en los carcinomas tiroideos (por lo que se han reportado como marcadores tumorales, Lacroix y col., 2006). También se demostró una correlación entre la expresión de Tg y TPO y la expresión de PAX8 y TTF-1. El estudio concluyó que las alteraciones en la expresión de los factores de transcripción PAX8 y TTF-1 tiene un rol en la tumorigénesis y procesos de diferenciación en la tiroides (Lacroix y col., 2006). No se encontró bibliografía respecto a la determinación de estos factores en tumores de la glándula tiroides en caninos. Existen además factores de crecimiento celular que activan o promueven la síntesis de los factores de transcripción vinculados a la mitosis celular. En células tiroideas caninas el IGF-1 (factor de crecimiento similar a insulina I) permite el efecto mitogénico de la TSH y estimula por sí mismo la síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Deleu y col., 1999). Otro potente factor mitogénico en tiroides es el receptor de estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ), que se ha relacionado con el crecimiento del tumor de tiroides en humanos (Manole y col., 2001).

Por este motivo esta tesina de grado tiene como objetivo general contribuir al conocimiento de cuales son los mecanismos moleculares que pueden estar alterados en el carcinoma tiroideo canino, y de forma específica determinar la expresión de transcritos de TSH-R, Tg, TPO, PAX8, TTF- 1, IGF-1 y  $ER\alpha$  en muestras de glándula tiroides de perros sanos y en muestras de glandula tiroides de perros con carcinoma tiroideo tanto del lóbulo carcinomatoso como del lóbulo contralateral sano.

# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **LA GLÁNDULA TIROIDEA**

### **Anatomía**

La tiroides es una glándula endocrina típica de los vertebrados. Es un órgano de origen endodérmico impar y simétrico, formado por dos lóbulos definidos, ubicados en sentido lateral y algo en ventral respecto del quinto al octavo anillo traqueal (Scavelli y Peterson, 1992). A diferencia que en el hombre, el istmo que conecta ambos lóbulos es indefinido en perros adultos, siendo a veces la excepción razas grandes o braquicéfalas (Belshaw, 1989). El tamaño es variable, en perros adultos cada lóbulo tiene aproximadamente 5cm de largo y 1,5cm de ancho (Scavelli y Peterson, 1992) y el volumen tiroideo oscila entre 0,2 a 1,5cm<sup>3</sup> según el tamaño del animal (Peterson y Ferguson, 1992). Los lóbulos son proporcionalmente más grandes en perros inmaduros y razas braquicéfalas.

Es una glándula hipervascularizada y la mayor parte de su irrigación está dada por dos vasos: la arteria tiroidea anterior que proviene de una rama de la carótida común y la arteria tiroidea posterior que tiene origen en la arteria cefálica. El drenaje venoso de la tiroides se realiza con las venas tiroideas anterior y posterior, en los correspondientes polos de cada lóbulo. La innervación 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).

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).

### **Histología**

Desde el punto de vista histológico la glándula está formada por la agrupación de folículos. El folículo es la unidad funcional, tiene una apariencia más o menos esférica con una cavidad central, normalmente ocupada por una sustancia coloide y rodeada de una monocapa de células epiteliales cuboides, de 15-150 µm de diámetro, el tirocito (Mayayo y col., 2000). 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. En los folículos se produce la síntesis de las hormonas T4 (tiroxina), T3 (3,5,3'-triyodotironina) y rT3 (T3 reversa, biológicamente inactiva) (Pocock y Richards, 2005). Entre los folículos encontramos también otro tipo de células, las parafoliculares o células C, productoras de

calcitonina. El coloide constituye el reservorio de la proteína específica de la célula epitelial tiroidea, la Tiroglobulina (Tg).

### **Embriología de la glándula tiroides**

La tiroides es la primera glándula endócrina que aparece en el desarrollo embrionario de los mamíferos (Mansberger y Wei, 1993). El origen de esta glándula es endodérmico y se forma como un apéndice en la cuarta y quinta bolsas faríngeas. 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). Desde el punto de vista molecular, se han descrito 3 genes que codifican para proteínas que regulan la normal morfogénesis y migración de la tiroides embrionaria: factor de transcripción tiroideo 1 y 2 (TTF-1, TTF-2) y gen pareado box 8 (PAX-8). Se propone que TTF-1 y PAX-8 tienen un papel importante en la determinación del tipo celular tiroideo y en la vida del tirocito (Zanini y col., 1992). El TTF-2 actúa regulando la migración de la tiroides. Posteriormente se expresa el receptor de TSH (R-TSH) y por último el gen de la Tg y la TPO.

### **Eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo**

La función tiroidea está finamente regulada fundamentalmente por la hormona estimulante de la tiroides (TSH), secretada por la hipófisis, que se encuentra a su vez bajo el control hipotalámico (Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides) (Figura 1)

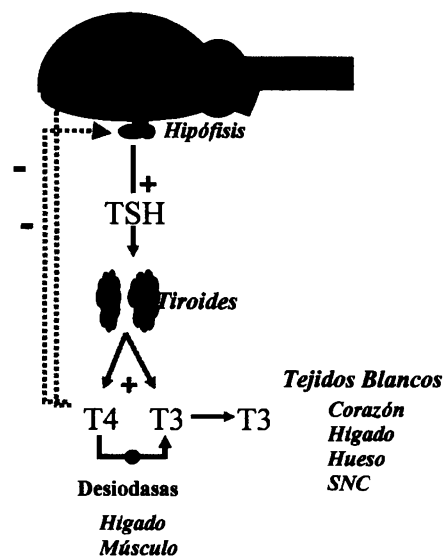


Figura 1. Regulación endócrina del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo.

La TRH, hormona liberadora de tirotropina, sintetizada en el hipotálamo, es quien regula a la TSH. La producción y liberación hipotalámica de TRH está controlada por rutas neurales desde centros cerebrales superiores (Chastain, 1990). Una vez producido es llevado por el sistema porta-hipofisario hasta las células de la adenohipófisis donde interactúa con su receptor de membrana. El TRH 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, segregada por la hipófisis, en las células tirotropas adenohipofisarias, es una glucoproteína compuesta de dos cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$ . Una vez sintetizada la TSH es almacenada en los gránulos secretorios y liberada a la circulación por acción de la TRH como se mencionó anteriormente. La vida media sérica de la TSH es relativamente corta, aproximadamente 10 a 15 minutos. La interacción de la TSH con su receptor localizado en la membrana basal del tirocito aumenta la síntesis de las hormonas tiroideas (T4 y T3) en los folículos, puesto que participa en todos los pasos biosintéticos además de estimular la liberación de T4 y T3 hacia la circulación sistémica.

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

Los niveles circulantes de T4 y T3 regulan la secreción tanto de TRH como de TSH a través de una retroalimentación negativa (Figura 1), la molécula efectora de dicha retroalimentación negativa es 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  $\alpha$  y  $\beta$  (Dieguéz y Aguilar, 1997). A nivel hipotalámico existen receptores para T3 y esta hormona inhibe la expresión del gen de TRH así como su síntesis. La T3 reduce aún más la liberación de TSH al disminuir el número de receptores de TRH. La T4 puede también sufrir desactivación a través de otra enzima, desyodasa tipo III, presente en cerebro, placenta y vasos sanguíneos que la convierte en T3 reversa (T3r), inactiva biológicamente. La proporción de conversión de T4 a T3 o T3r depende del estado metabólico del organismo (Larsen y Berry, 1994).

## **Fisiología de la Tiroides**

### **TSH y mecanismo de acción**

La TSH controla la función y el crecimiento de la tiroides a través de su unión al receptor específico (TSH-R) en la superficie celular y regulando los niveles intracelulares de un segundo mensajero, el AMPc (Rivolta y col., 2005). El aumento del AMPc activa múltiples vías de señalización que regulan la proliferación, la

diferenciación y la función de la tiroides (Medina y Santisteban, 2000; Kimura y col., 2001).

### **Control de la secreción de las hormonas tiroideas por la TSH**

La biosíntesis de las hormonas tiroideas (T3 y T4) se realiza sobre una proteína estructural que es la tiroglobulina (Tg) con la intervención de una enzima microsomal, la tiroperoxidasa (TPO) y en presencia de una fuente de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en la interfase célula-coloide (Medeiros-Neto y col., 2002). En el proceso de biosíntesis de hormonas tiroideas el yodo es un oligoelemento esencial. La principal fuente de yodo proviene de los alimentos y del agua. El yodo (I) ingerido en la dieta alcanza la circulación en forma de yoduro ( $I^-$ ) y se absorbe como tal en el tracto gastrointestinal. El yoduro ingresa al citoplasma celular a través de un transportador en la membrana basolateral del tirocito y un segundo transportador ubicado en la membrana apical lleva el yoduro hacia la interfase célula-coloide. El yoduro para alcanzar su forma activa debe ser oxidado; este proceso es catalizado por la enzima tiroperoxidasa (TPO). La TPO es una hemoproteína glicosilada específica de la tiroides, ubicada en la membrana apical del tirocito donde cataliza la unión del yoduro activo a los residuos tirosílicos de la tiroglobulina (Tg).

