

tesis doctoral

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO

Departamento
de Cirugía
Facultad de
Medicina

Naturaleza de los nidos sólidos del tejido tiroideo
Dña. M^a Dolores Martínez de Olcoz Cerdán 2012

Dña. M^a Dolores Martínez
de Olcoz Cerdán

Sevilla 2012



UNIVERSIDAD DE SEVILLA


**NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL
TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL**

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán
Sevilla, 2012



Departamento de Cirugía
Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara una gota”

Madre Teresa de Calcuta (1910-1997)

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

**DON HUGO GALERA RUIZ, PROFESOR TITULAR DE OTORRINOLARINGOLOGÍA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.**

CERTIFICA:

Que bajo su dirección ha sido realizado el trabajo titulado: **“NATURALEZA DE LOS NIDOS SOLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO”**, por **Doña MARIA DOLORES MARTÍNEZ DE OLCOZ CERDÁN**, para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Revisado el presente trabajo, queda conforme con su presentación para ser juzgado.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Sevilla, a veintiuno de Mayo de dos mil doce.

Fdo.: Prof. Dr. Hugo Galera Ruiz

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

**DOÑA MARÍA JOSÉ RÍOS MORENO, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA Y
PROFRA. ASOCIADA DEL DPTO. DE CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA NORMAL Y
PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.**

CERTIFICA:

Que bajo su dirección, ha sido realizado el trabajo de investigación titulado:
“NATURALEZA DE LOS NIDOS SOLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO”, por Doña
MARIA DOLORES MARTÍNEZ DE OLCOZ CERDÁN, para optar al Grado de
Doctor en Medicina y Cirugía.

Revisado el presente trabajo, queda conforme con su presentación para ser
juzgado.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Sevilla, a veintiuno
de Mayo de dos mil doce.

Fdo.: Dra. María José Ríos Moreno

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. D. Hugo Galera Ruiz, Profesor Titular de Otorrinolaringología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, por su entrega y apoyo constante en la realización de este trabajo.

A la Dra. María José Ríos Moreno, Profesora Asociada del Dpto. de Citología e Histología Normal y Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, porque su esfuerzo ha sido enorme, su paciencia infinita y sus observaciones siempre acertadas.

Expreso mi gratitud sincera a todos los miembros del Dpto. de Citología e Histología Normal y Patológica de la Facultad de Medicina, de Sevilla, que de una forma u otra han contribuido a la consecución de este trabajo de Tesis Doctoral. Han sido tantos, y su contribución tan valiosa, que su enumeración sería muy extensa.

A Don José Antonio Navas Martín, sabio de las nuevas tecnologías que con su contribución ha conseguido hacer más atractivo el contenido de esta Tesis.

A todos aquellos que contribuyeron al mejor conocimiento de la glándula tiroidea, que juega un papel protagonista en el control del metabolismo del cuerpo humano y cuya disfunción nos acelera o desacelera. Han sido tantas y tan valiosas las aportaciones de investigadores y clínicos que han participado en revelar su idiosincrasia que mi trabajo de tesis solo aspira a un fin honesto, la consecución del grado de doctor.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

Por último, no quisiera dejar de mencionar a tres personas que han influido en mi trabajo especialmente durante esta etapa de elaboración de Tesis, los Profesores Galera Davidson y De Miguel Rodríguez.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

A mi familia y mis hijos,
lo mejor que me ha pasado en la vida.

A mis padres Pepe y Lola,
por sus enseñanzas y su constante apoyo y cariño.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

INDICE

I INTRODUCCIÓN

- 01.** RESEÑA ANÁTOMO-FUNCIONAL DE LA GLÁNDULA TIROIDEA
- 02.** CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA
 - 2.1.** MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN Y DESARROLLO TIROIDEO
 - 2.2.** CÉLULAS PROGENITORAS/MADRE TIROIDEAS PROVENIENTES DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS
 - 2.3.** CÉLULAS PROGENITORAS/MADRE TIROIDEAS EN LA GLÁNDULA TIROIDEA EN ADULTOS
 - 2.4.** OTRAS FUENTES DE CÉLULAS PROGENITORAS/MADRE TIROIDEAS EN EL TIROIDES
 - 2.4.1.** MÉDULA ÓSEA
 - 2.4.2.** MICROQUIMERISMO
 - 2.4.3.** NIDOS CELULARES DERIVADOS DE RESTOS EMBRIONARIOS
- 03.** CÉLULAS MADRE Y CÁNCER DE TIROIDES
 - 3.1.** CÉLULAS MADRE EN TEJIDOS TIROIDEOS BENIGNOS Y MALIGNOS, Y LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA TIROIDEO
 - 3.2.** SEÑALIZACIÓN IGF EN CÁNCER DE TIROIDES Y CSCs DERIVADAS DE CARCINOMAS PAPILARES