La Tg, es una glicoproteína precursora de las hormonas tiroideas. El anillo tirosílico de la Tg puede incorporar una molécula de yoduro dando lugar a la monoyodotirosina (MIT) o dos moléculas de yoduro formando diyodotirosina (DIT). Si se acoplan dos residuos DIT o un DIT y un MIT tiene lugar la formación de T4 y T3 respectivamente, quedando incorporados a la molécula de Tg. Esta reacción de acoplamiento así como la incorporación de yoduro son catalizadas por la enzima TPO. La Tg más antigua se localiza en la zona central del lumen y en la zona próxima al borde apical la yodada más recientemente. Cuando el tirocito es estimulado por la TSH (por aumento de los requerimientos orgánicos) aparecen pseudópodos en la membrana apical que engloban pequeñas porciones de coloide del lumen folicular y esas gotas de coloide entran al citoplasma por un proceso de endocitosis. Una vez en el citoplasma los lisosomas migran hacia esas gotas de coloide, se fusionan y las proteasas lisosomales van hidrolizando la Tg yodada hasta la liberación de todos sus aminoácidos, incluidos los yodados, las yodotirosinas MIT y DIT y las yodotironinas T4 y T3. La TSH a través de la unión con su receptor y el aumento del AMPc es responsable de estimular todos los procesos mencionados anteriormente: aumenta la captación de yodo y la síntesis de Tg, su yodación y la reacción de acoplamiento, la endocitosis de la Tg yodada y su proteólisis con liberación de las hormonas tiroideas en forma de yodoaminoácidos libres. Finalmente las hormonas tiroideas pasan a la circulación y actúan en los tejidos blanco. Las acciones de las hormonas tiroideas en el organismo son múltiples y ejercen complejos e importantes efectos sobre el metabolismo de proteínas (*efecto anabólico*), lípidos (*efecto lipolítico*), e hidratos de carbono (*efectos hiperglucemiantes*). Las hormonas tiroideas tienen un rol decisivo en el desarrollo fetal, particularmente de los sistemas neurológico y esquelético (Arce, 2006). Tienen además efectos sobre el corazón; centros respiratorios; eritropoyesis; y promueven el recambio óseo aumentando la resorción esquelética. En esencia, ningún tejido u órgano escapa a los efectos del exceso o insuficiencia de hormona tiroidea (Coates, 1997).



## Regulación de la expresión génica por la TSH

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

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

El complejo TSH/TSH-R tras provocar el aumento de AMPc intracelular es responsable de activar factores de transcripción tras la fosforilación de los mismos. Aunque se desconoce el mecanismo, ha sido claramente demostrado que la TSH regula los niveles de mRNA de algunos genes específicos de la tiroides como Tg y TPO (Mitchell y Tjian, 1989; Zarrilli y col., 1990). La participación de factores de transcripción que se unen a regiones promotoras de los genes de Tg y TPO es considerada como el factor principal para regular la expresión de estos genes (Mitchell y Tjian, 1989). En perros la información respecto a la regulación de la expresión génica mediada por TSH es casi inexistente. En los seres humanos, dos factores de transcripción que tienen un rol clave en la morfogénesis tiroidea, el TTF-1 y PAX-8, que se unen a la secuencia de los promotores de Tg y TPO y son capaces de activar la transcripción de estos genes (Francis-Lang y col., 1992; Zannini y col., 1992). Estos factores de transcripción, TTF-1 y PAX-8, tienen una función destacada sobre el control de la diferenciación celular tiroidea. Se ha demostrado que PAX-8 es necesario tanto para la morfogénesis de la glándula tiroidea como para el mantenimiento del fenotipo celular tiroideo. Distintos trabajos han mostrado evidencias de la importancia de PAX-8 en el mantenimiento de la diferenciación tiroidea activando la expresión de todos los genes marcadores de diferenciación tiroidea excepto del TSH-R (Zanini, 1992). Además se ha descrito la interacción física y funcional entre PAX-8 y TTF-1 *in vivo*, mediante la cual ambos factores aumentan sinérgicamente la transcripción de Tg y TPO en la glándula tiroides en humanos (Katoh y col., 2000; Di Palma, 2003). El factor de transcripción PAX-8 pertenece a una familia de genes con dominio de unión al DNA denominado paired-box. Se identificó inicialmente en riñón pero se vio que su función es crucial en tiroides, siendo responsable de la formación de los folículos tiroideos. El TTF-1 pertenece a una familia de factores de transcripción con un dominio de unión al DNA (homeodominio o gen homeobox). Inicialmente se identificó como específico de tiroides pero se vio luego que estaba presente también en pulmón e hipófisis. Se ha definido a TTF-1 como responsable de la especificación tiroidea, expresándose tanto en células foliculares como parafoliculares.

## **Regulación del crecimiento de la tiroides**

La TSH vía AMPc promueve el crecimiento del tirocito directamente a través de la unión a su receptor e indirectamente estimulando la secreción de factores de crecimiento o de receptores de factores de crecimiento. A pesar del papel central del AMPc en la regulación de los procesos biológicos de las células tiroideas, la cooperación con otras vías de señalización es necesaria para que los tirocitos desarrollen una actividad mitogénica completa en respuesta a TSH (Kimura, 2001; Medina, 2000). En células tiroideas caninas el IGF-1 permite el efecto mitogénico de la TSH y estimula por sí mismo la síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Deleu y col., 1999). La insulina actúa a través del receptor de IGF-1, siendo por tanto este factor el funcional. La insulina y el IGF-1 cooperan con la TSH en la regulación de la expresión de los genes marcadores de diferenciación tiroidea. Se ha demostrado que tanto insulina como IGF-1 estimulan la expresión de mRNA de Tg y TPO. Por otro lado, estudios *in vitro*, (FRTL-5 thyroid cells), demuestran que la transcripción del TSH-R también es inducida por el tratamiento con insulina/IGF-1 (García y Santisteban, 2002). Otro potente factor mitogénico en tiroides es el receptor de estrógeno alfa (ER $\alpha$ ), (Manole y col., 2001). Además se ha demostrado en otros tejidos que el IGF-1 estimula la función del ER $\alpha$  de una forma que es independiente al ligando (Flint y col., 2002), por lo que se puede pensar en una conversación entre ambas vías de señalización.

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

## **CARCINOMA TIROIDEO**

En el perro la endocrinopatía tiroidea más frecuentemente diagnosticada es el hipotiroidismo seguida del carcinoma de tiroides. Las masas neoplásicas que se encuentran en la tiroides derivan de las células foliculares tiroideas, de vestigios del conducto tirogloso, de las células parafoliculares (células C) o de células de la paratiroides (Capen, 2002).

El carcinoma es el tipo de neoplasia mayormente detectado en la clínica y generalmente se originan de células epiteliales de los folículos tiroideos.

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

## **Antecedentes y Epidemiología**

La presentación clínica y el comportamiento biológico de los tumores tiroideos pueden variar ampliamente entre perros, gatos y humanos. Los tumores de tiroides



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

El carcinoma tiroideo en caninos por lo general, es una masa voluminosa, afuncional, unilateral y localmente invasiva: tráquea, músculos cervicales, esófago, laringe y vasos sanguíneos (Liptak, 2007). Estos tumores pueden residir en cualquier parte, desde la base de la lengua hasta la base cardíaca, pero con mayor frecuencia se desarrollan en la región cervical. Los signos clínicos presentes en perros con tumores de tiroides benignos o malignos son similares. La presentación clínica más común es una masa indolora en la región cervical y los signos clínicos son generalmente el resultado de la invasión y compresión de estructuras vecinas: disfagia, tos, disfonía, disnea, pérdida de peso y anorexia (Birchard y col., 1981; Harari y col., 1986). El carcinoma tiroideo tiene un pronóstico reservado, dependiendo en parte del tamaño, la movilidad y la presencia o ausencia de metástasis (Ogilvie, 1996).

Más del 90% de los tumores tiroideos clínicamente detectables en perros son carcinomas y un porcentaje significativo de éstos son grandes, invasores, palpables y clínicamente inquietantes. En caninos, la mayoría de los tumores tiroideos están bien o moderadamente diferenciados (Brodey y Kelly, 1968; Leav y col., 1976; Harari y col., 1986; Mitchell y Tjian, 1989; Klein y col., 1995), se originan del epitelio folicular y por lo general son subclasificados como *foliculares*, *compactos (sólido)*, *papilares* y *compacto-foliculares*. Estas formas representan aproximadamente las tres cuartas partes de las neoplasias de tiroides en perros (Mitchell y Tjian, 1989; Klein y col., 1995; Worth y col., 2005). Los carcinomas diferenciados se caracterizan por conservar las funciones propias de la glándula, como la captación de yodo, la biosíntesis hormonal, la de Tg y TPO (Pisarev y Juvenal, 2010). Su pronóstico no es tan severo como el indiferenciado, que es muy agresivo, no concentra el yodo y produce tempranamente metástasis (Pisarev y Juvenal, 2010). El carcinoma *papilar*, si bien es el cáncer de tiroides más común en los seres humanos (70 a 90% de los casos), se presenta en forma esporádica en perros (Leav y col., 1976; Worth y col., 2005).

### **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.

#### *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 laringea Brodey y Kelly, 1968; Birchard y Roesel, 1981; Harari y col., 1986; Carver y col., 1995).

#### *Estatus Hormonal tiroideo*

La mayoría de los perros con carcinoma de tiroides no muestran signos de función tiroidea alterada manifestándose como eutiroideos (70%) frente a los distintos test utilizados para evaluar la función de la glándula tiroides (medición de T4, TSH). Algunos estudios mencionan que alrededor del 30% de los perros testeados para T3 y T4 presentaban niveles bajos de hormonas pero sin signos de hipotiroidismo (Harari 1986, Worth 2005). Harari (1986) no encontró ningún animal con niveles elevados de hormonas tiroideas mientras que Worth (2005) observó niveles altos de T4 en un 32% pero ningún perro presento signos clínicos. Leav y col. (1976) reportaron en perros con tumores tiroideos un 22% de animales clínicamente hipertiroideos. 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.