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

- 3.3. CONCEPTOS EMERGENTES EN LA CARCINOGENÉISIS DEL TIROIDES: RECONCILIACIÓN CON LA HIPOTÉISIS CARCINOGENÉISIS TIROIDEA EN VARIAS ETAPAS CON EL MODELO DE CSC
- 3.4. POTENCIAL METASTÁSICO DE CSCs
- 3.5. POSIBLE PAPEL DE LOS SCNs EN EL CÁNCER DE TIROIDES
- 3.6. CSCs DERIVADAS DE CÁNCER DE TIROIDES: IMPLICACIONES CLÍNICAS Y PERSPECTIVAS

II PLANTEAMIENTO DEL TEMA

III MATERIAL Y MÉTODOS

- 01. TIPO DE ESTUDIO
- 02. POBLACIÓN ESTUDIADA Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS
- 03. ESTUDIO HISTOLÓGICO
- 04. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO
 - 4.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA
 - 4.2. PRETRATAMIENTO
 - 4.3. TÉCNICA
 - 4.4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS
- 05. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

II PLANTEAMIENTO DEL TEMA

IV RESULTADOS

01. ESTUDIO HISTOLÓGICO Y CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS
02. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

V DISCUSIÓN

VI CONCLUSIONES

VII BIBLIOGRAFÍA

* ANEXOS

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

ABREVIATURAS

ABCG2 o CDw338 (grupo de diferenciación w338): gen que codifica una proteína asociada a la membrana y que participa en el transporte intra y extracelular de diferentes moléculas.

ARN: ácido ribonucleico.

CCE: células de carcinoma embrionario.

CD117 o c-kit: proteína que en los seres humanos está codificada por el gen KIT y que es el vástago del receptor para el factor de células madre.

CD: molécula de adhesión.

CER1 o cerberus: gen que codifica una citoquina miembro de la superfamilia del nudo cisteína y que es un inhibidor de la vía de señalización de TGF beta secretada durante la fase de gastrulación de la embriogénesis.

CK: citoqueratina.

CT: calcitonina.

DIT: diiodotirosina.

EB: embrioblasto.

EGF: factor de crecimiento de la epidermis.

ES: células pluripotentes embrionarias.

FACS: células fluorescentes activadas.

FGF: factor de crecimiento de los fibroblastos.

Fgfr: receptor para el factor de crecimiento de los fibroblastos.

GAL: galectina.

GATA: activador transcripcional.

GFP: proteína fluorescente verde.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

ABREVIATURAS

- Hhex:** gen que codifica un miembro de la familia de factores de transcripción homeobox, muchos de los cuales están involucrados en los procesos de desarrollo. Su expresión en específicos linajes hematopoyéticos sugiere que puede jugar un papel en la diferenciación hematopoyética.
- Hnf4 α (Foxa1):** factor nuclear hepático alfa 4.
- Hnf4 β (Foxa2):** factor nuclear hepático beta 4.
- IGF:** factor de crecimiento insulínico.
- IHC:** inmunohistoquímica.
- JCEM:** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.
- MIT:** monoyodotirosina.
- MAPK:** proteínas quinasas activadas por mitógenos.
- Nanog:** gen que codifica un factor de transcripción implicado con la auto-renovación de células madre embrionarias no diferenciadas.
- NIS:** contranportador de sodio/yoduro.
- OCT4:** factor de transcripción unido al octámero 4.
- PAS:** schiff ácido positivo.
- PAX8:** gen que codifica proteínas involucradas en el desarrollo de células foliculares tiroideas y la expresión de genes específicos de la tiroides. Sus mutaciones se han asociado con disgenesia tiroidea, carcinomas foliculares y adenomas foliculares atípicos.
- PBS:** solución salina tamponada con fosfato.
- PTCs:** células paratroideas.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

ABREVIATURAS

- Rex-1:** gen presente en las células germinales y los linajes de células no diferenciadas, por lo que se trata de un marcador importante de células madre.
- SALL4:** marcador de células madre.
- Sca1:** antígeno para células madre.
- SCID:** inmunodeficiencia combinada severa.
- SCNs:** nidos sólidos celulares.
- Sox17:** gen que codifica a una serie de factores de transcripción implicados en la regulación del desarrollo embrionario y en la determinación del destino celular.
- T4:** tiroxina.
- TAZ:** coactivador transcripcional con el motivo de unión a PDZ, un regulador transcripcional de los genes PAX8 y TTF-1
- TG:** tiroglobulina.
- TPO:** peroxidasa tiroidea.
- TSH:** hormona estimulante del tiroides.
- TSHR:** receptor de TSH.
- TTF-1:** factor de transcripción tiroideo.
- UBB:** cuerpo ultimobranquial.

1

**RESEÑA ANÁTOMO-FUNCIONAL
DE LA GLÁNDULA TIROIDEA**

La tiroides es una glándula endocrina de origen ectodérmico que se desarrolla precozmente en la porción cefálica del tubo digestivo. Su función consiste en sintetizar las hormonas tiroxina (T4) y triiodotironina (T3), que controlan la tasa metabólica del organismo. Se hallan en la región cervical, anterior a la laringe, y está constituida por dos lóbulos unidos por un istmo.

Esta glándula está integrada por miles de folículos tiroideos, que son pequeñas esferas que miden en el hombre de 0,2 a 0,9 mm de diámetro. Los folículos están formados por epitelio simple y su cavidad contiene una sustancia gelatinosa llamada coloide. Las células de los folículos varían de aplanadas a columnares y los folículos muestran diámetros muy variables. El aspecto de los folículos tiroideos varía dependiendo de la región de la glándula y de su actividad funcional. En una misma glándula hallamos folículos grandes, llenos de coloide y formados por epitelio cúbico o pavimentoso, al lado de folículos más pequeños con epitelio columnar. A pesar de esta variabilidad, cuando la altura media del epitelio es baja la glándula se considera hipoactiva. En cambio, cuando hay mucha hormona tirotrópica circulante aumenta muy notablemente la altura del epitelio folicular y la glándula está hiperactiva. Esta alteración se acompaña de un descenso de la cantidad de coloide y del diámetro de los folículos. La glándula está recubierta por una cápsula de tejido conjuntivo laxo de la que salen tabiques hacia el parénquima, los cuales se hacen gradualmente más delgados. Los folículos están separados entre sí principalmente por las fibras reticulares. La glándula tiroidea es un órgano

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESEÑA
ANÁTOMO-FUNCIONAL
DE LA GLÁNDULA
TIROIDEA

sumamente vascularizado por una extensa red de capilares sanguíneos y de vasos linfáticos que rodea a los folículos. Las células endoteliales de estos vasos capilares están fenestradas, como es frecuente también en otras glándulas endocrinas. Esta configuración facilita el transporte de sustancias entre las células endocrinas y la sangre.

Las células epiteliales de los folículos tiroideos se sustentan sobre una lámina basal y muestran todas las características de las células que simultáneamente sintetizan, secretan, absorben y digieren proteínas. Su porción basal es rica en retículo endoplasmático rugoso y contiene una cantidad moderada de mitocondrias. El núcleo es generalmente esférico y se sitúa en el centro de la célula. En la porción supranuclear hay una zona de Golgi y gránulos de secreción cuyo contenido es similar al coloide folicular. En esta región existen también lisosomas y algunas vacuolas generalmente grandes de contenido claro. La membrana plasmática de la región apical de las células contiene un número moderado de microvilli.

Otro tipo de célula, la célula parafolicular o célula C, se encuentra en el tiroides, formando pequeñas agrupaciones aisladas entre los folículos tiroideos. Poseen una pequeña cantidad de retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias alargadas y un complejo de Golgi grande. La característica más notable de estas células es la presencia de numerosos gránulos que miden 100-180nm de diámetro. Estos gránulos contienen una hormona llamada calcitonina, sintetizada por ellas y cuyo efecto principal es disminuir la concentración plasmática de calcio por medio de una inhibición de la

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESEÑA
ANÁTOMO-FUNCIONAL
DE LA GLÁNDULA
TIROIDEA

reabsorción ósea. La secreción de calcitonina se activa al aumentar la concentración plasmática de calcio (Junqueira y Carneiro, 2005).