#### *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 a grado de invasión de la masa tiroidea sobre estructuras vecinas. La escintigrafía con pertecnetato de tecnecio-99m ( $Tc^{99m}$ ) o menos frecuentemente yodo radioactivo ( $I^{131}$ ) se usa sobre todo para identificar enfermedad local residual después de la cirugía, tumores ectópicos o metástasis.

#### *Biopsia y citología*

La precisión de la citología en perros con masas tiroideas no es buena, solo la mitad de las veces confirma que la masa es de origen tiroideo y a menudo no es posible reconocer un tumor maligno de forma definitiva (Harari y col., 1986; Feldman y Nelson, 2004). Dado que los tumores tiroideos malignos tienen una densidad vascular mayor que el tejido tiroideo normal y los tumores benignos (Kent y col., 2002), la hemodilución es un problema común en la citología.

#### **Tratamiento del carcinoma tiroideo**

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

Las neoplasias tiroideas no operables se pueden manejar con radioterapia. La radioterapia externa es la utilizada con mayor frecuencia. La radiación externa ayuda en el control local del tumor en aquellos casos en que la recesión quirúrgica no es total (Brearley y col., 1999). En perros la experiencia es limitada pero la administración de I<sup>131</sup> parece ser efectiva cuando los tumores son capaces de atrapar y organificar el yodo (Adams y col., 1995; Panciera y col., 2004; Worth y col., 2005).

Respecto al uso de la quimioterapia en el manejo de tumores tiroideos en perros los estudios publicados son pocos y con un bajo número de animales (Jeglum y Wereat, 1983; Ogilvie y col., 1989). La quimioterapia se puede considerar en pacientes con grandes tumores no operables y/o con metástasis.

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

Avances relativamente recientes en biología molecular han hecho posible el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, siendo los genes tiroideos el blanco de los mismos. La terapia génica 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-1y PAX8 como mediadores de la rediferenciación. También se estudian agentes de rediferenciación que han demostrado ser efectivos sobre la célula tiroidea como: el ácido retinoico (AR) entre otros. El AR, un derivado de la vitamina A biológicamente activo, ejerce sus efectos modulando la expresión de genes, actuando sobre dos tipos de receptores nucleares (receptor de ácido retinoico y receptor retinoico X), los cuales actúan como factores de transcripción. El tratamiento con AR está siendo utilizado en caninos para el tratamiento del adenoma productor de ACTH (corticotropinoma) (Castillo y col., 2006) y se está estudiando actualmente su utilidad en el carcinoma de tiroides.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Esta tesina de grado tiene como objetivo general contribuir al conocimiento de cuales son los mecanismos moleculares que pueden estar alterados en el carcinoma tiroideo canino.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar la expresión de transcritos de TSH-R, Tg, TPO, PAX8, TTF- 1, IGF-1 y ER $\alpha$  en muestras de glándula tiroides de perros sanos y en muestras de glandula tiroides de perros con carcinoma tiroideo del lóbulo carcinomatoso y del lóbulo contralateral sano.

Analizar si existen diferencias en la expresión génica de las variables mencionadas en tejidos sanos, contralateral (sano) y en tejido carcinomatoso tiroideo.

## **HIPÓTESIS**

La hipótesis de trabajo es que en el tejido carcinomatoso está afectada la expresión de genes funcionales (TSH-R, Tg, TPO) y de los factores que los regulan (PAX8 y TTF-1). Además, hipotetizamos que en perros eutiroideos con carcinoma, el lóbulo tiroideo contralateral compensa la función a través de una expresión génica aumentada.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### MUESTRAS DE TEJIDO TIROIDEO Y DE SANGRE

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

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

Tabla 1. Descripción del tumor luego del examen histopatológico y concen traciones de tiroxina libre (fT4) y tirotropina (TSH). Los rangos de normalidad para fT4 y TSH son 0.7 a 2.0 ng/dL y 0.02 a 0.40 ng/mL respectivamente.

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

Sexo<sup>a</sup>, F= hembra y M=macho

fT<sub>4</sub><sup>b</sup> y TSH<sup>b</sup>=valores de referencia del Laboratorio Hospital Escuela, Facultad de Veterinaria, UBA.

## **DETERMINACIONES DE TSH Y FT<sub>4</sub> (tiroxina libre)**

Las determinaciones hormonales fueron realizadas solo en los casos patológicos. Las concentraciones plasmáticas de TSH fueron determinadas por IRMA (ensayo inmunoradiométrico) utilizando kits comerciales DPC (Coat-A-Count, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, EE.UU.). La sensibilidad del ensayo fue de 0.03 ng/mL. Los coeficientes de variación intra-ensayo para controles bajos (0.26 ng/mL) y altos (3.1 ng/mL) fueron 9.5 % y 2 % respectivamente. Las concentraciones de FT<sub>4</sub> fueron determinadas usando un kit de radioinmunoensayo en fase sólida (RIA) de DPC. La sensibilidad fue de 0.01 ng/dL. Los coeficientes de variación intra-ensayo para controles bajos (0.2 ng/dL) y altos (3.9 ng/dL) fueron 8.5% y 4.1% respectivamente.

## **ASLAMIENTO DE RNA Y TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

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

## **CUANTIFICACIÓN**

Como dos variantes de Pax8 fueron reportadas en caninos (PAX 8a y PAX 8g, van Renterghem y col. 1996), ambas fueron determinadas. Los primers específicos para amplificar cDNA de TSH-R, Tg, TPO, PAX-8a, PAX-8g, y TTF-1, fueron diseñados basados en las secuencias nucleotídicas de canis lupus familiares disponibles en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para el diseño se utilizó el software Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus>) y para el análisis y la selección de los mismos (formación de dímeros, horquillas) el OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/OligoAnalyzer>). Las secuencias para ERα e IGF-I se obtuvieron de la literatura (Pfaffl y col. 2002; Schams y col. 2003; Wu y col. 2004). Se probaron los primers y los productos PCR se corrieron en geles de agarosa donde se verificó el tamaño de los mismos con marcadores de peso molecular. Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación a la empresa Macrogen (Korea) y se confirmó la identidad de la secuencias en el Gene Bank utilizando el algoritmo blast (<http://www.blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>). Las secuencias de los primers utilizados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de los pares de primers usados para PCR en tiempo real.

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

Se realizaron pruebas de PCR en tiempo real para cada set de primers utilizando SYBR green (Quantimix; Biotools, Madrid, España) como fluoróforo. La cuantificación de los transcriptos fue determinada en RT-PCR en tiempo real (real-time RT-PCR; Rotor-Gene<sup>TM</sup> 6000; Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). Las condiciones de amplificación fueron 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 seg a 95 °C, 45 seg a 60 °C y 20 seg a 72 °C. Se realizaron curvas de dilución para cada producto PCR de acuerdo a Fenwick y col. (2006). Para cada gen se realizaron estas curvas de titulación a través de las cuales se calculó la eficiencia de la amplificación. El rango de las eficiencias de los diferentes transcriptos fue de 86 a 99 %.

Para estandarizar las medidas de cuantificación de expresión génica debido a diferencias entre las muestras en cantidad de células en la muestra de tejido extraído, en la calidad del ARN, y en la eficiencia de la RT, los datos de expresión de ARNm de los genes de interés fueron normalizados respecto al gen usado como control interno ( $\Delta CT = [CT(\text{gene de interés}) - CT(\text{control interno})]$ ) y se expresaron en relación a la muestra utilizada como control positivo o control externo ( $\Delta\Delta CT = \Delta CT - \Delta CT(\text{control positivo})$ , cuantificación relativa; Livak and Schmittgen, 2001).

El nivel de expresión de la proteína ribosomal L19 (RPL19) se usó como control interno usando las secuencias de primer de Chen y col. (2006). La expresión de RPL19 se testeó en un estudio piloto y probó ser un buen gen control porque no mostró variaciones entre individuos y tratamientos como había sido demostrado previamente para otros tejidos ovinos y bovinos (Sosa y col., 2009; Sosa y col., 2010). Como se puede observar en la Figura 2, los ciclos a la línea de base (CT= threshold) no difirieron entre grupos.



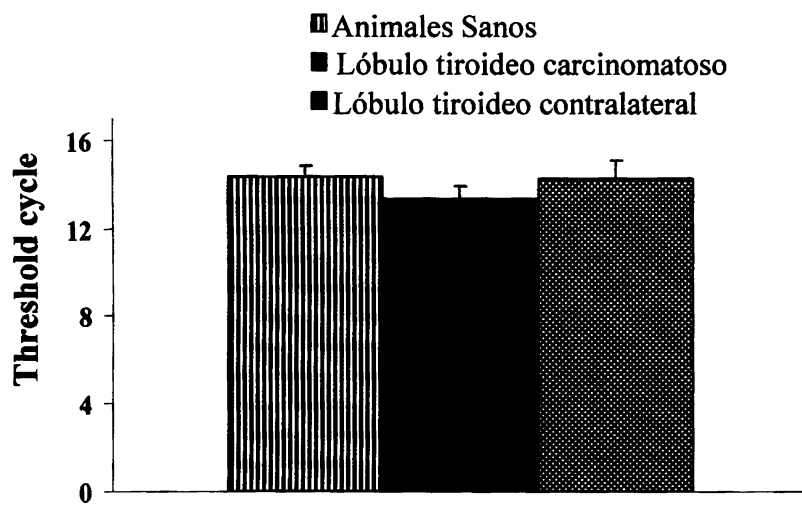


Figura 2. Ciclos a la línea de base del transcrito RPL19 determinado por PCR en tiempo real en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo tiroideo contralateral.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis de normalidad (Proc Univariate, SAS) en todas las variables para identificar "outliers" y verificar la normalidad de los residuales. Los transcritos se analizaron por el procedimiento mixto con medidas repetidas en el espacio (individuos: lóbulo carcinomatoso y contralateral) por el Proc Mixed, Statistical Analysis System, SAS, incluyendo en el modelo el grupo (sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y contralateral sano) como efectos fijos y como efecto aleatorio la corrida de PCR. Además, se analizó el efecto del sexo únicamente en el grupo sano, debido a que los animales con carcinoma eran solo 2 machos. Se realizaron correlaciones de Spearman para estudiar asociaciones entre variables. Los datos se presentan como promedios  $\pm$  SEM.