La glándula tiroidea es la única glándula endocrina que acumula su producto de secreción en una cantidad considerable. Esta acumulación se efectúa en el coloide y se calcula que en el hombre existe dentro de los folículos una cantidad suficiente de hormona para aproximadamente tres meses. El coloide tiroideo está constituido principalmente por una glicoproteína de alto peso molecular (600 kDa), denominada tiroglobulina. La tiroglobulina es PAS-positiva debido a su elevado contenido en hidratos de carbono.

El principal mecanismo regulador del estado estructural y funcional de la glándula tiroidea es la hormona tirotrópica (TSH o tirotropina) secretada por la pars distalis de la hipófisis.

La membrana de la porción basal de las células foliculares es rica en receptores para la tirotropina. La TSH estimula todas las fases de la producción de hormonas de la tiroidea, las cuales, a su vez, inhiben la síntesis de TSH, creando un equilibrio que mantiene el organismo con cantidades adecuadas de tiroxina y triyodotironina. La secreción de tirotropina aumenta con la exposición al frío y disminuye con el calor y en respuesta al estrés.

La síntesis y la acumulación de hormonas tiroideas se llevan a cabo en cuatro fases: síntesis de tiroglobulina, captación de yodo de la sangre, activación del yodo y yodación de los residuos de tirosina de la tiroglobulina.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESEÑA
ANÁTOMO-FUNCIONAL
DE LA GLÁNDULA
TIROIDEA

1. La síntesis de tiroglobulina es similar a lo que acontece en otras células que exportan proteínas. Tiene lugar en el retículo endoplásmico rugoso, se añade un carbohidrato a la proteína en el interior de las cisternas del retículo y en el complejo de Golgi y el producto final, la tiroglobulina, se libera de las vesículas presentes en la porción apical de la célula hacia la luz del folículo.
2. La captación de yodo circulante se realiza en las células foliculares por medio de una proteína situada en la membrana basolateral de las células foliculares que transporta simultáneamente dos iones (es una cotransportador o symporter). Esta proteína, que transporta a la vez sodio y yodo, se denomina cotransportador de Na/I (NI symporter o NIS). El yodo circulante desempeña un papel relevante en la regulación de la función tiroidea, ya que valores bajos de yodo incrementan la cantidad de NIS, lo que aumenta así su captación y compensa la concentración más baja en el plasma.
3. La oxidación del yodo se lleva a cabo enzimáticamente por la peroxidasa del tiroides e inmediatamente se transporta a la cavidad del folículo por un transportador de aniones llamado pendrina.
4. En el interior del coloide se produce la yodación de los radicales tirosil de la tiroglobulina, catalizada por la peroxidasa tiroidea. De este modo se forman la T3 y la T4, aunque éstas no están aisladas, ya que forman parte de una molécula mayor, la tiroglobulina, a la que están unidas.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESEÑA
ANÁTOMO-FUNCIONAL
DE LA GLÁNDULA
TIROIDEA

Cuando las células foliculares del tiroides son estimuladas por la tirotrópina captan coloide a través de un proceso de endocitosis. Posteriormente, las enzimas lisosómicas digieren el coloide, las proteasas rompen las uniones entre los radicales yodados y la molécula de tiroglobulina y se liberan al citoplasma T4, T3, diyodotirosina (DIT) y monoyodotirosina (MIT). La T4 y T3 atraviesan libremente la membrana basolateral de la célula y difunden hasta llegar a los capilares sanguíneos. MIT y DIT no se secretan a la sangre porque su yodo se extrae enzimáticamente en el citoplasma y los productos de esta reacción enzimática –yodo y tirosina- son empleados nuevamente por las células foliculares. La T4 es más abundante, y constituye aproximadamente el 90% de la hormona circulante del tiroides. Por su parte, la T3 tiene una acción más rápida y es más potente.

La tiroxina tiene un efecto gradual en el organismo, estimulando la fosforilación en las mitocondrias. Este efecto depende de la síntesis de ARNm. T3 y T4 aumentan el número de mitocondrias y de sus crestas. Producen también una mayor síntesis y una menor degradación de las proteínas mitocondriales. La mayoría de los efectos de las hormonas tiroideas son consecuencia de su acción sobre la tasa metabólica basal. Aumentan la absorción de carbohidratos en el intestino y regulan el metabolismo de los lípidos. También influyen en el crecimiento corporal y en el desarrollo del sistema nervioso durante el periodo de vida fetal.