El nivel de significación fue  $P < 0.05$  y los valores de  $P$  comprendidos entre 0.05 y 0.10 se consideraron como tendencia.

## RESULTADOS

### Efecto del género sobre los transcritos en tiroides de animales sanos

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

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

La expresión de los transcritos para los genes TSH-R, Tg, TPO, TTF-1 en la tiroides de animales sanos, en el lóbulo carcinomatoso y en el lóbulo tiroideo contralateral se muestran en la Figura 3.

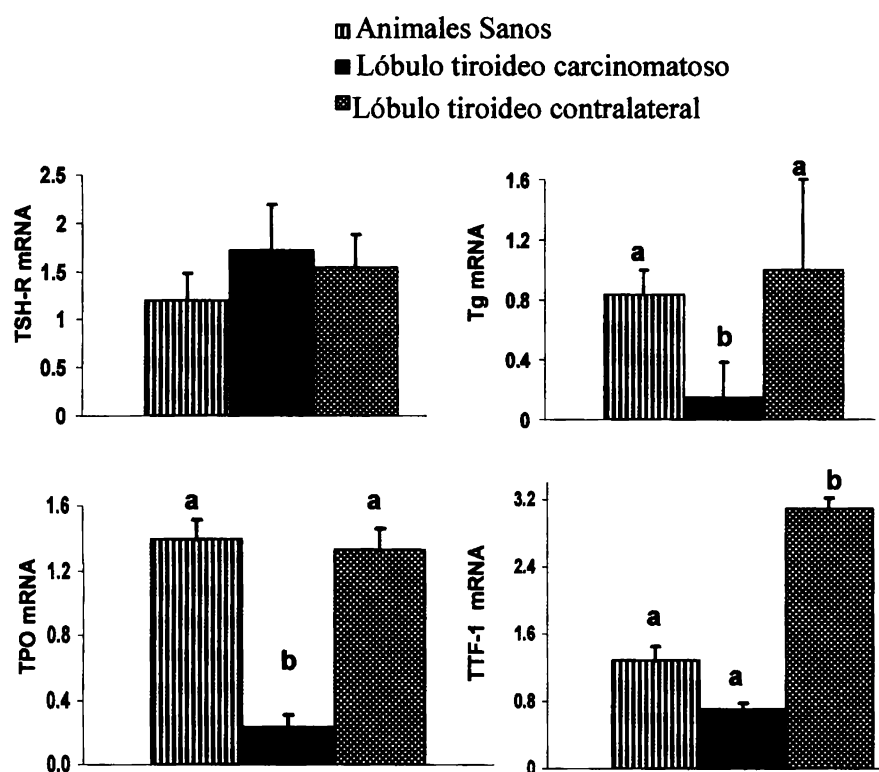


Figura 3. Nivel de expresión de los transcritos (normalizados por RPL19) de TSH-R, Tg, TPO, y TTF-1 en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo contralateral. Las diferentes letras indican diferencias en el mismo gráfico, a,b:  $P < 0.05$  (cuadrado de las medias  $\pm$  error estándar).

La expresión de mRNA del TSH-R no fue diferente entre los grupos. Los niveles de mRNA de Tg, TPO y TTF-1 fueron afectados por el grupo ( $P = 0.012$ ,  $P = 0.0003$  y  $P = 0.046$ , respectivamente). El grupo carcinoma tuvo menor expresión de mRNA de Tg y TPO que los grupos sanos y CL,  $P < 0.05$ , mientras que no se

encontraron diferencias entre estos últimos grupos. La expresión de mRNA de TTF-1 fue mayor en el grupo CL que en el grupo sano y carcinoma ( $P < 0.05$ ), que no difirieron entre sí (Figura 3). La expresión del transcripto IGF-1 fue mayor en el lóbulo contralateral que en el grupo carcinoma ( $P < 0.05$ ). El nivel de expresión de mRNA de PAX-8a, PAX-8g, y el ER $\alpha$  no fue diferente entre los grupos (Figura 4).

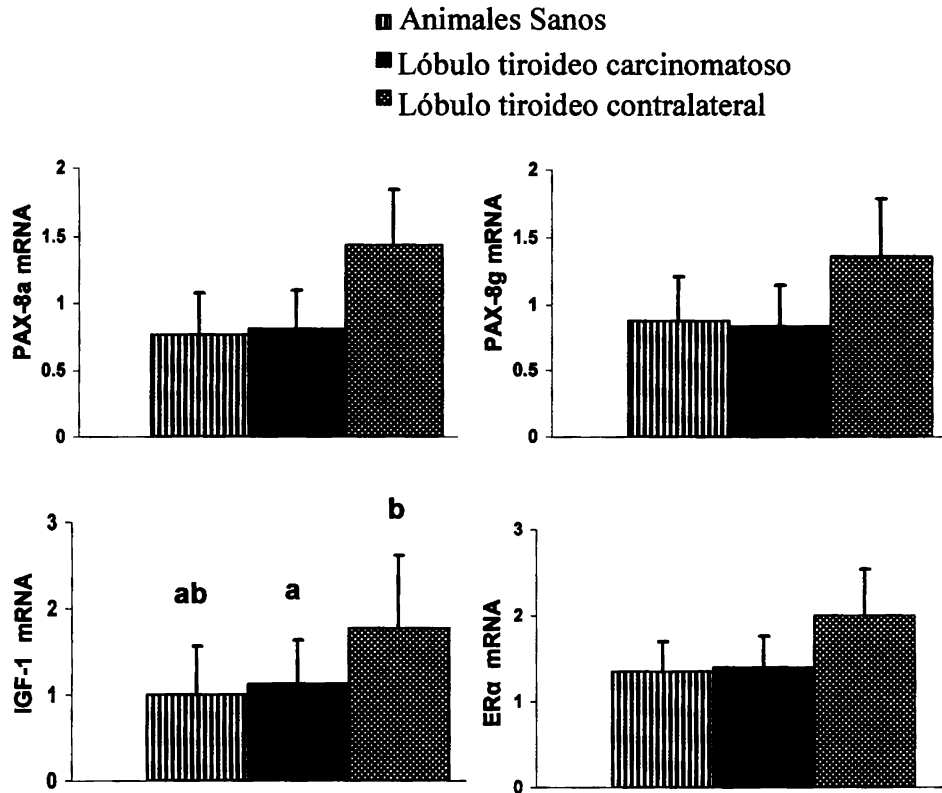


Figura 4. Nivel de expresión de los transcritos (normalizados por RPL19) de PAX-8a, PAX-8g, IGF-1 y ER $\alpha$  en animales sanos, lóbulo tiroideo carcinomatoso y lóbulo contralateral.

### Análisis de correlaciones

Se analizaron correlaciones entre variables en tejidos tiroideos sanos (animales sanos y lóbulo contralateral sano) y tejidos enfermos (lóbulo carcinomatoso) por separado. El análisis de la correlación en la expresión de estos genes en tejidos tiroideos sanos evidenció una correlación alta entre el TSH-R (mRNA) y Tg ( $r = 0.74$ ,  $P < 0.01$ ) y una correlación media a alta entre los transcritos de TTF-1, IGF-1 y ER $\alpha$  ( $r = 0.65$  a  $0.81$ ,  $P < 0.01$ ). La expresión del transcripto de PAX-8 a/g presentó una correlación alta con Tg ( $r = 0.72$  a  $0.81$ ,  $P < 0.01$ ). Al analizar el grupo carcinoma, no se observó correlación de la expresión entre los genes TTF-1, IGF-1 y ER $\alpha$ . Se mantuvo la correlación positiva entre Tg y PAX-8a/g ( $r = 0.72$ ,  $P < 0.01$ ). Se observó una correlación positiva alta entre Tg y TPO ( $r = 0.88$ ,  $P = 0.004$ ) y de TPO con PAX-8 ( $r = 0.90$ ,  $P = 0.002$ ).

## **DISCUSIÓN**

En animales sanos, la expresión de los transcritos del receptor de TSH (TSH-R) y de tiroglobulina (Tg) en tiroides fue mayor en hembras que en machos, y no hemos encontrado reportes similares en perros. Se ha sugerido que los esteroides sexuales pueden influir en el crecimiento de la tiroides a través de la modulación de la concentración de sus receptores específicos (Banu y col., 2002). Además, los receptores de andrógenos y de estrógenos (ER) no sólo están presentes en la glándula tiroides, sino que su síntesis es estimulada por las hormonas respectivas (Banu y col., 2001).

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

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

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

Los genes Tg y TPO están regulados por dos factores de transcripción, TTF-1 y PAX 8 que están presentes simultáneamente sólo en las células foliculares de la tiroides, lo que sugiere que esta combinación única podría desempeñar un papel en la expresión del fenotipo específico de la tiroides (Fabbro y col., 1994). Si bien este

estudio consideró un bajo número de animales, uno de los hallazgos más interesantes de nuestro trabajo fue el aumento de casi 3 y 2 veces en la expresión de TTF-1 e IGF-1 respectivamente en el lóbulo tiroideo contralateral en comparación con el grupo sano y carcinoma. TTF-1 e IGF-1 son considerados factores mitogénicos implicados en la proliferación y diferenciación celular (Deleu y col., 1999; Ramos-Vara y col., 2002; Lacroix y col., 2006; Kondo y col., 2009), por lo tanto, se puede especular que este incremento en la expresión en el lóbulo contralateral puede estar asociado con una hiperplasia que intenta compensar la pérdida de función del lóbulo enfermo, con el fin de mantener el estado eutiroideo. Esta idea se ve reforzada por la baja expresión de mRNA de Tg y TPO en el tejido carcinomatoso, lo que sugiere que la síntesis de hormonas tiroideas por el lóbulo afectado es defectuosa. En general, los datos de expresión de mRNA tanto en el grupo carcinoma como en el lóbulo contralateral pueden explicar por qué 7 de los 8 perros con carcinoma de tiroides en este estudio presentaron valores de TSH y T4 libre dentro del rango normal, como se ha reportado para la mayoría de los perros (Nelson 1998; Barber, 2007). Por otro lado, un pequeño porcentaje de perros con carcinoma tiroideo presentan hipotiroidismo - como uno de los perros de nuestro estudio- en estos casos se puede proponer que la expresión génica del lóbulo sano esté alterada, ya que se ha demostrado que la expresión de dicho lóbulo es inhibida por citocinas liberadas por el lóbulo enfermo (Dumont y col., 1991; Cocks y col., 2000; Kimura y col., 2001).

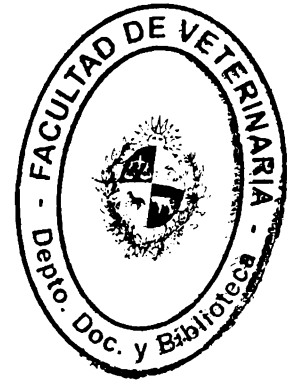
En contraste con los datos de TTF-1, no se pudieron demostrar diferencias significativas en la expresión de mRNA de PAX-8, y no se encontró correlación entre estos dos transcritos. Por otro lado, el análisis estadístico reveló una correlación significativa entre mRNA de PAX-8 y Tg como ha sido reportado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

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

## CONCLUSIONES

En este estudio los hallazgos muestran que la expresión génica está alterada en los carcinomas de tiroides respecto a la glándula sana, lo que sugiere que la capacidad de síntesis de Hormonas Tiroideas está afectada.

La mayor expresión génica (mRNA) de factores mitogénicos en el lóbulo tiroideo contralateral podría sugerir una hiperplasia compensatoria en perros eutiroides.



## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1) Arce V.M. (2006) Fisiología de la glándula tiroidea. En *Edocrinología*, Arce, Victor M, Catalina Pablo F, Mallo Federico. Universidad de Santiago de Compostella, Universidad de Vigo.
- 2) Banu, K.S., Govindarajulu, P., Aruldas, M.M. (2001) Testosterone and estradiol modulate TSH-binding in the thyrocytes of Wistar rats: influence of age and sex. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78: 329-342.
- 3) Banu, S.K., Govindarajulu, P., Aruldas, M.M.(2002) Developmental profiles of TSH, sex steroids, and their receptors in the thyroid and their relevance to thyroid growth in immature rats. *Steroids* 67: 137-144.
- 4) Barber, L.G., (2007), Thyroid tumors in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 37: 755-773.
- 5) Belshaw, B.F. (1989). Enfermedades tiroideas. En: Ettinger, S (ed): *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*, 2ed. Inter-Médica, Buenos Aires. 1491- 1494.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Brodey, R.S., Kelly, D.F. (1968) Thyroid neoplasms in the dog. A clinicopathologic study of fifty-seven cases. *Cancer* 22: 406-416.
- 9) 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.
- 10) Capen CC (2002). Tumors of the endocrine glands. En: *Tumors in Domestic Animals*, ed. Meuten DJ, 4a ed. Iowa State Press, Ames, IA, 638–684
- 11) 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.
- 12) Castillo, V. (2006) Epidemiología Endócrina. En Gómez N y Feijoo, S. *Clínica Médica de Pequeños Animales I*, Endocrinología, ed. Aniwa,;121-122.
- 13) Chastain, C.B.(1990) Canine pseudohypothyroidism and covert hypothyroidism. *Probl Vet Med* 2, 693-716.
- 14) Chen Y, Green JA, Antoniou E, Ealy AD, Mathialagan N, Walker AM, Avelle MP, Rosenfeld CS, HeRNAe LB, Roberts RM. (2006)Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology*.;147:2127-2137.
- 15) Coates, J., (1997), Hipotiroidismo: manifestaciones neurológicas. *Selecciones Veterinarias*, 5(4):314.
- 16) 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* 2: 570-576.
- 17) Correa da Costa VM, Moreira DG, Rosenthal D.(2001) Thyroid function and aging: gender-related differences. *Journal of Endocrinology*.;171:193-198.
- 18) 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.

- 19) Di Lauro, R., Damante, G., De Felice, M., Arnone, M.I., Sato, K., Lonigro, R. & Zannini, M. (1995) Molecular events in the differentiation of the thyroid gland. *Journal of Endocrinological Investigation*, 18: 117–119.
- 20) Di Palma, T., Nitsch, R., Mascia, A., Nitsch, L., Di Lauro, R., Zannini, M., (2003), The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem* 278: 3395-3402.
- 21) Dieguéz C, Aguilar E. (1997). Integración neuroendócrina y regulación hormonal de la secreción adenohipofisaria. En *Tratado de Endocrinología pediátrica* 2a ed
- 22) Dremier S, Coulonval K, Perpete S, Vandeput F, Fortemaison N, Van Keymeulen A, Deleu S, Ledent C, Clément S, Schurmans S, Dumont JE, Lamy F, Roger PP, Maenhaut C. (2002). The role of cyclic AMP and its effect on Protein Kinase A in the mitogenic action of thyrotropin on the thyroid cell. *Anm. N.Y. Acad. Sci.* 968:106-121.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) Fabbro, D., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Belfiore, A., Di Lauro, R., Damante, G., (1994), Expression of thyroid-specific transcription factors TTF-1 and PAX-8 in human thyroid neoplasms. *Cancer Res* 54: 4744-4749.
- 26) Feldman EC, Nelson RW (1996) Feline hyperthyroidism (thyrotoxicosis). En Feldman EC, Nelson RW (eds) *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Philadelphia, WB Saunders, 118-166
- 27) Feldman EC, Nelson RW. (2004) Canine thyroid tumors and hyperthyroidism. En: Feldman EC, Nelson RW, editors. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3a ed, St. Louis (MO): Saunders; 219–49.
- 28) Feldman y Nelson. (2007). *Endocrinología y Reproducción Canina y Felina*. En *Neoplasias tiroideas e Hipertiroidismo en caninos*. 3ª ed. editorial Intermedica, 5:244-278.
- 29) Fenwick, M.A., Fitzpatrick, R., Kenny, D.A., Diskin, M.G., Patton, J., Murphy, J.J., Wathes, D.C., (2008), Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol* 34: 31-44.
- 30) Flint, A.P., Sheldrick, E.L., Fisher, P.A., (2002), Ligand-independent activation of steroid receptors. *Domest Anim Endocrinol* 23: 13-24.
- 31) Francis-Lang H, Price M, Policarpou-Schwarz M, Di Lauro R. (1992) The promoter of thyroperoxidase gene indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.*;12:576-588.
- 32) García, B., Santisteban, P. (2002). PI3K is involved in the IGF-1 inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression. *Mol Endocrinol* 16(2):342-52.
- 33) Gomez, J.M., Maravall, F.J., Gomez, N., Guma, A., Casamitjana, R., Soler, J., (2002), Pituitary-thyroid axis, thyroid volume and leptin in healthy adults. *Horm Metab Res* 34:67-71.
- 34) Gonzalez, E.P., Carmona, C.A., Araya, Q.A., Miranda, F.K., Massardo, V.T., Jimenez, R.B., Jaimovich, F.R., Gatica, R.H., (2008), Normal <sup>131</sup>iodine uptake values at 2 and 24 hours. *Rev Med Chil* 136:1288-1293.