2

**CÉLULAS MADRE EN LA
GLÁNDULA TIROIDEA**

Las células madre son pluripotenciales, clónicas, y con capacidad de auto-renovación y demuestran además plasticidad para diferenciarse en los tipos celulares del tejido particular en el que se ubica, y con frecuencia se transdiferencia (Filip y cols, 2004). Estas cualidades unida a la capacidad de las células madre para la reparación y renovación de tejidos dañados las convierte en blancos atractivos (Mimeaut y cols, 2007). Sin embargo, la combinación de las mutaciones que afectan a la diferenciación de células madre y el potencial crecimiento ilimitado puede generar cáncer denominado cáncer de células madre (CSC). De hecho, se han identificado poblaciones específicas de células madre en numerosos tejidos y órganos normales y enfermos (Hombach-Klonisch y cols, 2008).

El cáncer de tiroides es el carcinoma más común de las glándulas endocrinas, que abarca aproximadamente el 1% de los tumores malignos, con una proporción de 3:1 mujer / hombre, y que en Norte América tiene una de las mayores incidencias de este tipo de cáncer entre los tumores malignos (Jemal y cols, 2007; Davies y cols, 2002). Los cuatro tipos de carcinoma de tiroides, el carcinoma papilar de tiroides, el carcinoma folicular de tiroides, carcinoma anaplásico, indiferenciado de tiroides, y el carcinoma medular de tiroides comprenden más del 98% de todos los cánceres de tiroides. Distintos y en ocasiones eventos citogenéticos exclusivos, así como diferentes mecanismos oncogénicos están implicados en los distintos tipos histológicos del carcinoma de tiroides (de Groot y cols, 2006; Kondo y cols, 2006, Smallridge y cols, 2009).

2.1

MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN Y DESARROLLO TIROIDEO

Las dos distintas poblaciones de células endocrinas de la glándula tiroidea se desarrollan a partir de diferentes orígenes: las hormonas tiroideas producidas por las células epiteliales tiroideas foliculares derivan del endodermo del suelo de la faringe y las células C productoras de calcitonina derivan de las células de la cresta neural en el cuerpo ultimobranquial UBB del cuarto arco faríngeo (Le Dourain y cols, 1979; Zorn y cols, 2007). La organogénesis del tiroidea requiere la especificación de las células precursoras procedentes de las células del endodermo del intestino anterior, la posterior migración y la proliferación de los precursores tiroideos, la fusión de los derivados de los primordios tiroideos y el UBB, y finalmente la diferenciación funcional (Fig. 1).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

Desarrollo de la glándula tiroidea en ratón

Organogénesis temprana independiente de TSH hasta la formación de los lóbulos tiroideos	E6.5-E7.5:		endodermo definitivo originado a partir de mesoendodermo
	E8.5 until E13:		desarrollo tiroideo temprano
	E8.5:	CS10	engrosamiento endodérmico ventral de la faringe primitiva-esbozo del tiroides
	E9-9.5:	CS12	formación de la yema tiroidea por proliferación e invasión
	E10:	CS14	divertaculo tiroideo con conducto tiroglosal
	E11.5:	CS15	desaparición del conducto tiroglosal; Fgfr2 está presente en el primordio tiroideo
	E12.5:	CS16	comienza la bifurcación del tiroides
	E13:	CS18	cuerpo ultimobronquial se pone en contacto con los lóbulos del primordio tiroideo
	E 13.5:	CS19	primordio tiroideo alcanza la traquea
	E14:		comienzo de diferenciación funcional
	E14.5:		expresión génica para TG, TPO, TSHR,TAZ
	E15-E16:		expansión de lóbulos tiroideos
	E15:		activación de la ruta TSH/TSHR
	E15.5:	10-12 semanas	expresión de TAZ en el núcleo de los tirocitos; primera evidencia de organización folicular
E16:		expresión génica para NIS	
E16.5:		formas foliculares tiroideas; se detecta T4 por primera vez	

Figura 1. Resumen de las etapas de la organogénesis del tiroides en el embrión del ratón hasta el principio de diferenciación funcional (Postiglione y cols, 2002; De Felice y cols, 2004; Kameda y cols, 2009; Parlato y cols, 2004). El equivalente de las etapas del desarrollo humano según el estadio de Carnegie (CS) y/o semanas de desarrollo se muestran en azul (Trueba y cols, 2005). Fgfr2, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2; TG, tiroglobulina, TPO, peroxidasa tiroidea; TAZ (coactivador transcripcional con el motivo de unión a PDZ), un regulador transcripcional de los genes PAX8 y TTF-1 (Di Palma y cols, 2009), TSH, hormona estimulante de tiroides; TSHR, receptor de TSH, T4 o tiroxina; NIS, cotransportador de sodio/ yoduro (Na⁺ / I⁻).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