- 35) Guazzi, S., Price, M., De Felice, M., Damante, G., Mattei, M.G. & Di Lauro, R. (1990) Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO*, 9: 3631–3639.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) Jeglum KA, Wreat A. (1983) Chemotherapy of canine thyroid carcinoma. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian*; 5:96–8.
- 39) 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.
- 40) Katoh, R., Kawaoi, A., Miyagi, E., Li, X., Suzuki, K., Nakamura, Y., Kakudo, K., (2000) Thyroid transcription factor-1 in normal, hyperplastic, and neoplastic follicular thyroid cells examined by immunohistochemistry and nonradioactive in situ hybridization. *Mod Pathol* 13: 570-576.
- 41) Kent MS, Griffery SM, Verstraete FJM, (2002) Computer-assisted image analysis of neovascularization in thyroid neoplasms from dogs. *Am J Vet Res*; 63:363–9.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) Lacroix, L., Nocera, M., Mian, C., Caillou, B., Virion, A., Dupuy, C., Filetti, S., Bidart, J.M. & Schlumberger, M. (2001) Expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase flavoprotein DUOX genes and proteins in human papillary and follicular thyroid carcinomas. *11:1017–1023*.
- 45) Lacroix, L., Michiels, S., Mian, C., Arturi, F., Caillou, B., Filetti, S., Schlumberger, M., Bidart, J.M., (2006), HEX, PAX-8 and TTF-1 gene expression in human thyroid tissues: a comparative analysis with other genes involved in iodide metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64: 398-404.
- 46) Larsen PR, Berry MJ. (1994) Type I iodothyronine deiodinase: unexpected complexities in a simple deiodination reaction. *Thyroid*. Fall;4(3):357-62.
- 47) Lazar, V., Bidart, J.M., Caillou, B., Mahe, C., Lacroix, L., Filetti, S. & Schlumberger, M. (1999) Expression of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84: 3228–3234.
- 48) 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.
- 49) Leblanc, B., Parodi, A.L., Lagadic, M., Hurtrel, M., Jobit, C., (1991), Immunocytochemistry of canine thyroid tumors. *Vet Pathol* 28: 370-380.
- 50) Lehninger. (2000). *Principios de Bioquímica*. Eds: Nelson DL, Cox MN. Tercera Edición. Freeman and Company, New York, NY and Basingstoke.
- 51) Liptak, J.M., (2007) Canine thyroid carcinoma. *Clin Tech Small Anim Pract* 22: 75-81.
- 52) Livak, K.J., Schmittgen, T.D., (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.

- 53) Lurye, J.C., Behrend, E.N., (2001) Endocrine tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 31: 1083-1110.
- 54) Maenhaut C, Brabant G, Vassart G, Dumont E. (1992) In Vitro and in Vivo Regulation of Thyrotropin Receptor mRNA Levels in Dogs and Human Thyroid Cells. *J. Biol. Chem.*, 267: 3000-3007.
- 55) Manole, D., Schildknecht, B., Gosnell, B., Adams, E., Derwahl, M., (2001) Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1072-1077.
- 56) 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.
- 57) Mayayo E, Santisteban P, Vincens-Calvet E. (2000) Patología Tiroidea fetal y neonatal. En: Argente Olivers J, Carrascosa Lezcano A, García Bouthelier R, Rodríguez Hierro F. *Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia* 2ª ed. Barcelona: Doyma; 647-700.
- 58) Medeiros-Neto G, Knobel M, DeGroot LJ. (2002) Genetic disorders of the thyroid hormone system. In: Baxter JD, (eds). *Genetics in Endocrinology*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 375-402.
- 59) Medina, D.L., Santisteban, P. (2000) Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems. *Eur J Endocrinol* 143: 161-178.
- 60) Medina, D.L., Suzuki, K., Pietrarello, M., Okajima, F., Kohn, L.D., Santisteban, P., (2000) Role of insulin and serum on thyrotropin regulation of thyroid transcription factor-1 and pax-8 genes expression in FRTL-5 thyroid cells. *Thyroid* 10: 295-303.
- 61) Meikle, A., Bielli, A., Masironi, B., Pedrana, G., Wang, H., Forsberg, M., Sahlin, L., (2000) An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reprod Nutr Dev* 40: 587-596.
- 62) Mitchell, P.J., Tjian, R., (1989), Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-378.
- 63) Mooney, C. T. (2007) Hipertiroidismo. En Ettinger SJ, Feldman EC (eds): *Medicina Interna Veterinaria: Enfermedades del perro y el gato* 6a ed. España, Elsevier, 1558-1560.
- 64) Moore, F.M., Kledzik, G.S., Wolfe, H.J., DeLellis, R.A. (1984) Thyroglobulin and calcitonin immunoreactivity in canine thyroid carcinomas. *Vet Pathol* 21: 168-173.
- 65) Moretti, F., Nanni, S., Pontecorvi, A., (2000) Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14: 517-539.
- 66) Naderi, A., Ahmed, A.A., Barbosa-Morais, N.L., Aparicio, S., Brenton, J.D., Caldas, C. (2004) Expression microarray reproducibility is improved by optimising purification steps in RNA amplification and labelling. *BMC Genomics* 5, 9.
- 67) Nelson RW. (1998) Disorders of the thyroid gland. En: Nelson RW, Couto CG. *Small Animal Internal Medicine*. St. Louis: Mosby; 729-732.
- 68) 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.
- 69) Ogilvie GK (1996) Tumors of the endocrine system. En Whithrow SJ, MacEwan EG (eds): *Small Animal Clinical Oncology*, 2a ed. WB Saunders. Philadelphia, 310.
- 70) Panciera DL, Lanz OI, Vail DM. (2004) Treating thyroid and parathyroid neoplasia in dogs and cats. *Vet Med* 99: 154.

- 71) Pasca di Magliano, M., Di Lauro, R., Zannini, M., (2000) Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13144-13149.
- 72) 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.
- 73) Peterson, M.; Ferguson, D. (1992) Tiropatías. En Ettinger, S (ed): *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*. 3a Ed. Inter-vet, Buenos Aires, 1716-1725.
- 74) Pfaffl, M.W., Georgieva, T.M., Georgiev, I.P., Ontsouka, E., Hageleit, M., Blum, J.W., (2002) Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domest Anim Endocrinol* 22: 91-102.
- 75) Pisarev M. A., Juvenal G. (2010) Cáncer de Tiroides: Aspectos Moleculares y Nuevas Terapias. En *Separata Montpellier 2010 - Vol. 18 N°3*.
- 76) Plachov, D., Chowdhury, K, Walther, C., Simon, D., Guenet, J. I., and Gruss, P. (1990). Pax8, a murine paired box expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development (Camb.)*, 110: 643-651,
- 77) Pocock, G., Richards, C.D. (2005) Regulación hormonal del organismo. En *Fisiología Humana: La base de la Medicina*. Elseiver, España, 229-230.
- 78) 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.
- 79) Rivas, M., Santisteban, P. (2003) TSH-activated signaling pathways in thyroid tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol* 213: 31-45.
- 80) Rivolta, C.M., Moya, C.M., Esperante, S.A., Gutnisky, V.J., Varela, V., Targovnik, H.M. (2005). The thyroid as a model for molecular mechanisms in genetic diseases. *Medicina (B Aires)* 65: 257-267.
- 81) Roger, P.P., Dumont, J.E. (1987) Thyrotropin is a potent growth factor for normal human thyroid cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 149: 707-711.
- 82) Santisteban, P. Mecanismos moleculares implicados en la función tiroidea. En *Edocrinología*, Arce, Victor M, Catalina Pablo F, Mallo Federico. Universidad de Santiago de Compostella, Universidad de Vigo, 161-168.
- 83) Scavelli T.D., Peterson M.E. (1992) The thyroid. In Slatter D (ed): *Textbook of Small Animal Surgery*, 2a ed. WB Saunders, Philadelphia, 1514.
- 84) Schams, D., Kohlenberg, S., Amselgruber, W., Berisha, B., Pfaffl, M.W., Sinowatz, F. (2003) Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J Endocrinol* 177: 305-317.
- 85) Sosa, C., Abecia, J.A., Carriquiry, M., Vazquez, M.I., Fernandez-Foren, A., Talmon, M., Forcada, F., Meikle, A., (2009) Effect of undernutrition on the uterine environment during maternal recognition of pregnancy in sheep. *Reprod Fertil Dev* 21: 869-881.
- 86) Sosa, C., Gonzalez-Bulnes, A., Abecia, J.A., Forcada, F., Meikle, A. (2010) Short-term undernutrition affects final development of ovulatory follicles in sheep synchronized for ovulation. *Reprod Domest Anim* 45: 1033-1038.
- 87) Turrel, J.M., McEntee, M.C., Burke, B.P., Page, R.L., (2006), Sodium iodide I 131 treatment of dogs with nonresectable thyroid tumors: 39 cases (1990-2003). *J Am Vet Med Assoc* 229: 542-548.

- 88) Van Renterghem, P., Vassart, G., Christophe, D. (1996) Pax 8 expression in primary cultured dog thyrocyte is increased by cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta* 1307: 97-103.
- 89) Verschueren, C. (1992) Thyroid cancer research in the dog: anno 1992. *Tijdschr Diergeneeskde* 117 Suppl 1: 26S-27S.
- 90) 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.
- 91) Worth AT, Zuber RM, Hockin M. (2005) Radioiodide (<sup>131</sup>I) therapy for the treatment of canine thyroid carcinoma. *Aust Vet J*;83:208–14.
- 92) Wu SH, Weber WJ, Chester-Jones H, Hansen LB, Crooker BA. (2004) Effects of intake, selection for milk yield, and bST administration on hepatic expression of insulin receptors and components of the somatotrophic axis in growing Holstein heifers. *J Dairy Sci.*; 87: (Suppl. 1) 364 Abstract W 205.
- 93) Zannini, M., Francis-Lang, H., Plachov, D., Di Lauro, R. (1992) Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol Cell Biol* 12: 4230-4241.
- 94) Zarrilli, R., Formisano, S., Di Jeso, B. (1990) Hormonal regulation of thyroid peroxidase in normal and transformed rat thyroid cells. *Mol Endocrinol* 4:39-45.

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

**Pessina, P.<sup>a\*</sup>, Castillo, V.<sup>b</sup>, Araújo, M.<sup>a</sup>, Carriquiry M<sup>c</sup>, Meikle, A.<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Laboratory of Nuclear Techniques, Veterinary Faculty, Lasplaces 1550, 11600, Montevideo, Uruguay.

<sup>b</sup>Area Clínica Médica Pequeños Animales, U. Endocrinología, Htal. Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

<sup>c</sup>Animal Production Department, Agronomy Faculty, Garzon 2382, Montevideo, Uruguay.

\*Corresponding autor: Tel/Fax: 00598-26223106, E-mail: [ppessina@hotmail.com](mailto:ppessina@hotmail.com)

**Abstract**

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

**Keywords:** thyroid carcinoma, gene expression, canine.

## 1. Introduction

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

Carcinomas of the thyroid gland in dogs usually arise from the epithelial cells that line the colloid follicles and may be classified according to the degree of differentiation. In humans, differentiated carcinomas such as the papillary and the follicular, retain in part the biological features of the normal thyroid cells (Rossella *et al.*, 1994). Similarly, in dogs, Thyrotropin (TSH) binding in canine thyroid carcinoma did not differ from that in normal canine thyroid tissue (Verschueren *et al.*, 1992), and the authors suggested that TSH may continue to act as a growth factor for the tumor. In canine thyroid cells, insulin like growth factor I (IGF-I) allow the mitogenic effect of *TSH* and stimulate by itself protein synthesis and cell growth (Deleu *et al.*, 1999). Besides, TSH is considered the main regulator of thyrocyte differentiation and proliferation (Rivas and Santisteban, 2003) and it has been clearly demonstrated that TSH regulates mRNA levels of several thyroid-specific genes such as thyroglobulin (*Tg*) and thyroperoxidase (*TPO*) (Avvedimento *et al.*, 1984; Gérard *et al.*, 1989b; Zarrilli *et al.*, 1990).

The molecular mechanism by which TSH controls *Tg* and *TPO* gene expression, and the potential involvement of the transcription factors which are known to bind to their promoter

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

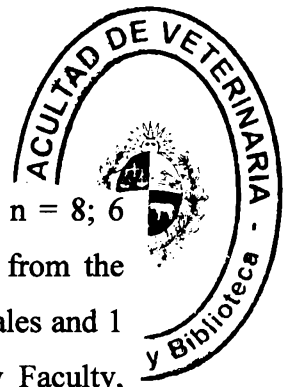
In this study we aimed to investigate the expression of thyroid specific genes in carcinoma and healthy thyroid gland. Moreover, taking into account that most dogs with carcinoma are described as clinically euthyroid (Liptak, 2007), we hypothesized that the healthy thyroid lobule functions in a compensatory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

## **2. Materials and methods**

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

### *2.1 Tissue and blood samples*

Tissue samples selected were as follows: normal thyroid tissue specimens were obtained from healthy animals euthanized after suffering severe trauma (Healthy group, n = 7; 3 intact



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

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

### *2.2 Plasma TSH and *ft*4 (free thyroxine) concentrations*

Hormonal determination was performed only in the pathological cases. Plasma TSH concentrations were determined by an immunoradiometric assay (IRMA) using DPC commercial kits (Coat-A-Count; Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA). The sensitivity of the assay was 0.03 ng/mL. The intra-assay coefficient of variation for low (0.26 ng/mL) and high (3.1 ng/mL) concentrations of TSH were 9.5% and 2%, respectively. Free thyroxine concentrations were determined by a direct solid-phase radioimmunoassay (RIA) using DPC commercial kits. The RIA had a sensitivity of 0.01 ng/dL. The intra-assay coefficients of variation for low (0.2 ng/dL) and high controls (3.9 ng/dL) were 8.5% and 4.1%, respectively.

### *2.3 RNA isolation and reverse transcription*

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



## 2.4 Quantitative real time PCR

Since two splicing variants of dog Pax 8 (*PAX-8a* *PAX-8g*) were described (Van Renterghem *et al.*, 1996), both of them were determined. Primers to specifically amplify cDNA of *TSH-R*, *Tg*, *TPO*, *PAX-8a*, *PAX-8g* and *TTF-1*, were designed based on *canis lupus familiaris* nucleotide sequences available from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Primer sequences for *ERα* and *IGF-I* were obtained from the literature (Pfaffl *et al.*, 2002; Schams *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). The products of PCR were sent to Macrogen (Korea) for sequencing. The identity of the sequences were confirmed by Blast in the Gene Bank. The primer sequences are presented in Table 2. The level of expression of ribosomal protein L19 (*RPL19*) was used as an endogenous control, using the primer sequences of Chen *et al.* (2006). The expression of the *RPL19* gene was tested in a pilot study under our conditions and it proved to be a good housekeeping gene because it exhibited minimum variation across individuals and treatments, as was shown in other ovine tissues previously (Sosa *et al.*, 2009a; Sosa *et al.*, 2009b). As is shown in the Figure 1, data of cycles to the threshold (CT) did not differ among groups. Amplification reactions were performed in a final volume of 20 μL containing 10 μL SYBR Green master mix (Quantimix EASY SYG kit; Biotools BandM Laboratories, Madrid, Spain), 500 nm forward and reverse primers (Operon Biotechnologies, Cologne, Germany) and 3 μL diluted cDNA (1 : 7.5 in RNase/DNase-free water). Samples were analysed in duplicate in a 72-disk Rotor- Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, NSW, Australia). Standard amplification conditions were 10 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 95°C, 45 s at 60°C and 20 s at 72°C. For quantification, standard curves were generated by amplifying serial dilutions of each amplicon according to Fenwick *et al.* (2006). To standardise quantitative gene expression measurements for differences in cellular input, RNA quality and RT efficiency among samples, data for gene expression were analysed by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, which implies normalisation against the endogenous control (*RPL19*; Livak and Schmittgen (2001).

## 2.5 Statistical analysis

Data were analyzed in a incomplete randomized block design with the Statistical Analysis System program (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Univariate analyses of the data were

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

### 3. Results

#### 3.1 Gender effect on gene transcription in the healthy animals

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.3 Correlation analysis

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

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

## 4. Discussion

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

TSH is considered the main regulator of thyrocyte differentiation and proliferation (Rivas and Santisteban, 2003) and it was suggested that TSH may continue to act as a growth factor for

the tumor (Verschuere *et al.*, 1992). The origin of all tumors was follicular; which is in agreement with most reports in dogs (Ramos-Vara *et al.*, 2002; Barber, 2007). Although, messenger expression of the receptor may not always reflect the actual protein tissue expression as we have found previously in sheep (Meikle *et al.* 2000, Sosa *et al.* 2009a), and that several post-transcriptional events may alter protein expression, no differences were found in *TSH-R* mRNA expression among healthy, carcinoma and contralateral lobule (CL) groups. This is in agreement with Verschuere *et al.* (1992), that characterized TSH-receptor binding in normal thyroid tissues and thyroid neoplasms in dogs. It has been clearly demonstrated that *TSH* regulates mRNA levels of several thyroid-specific genes such as *Tg* and *TPO*. In contrast to *TSH-R* mRNA results, *Tg* and *TPO* mRNA expression were lower in the carcinoma group than in healthy animals and CL groups, suggesting that the synthesis of the thyroid hormones by the carcinoma tissue is diminished. In dogs, while no reports on *TPO* in thyroid carcinoma were found, several reports are consistently showing that *Tg* is detected in 90–100% of the thyroid carcinomas (Moore *et al.*, 1984; Patnaik *et al.*, 1991; Leblanc *et al.*, 1991). This discrepancy could be due to the fact that these latter studies determined *Tg* protein, while we measure the transcript. In contrast, in humans, both *Tg* and *TPO* gene expression in differentiated carcinomas was highly heterogeneous (Fabbro *et al.*, 1994).

*Tg* and *TPO* genes are regulated by two transcription factors, *TTF-1* and *PAX 8* that are present together only in the thyroid follicular cell, suggesting that this unique combination could play a role in the expression of the thyroid –specific phenotype (Fabbro *et al.*, 1994). Although this study considered a small number of animals, one of the most interesting findings of this study was the almost 3-fold increase in *TTF-1* expression in the contralateral thyroid lobule when compared to the healthy and carcinoma group. *TTF-1* is considered a mitogenic factor involved in proliferation and cell differentiation (Ramos-Vara *et al.*, 2002; Lacroix *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2009), thus, it can be speculated that this increased expression in the contralateral lobe could be associated to hyperplasia to compensate the loss of function of the sick lobe, in order to maintain the euthyroid state. Moreover, this idea is reinforced by the low *Tg* and *TPO* mRNA expression in the carcinoma tissue, which suggest a dysfunction of the affected lobe to synthesize thyroid hormones. Overall, mRNA expression data from both the carcinoma and contralateral lobe may explain why in 7 out of 8 of the dogs with thyroid carcinoma in this study presented TSH and fT4 values within the normal range, as has been reported for the majority of dogs (Barber, 2007; Nelson, 1998). On the other hand, a smaller percentage of the dogs with thyroid carcinoma present hypothyroidism - as

one of the dogs of this study-; in these cases an altered gene expression of the healthy lobe can be proposed, since it has been demonstrated that is inhibited by cytokines released by the diseased lobe (Dumont *et al.*, 1991; Cocks *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2001; Zubelewicz *et al.*, 2002). Besides, unlike thyroid tumors in the cat, which are typically functional, 90% of the canine thyroid tumors do not secrete excess thyroid hormones (Nelson, 1998).