En el embrión de ratón, el endodermo definitivo origina pronto E6-E7.5 del posterior epiblasto, donde la gastrulación comienza con la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8), brachyury, Wnt3, y eomesodermin (Zorn y cols, 2007; Kimelman y cols, 2000; Rodaway y cols, 2001; Lawson y cols, 1987; Lawson y cols, 1991). El desarrollo endodérmico en los vertebrados se inicia por el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y vías de señalización nodal (Zorn y cols, 2007; Ninomiya y cols, 1999) que dan lugar al revestimiento epitelial del intestino y del sistema respiratorio y de todos sus derivados, tales como el tiroides, pulmón, hígado, vesícula biliar y el páncreas. Se ha demostrado que la vía de señalización canónica de Wnt promueve la expresión temprana de los ligandos nodales (Zorn y cols, 2007; Norris y cols, 1999; Morkel y cols, 2003), y que altos niveles de señalización nodal inician definitivamente la formación del endodermo. La actividad nodal en el epiblasto se limita espacial y temporalmente por la expresión del antagonista nodal y Lefty y Cer1 (Yamamoto y cols, 2004). En los cuerpos embrioides (EBs), el desarrollo del endodermo puede ser inducido mediante una exposición a altos niveles activina-A un miembro de la familia TGF β a partir de una población de células brachyury-positivos (Kubo y cols, 2004).

Entre los blancos nodales, la proteína Mixl-1 y los activadores transcripcionales, GATA4 y GATA6, que son componentes clave en los derivados endodérmicos viscerales. Por otro lado, el grupo de alta movilidad (HMG)-la caja del factor

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

de transcripción (TF) Sox 17 y los factores nucleares hepáticos el Hnf3 α (Foxa1) y Hnf3 β (Foxa2) se expresan temporalmente durante la organogénesis tiroidea.

La organogénesis tiroidea comienza con la especificación de las distintas células endodérmicas en el suelo de la faringe primitiva en E8.5 (ratón) y la formación del esbozo del tiroides. Las células tiroideas precursoras se caracterizan por la co-expresión única de TFs, Ttf1/Nkx2.1 (TTF1), Pax8, Foxe1 (TTF2), y Hhex, que se expresan simultáneamente en las células precursoras del tiroides y en las células foliculares diferenciadas (Lazzaro y cols, 1991). Por ahora se desconocen los factores encargados de iniciar las especificaciones tiroidea del endodermo (Fig. 2).

Aunque in vitro, la activación de la ruta de la hormona estimulante del tiroides (TSH) / receptor de TSH (TSHR) regula la expresión de Ttf1 (TTF1), Pax8, y Foxe1, su expresión in vivo es independiente de la señalización TSH/TSHR De Felice y cols, 2004; Postiglione y cols, 2002; tal como se ha demostrado en modelos de ratones con daños en esta señalización (Li y cols, 1990). Los estudios realizados con ratones mutantes han demostrado que los cuatro TFs tienen distintas funciones durante la organogénesis temprana: Ttf1 y Pax8 son esenciales para la supervivencia de las células precursoras tiroideas, Foxe1 promueve la migración de las células precursoras de la tiroides, y Hhex puede ser importante como un represor de la diferenciación y para el mantenimiento de la expresión génica de Ttf1, Foxe1 y Pax8 en el primordio tiroideo (Tabla 1).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

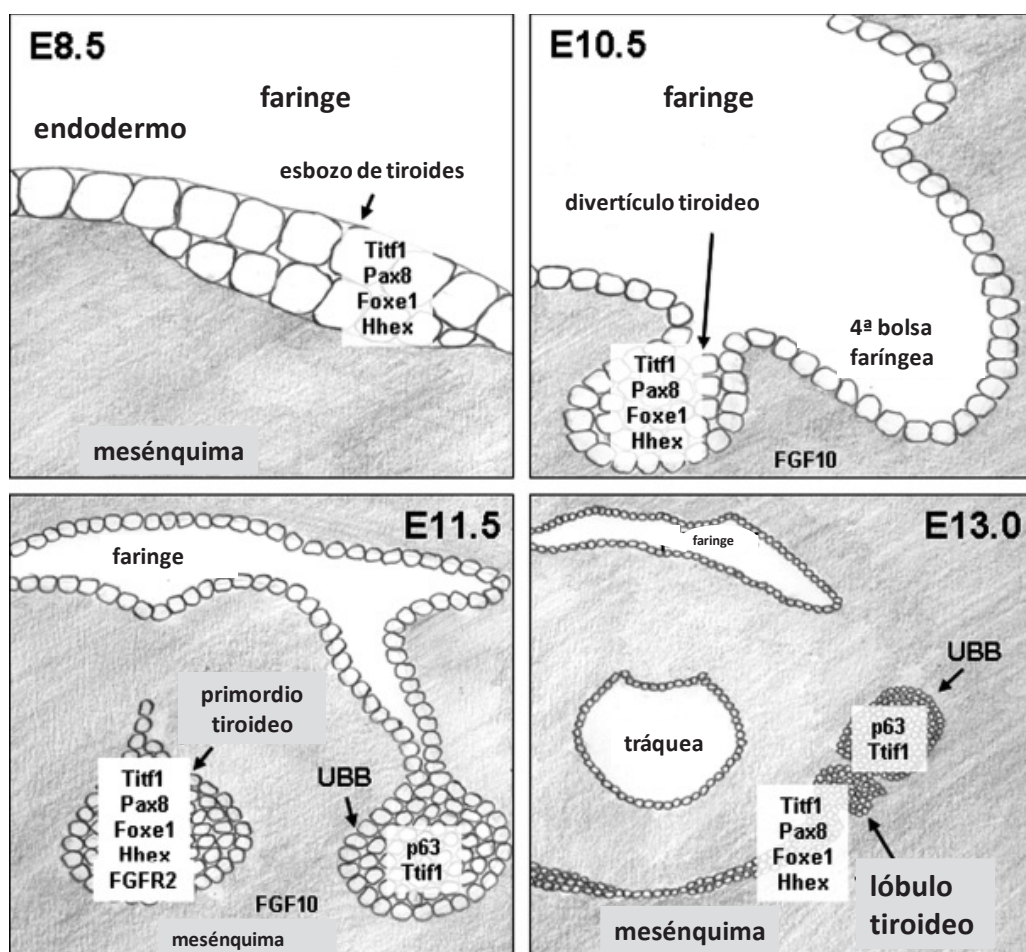


Figura 2. Dibujos esquemáticos del desarrollo de la tiroides.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

En E8.5, el esbozo de tiroides se forma como un engrosamiento de la capa endodérmica en la parte inferior de la faringe primitiva por la especificación de las células del endodermo para el linaje tiroideo. Se desconocen los factores que inician este proceso de especificación. Las células precursoras tiroideas coexpresan de los cuatro factores de transcripción TTF-1/NKX2.1, PAX8, FOXE1 y HHEX durante el desarrollo y la diferenciación funcional y en células foliculares tiroideas de adultos.

En E10.5, la proliferación de células precursoras del tiroides han formado el divertículo del tiroides. La migración de los precursores tiroideos lejos del revestimiento endodérmico temporal forma el conducto tiroglosal, que regresa a E11.5. En E11.5, el primordio de tiroides también ha descendido y se forma el UBB a partir del cuarto arco faríngeo. En E13.0, el primordio de tiroides ha formado dos lóbulos, alcanza su ubicación final en frente de la tráquea y contacta con UBB. FGF10, el factor de crecimiento de fibroblastos 10; FGFR2, receptor del FGF 2; UBB, el cuerpo último bronquial.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

<i>Ratones mutantes</i>	<i>Fenotipo tiroideo</i>	<i>Referencias</i>
Pax8 ^{-/-}	Regresión del primordio tiroideo en E11,5; células precursoras tiroideas desaparecen en E12; no folículos, ni TG, ni TPO; tiroides exclusivamente consiste en células C (TTF-1+)	Mansouri y cols, 1998
Ttf-1/Nkx2,1 ^{-/-}	Células precursoras tiroideas desaparecen en E10,5-E11,5; falta de células C y de células foliculares tiroideas	Kimura y cols, 1996; Lazzaro y cols, 1991
Hhex ^{-/-}	Esbozo tiroideo presente en E9; ausencia de primordio tiroideo en E10	Martinez_Barbera y cols, 2000
Foxe1 ^{-/-} (=Ttf2 ^{-/-})	Ausencia de migración de las células precursoras tiroideas; precursores tiroideos permanecen unidos al suelo faríngeo; los precursores desaparecen en E11.5 en un 50%	De Felice y cols, 1998
FRS2 ^{2F/2F} mutants	Aplasia o hipoplasia de lóbulos tiroideos; los lóbulos tiroideos permanecen asociados al epitelio faríngeo	Kameda y cols, 2009
Eya1 ^{-/-}	Falta de fusión entre UBB y los lóbulos tiroideos; hipoplasia tiroidea; severa reducción en el número de células C y foliculares	Xu y cols, 2002
Hoxa3 ^{-/-}	Hipoplasia tiroidea; persisten UBB con células C	Manley y cols, 1995
Pax9 ^{-/-}	Falta de formación de UBB	Peters y cols, 1998
Hoxa5 ^{-/-}	Formación folicular desorganizada; decrece la expresión génica de TPO, NKK2.1, TTF2, PAX8, niveles séricos de T4 normales	Menuier y cols, 2003