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

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

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

### **Acknowledgments**

This study was financed by the Laboratory of Nuclear Techniques, Veterinary Faculty, Uruguay. We want to thank to Dr. Pablo Hall, for all surgeries and thyroid biopsies. The

authors are grateful to MSc Paula Nicolini for technical advice, and Dr. Maria Fernanda Cabrera Blatter and Dr. Maria Florencia Galelli for their collaboration.

## References

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

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

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

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

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

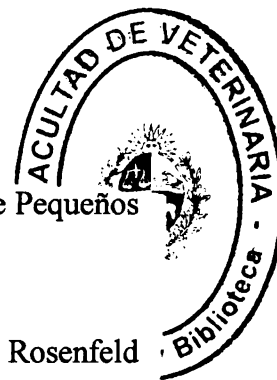
Birchard SJ, Roesel OF. Neoplasia of the thyroid gland in the dogs. A retrospective study of 16 cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1981;17:369-372.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Gérard CM, Lefort A, Christophe D, Libert F, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Control of thyroperoxydase and thyroglobulin transcription by cAMP: evidence for distinct regulatory mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 1989b;3:2110-2118.
- Gómez JM, Maravall FJ, Gómez N, Gumà A, Casamitjana R, Soler J. Pituitary-thyroid axis, thyroid volume and leptin in healthy adults. *Horm Metab Res.* 2002;34(2):67-71.
- González EP, Carmona C AR, Araya Q AV, Miranda FK, Massardo VT, Jiménez RB, Jaimovich FR, Gatica RH. Normal <sup>131</sup>iodine uptake values at 2 and 24 hours. *Rev Med Chil.* 2008;136(10):1288-1293.
- Harari J, Patterson JS, Rosenthal RC. Clinical and pathologic features of thyroid tumors in 26 dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;188:1160-1164.
- Henderson BE, Ross RK, Casangrande JT. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res.* 1982;42(8):3232-3239.
- Katoh R, Kawaoi A, Miyagi E, Li X, Suzuki K, Nakamura Y, Kakudo K. Thyroid transcription factor-1 in normal, hyperplastic, and neoplastic follicular thyroid cells examined by immunohistochemistry and nonradioactive in situ hybridization. *Mod Pathol.* 2000;13(5):570-576.
- Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J.E., Roger, P.P. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr. Rev.* 2001;22:631-656.
- Kondo T, Nakazawa T, Niu D, Mochizuki K, Kawasaki T, Nakamura N, Yamane T, Kobayashi M, Katoh R. Epigenetic silencing of TTF-1/NKX2-1 through DNA hypermethylation and histone H3 modulation in thyroid carcinomas. *Lab Invest.* 2009;89(7):791-799.
- Lacroix L, Michiels S, Mian C, Arturi F, Caillou B, Filetti S, Schlumberger M, Bidart J. HEX, PAX-8 and TTF-1 gene expression in human thyroid tissues: a comparative analysis wuth other genes involved in iodide metabolism. *Clinical Endocrinology.* 2006; 64:398-404.



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Tables

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

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

<sup>a</sup>Sex, F = female, M = male.

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

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

<sup>a</sup>TSH-R = thyrotropin receptor, Tg = thyroglobulin, TPO = thyroperoxidase, TTF-1 = thyroid transcription factor, PAX8-a = paired box gene 8, PAX8-g = paired box gene 8, IGF-1 = insulin-like growth factor, Era = estrogen receptor  $\alpha$ , RPL19 = ribosomal protein L19.

<sup>b</sup>Gene Bank sequences.

## Figure captions

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

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

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

Figure 1

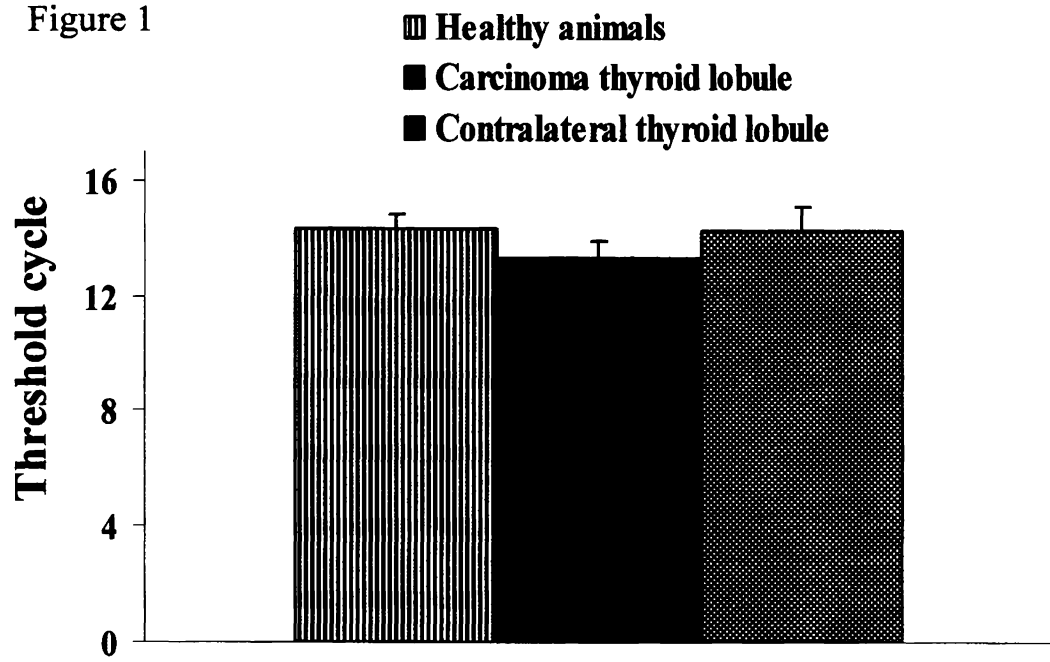


Figure 2

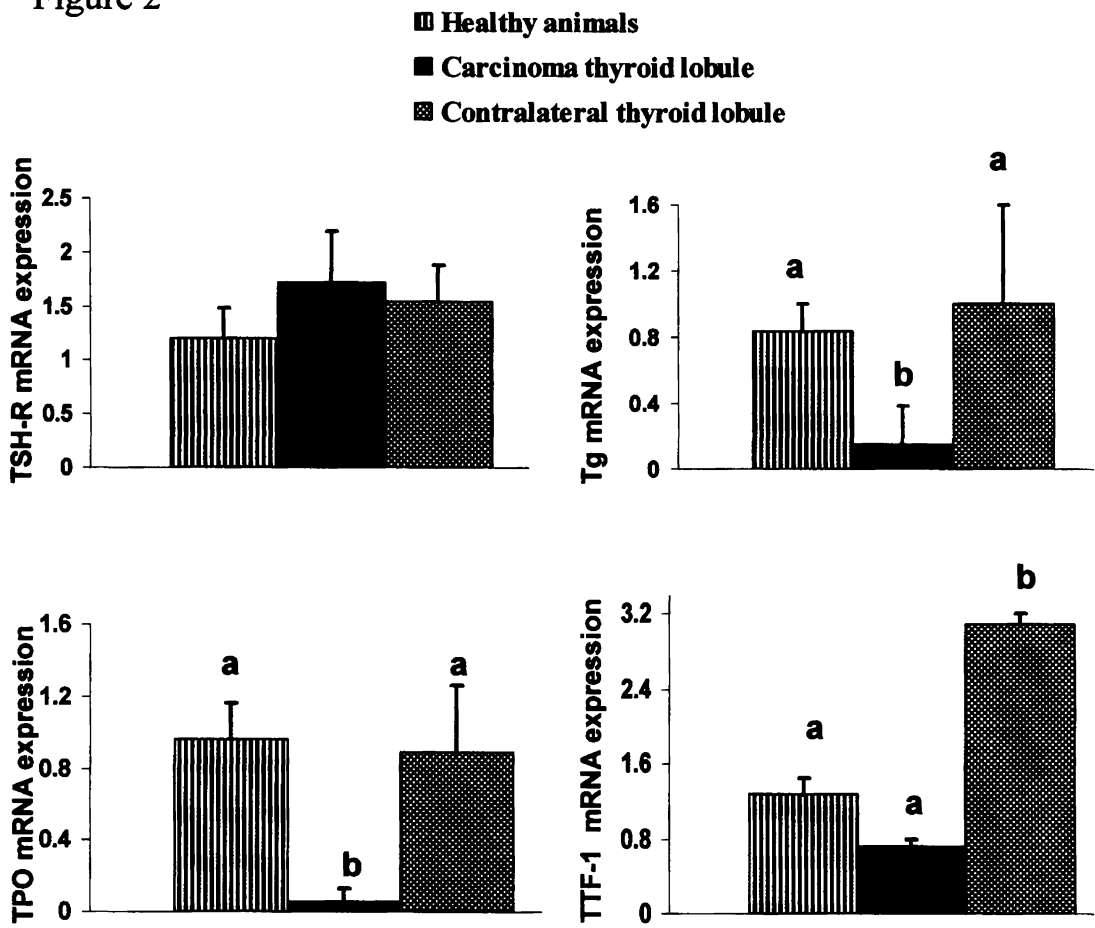




Figure 3

▨ Healthy animals  
■ Carcinoma thyroid lobule  
▩ Contralateral thyroid lobule