UBB: cuerpos ultimo branquiales; TPO: peroxidasa tiroidea; TG: tiroglobulina

Tabla 1. Marcadores de desarrollo y fenotipo tiroideo en ratones mutantes.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

Los factores derivados del mesénquima circundante son esenciales para el desarrollo de la tiroides. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) promueven la proliferación de las células tiroideas y reprimen la diferenciación in vitro (De Felice y cols, 2004). El FGFs aumenta la expresión de *Titf1* en el intestino anterior temprano (Serls y cols, 2005) y FGF10 reduce la expresión de *Sox2* y *p63* en el endodermo del futuro esófago (Que y cols, 2007). Embriones de ratones deficientes del receptor de FGF 2 IIIb (Revest y cols, 2001) y ratones knock-out FGF10 (Ohuchi y cols, 2000) muestran agenesia tiroidea, lo que sugiere que las células precursoras de la tiroides responden a FGF10 del mesénquima circundante (Ohuchi y cols, 2000; Celli y cols 1998). Curiosamente, la E-cadherina se expresa en todas las etapas de la organogénesis tiroidea y N-cadherina está ausente en todo momento (Fagman y cols, 2003), lo que indica que la migración de las células precursoras de la tiroides se produce independientemente de la transición mesenquimal a epitelio.

El UBB contiene dos tipos diferentes de células: células *Titf1* positivas (la mayoría de las células) y escasas células *p63* positivas (Kusakabe y cols, 2006). Las células *p63* positivas pueden sobrevivir sin *Titf1* y dan lugar a estructuras vesiculares.

2.2

CÉLULAS PROGENITORAS/MADRE TIROIDEAS PROVENIENTES DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Las células pluripotentes embrionarias (ES) pueden desarrollar las tres dimensiones como embrioblasto (EB) bajo condiciones de cultivo adecuadas. Las células dentro de EBs pueden diferenciarse espontáneamente en estadios embrionarios más avanzados de todos los linajes (Desbaillets y cols, 2000; Trouson A, 2006). Aparte de las tres ventajas principales del modelo de EB, esto es, (i) la caracterización de las funciones de la célula precursora, (ii) la valoración in vitro del efecto de mutaciones nulas de genes específicos o las pruebas knockouts de genes letales sobre la viabilidad de células ES, y (iii) la idoneidad como fuente de células para la ingeniería de tejidos, este modelo EB ha sido utilizado para promover la diferenciación temprana de células tiroideas (Lin y cols, 2003).

Las células ES de carcinoma embrionario (CCE) y las células TSHR + / - (W9.5) con una proteína fluorescente verde (GFP)-neomicina en ratón TSHR exón 1 cuya secuencia resulta en la expresión de GFP mediada por el promotor TSHR se ha empleado en estudios de células madre en diferenciación tiroidea (Lin y cols, 2003, Lin y cols, 2006; Arufe y cols, 2009). La generación de células tiroideas a partir de células de CCE y TSHR + / - ES derivadas de EBs es un proceso multifactorial, que incluye la inducción inicial de diferenciación endodermo por exposición limitada de EBs a suero o activina-A, un miembro de la familia TGF β y de los ligando nodales (Kubo y cols, 2004; Lin y cols, 2006; Arufe y cols, 2009; Ma y cols, 2009). Cuando a EBs se les permite crecer como una capa de células adherentes, las células del tiroides aparecen

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

y expresan marcadores tiroideos foliculares, PAX8, folicular de tiroides, Na⁺ / I-cotransportador (NEI), TSHR funcional, peroxidasa tiroidea (TPO) y tiroglobulina (TG).

Activina-A induce a las células embrionarias humanas a diferenciarse en células endodérmica definitivas (Kubo y cols, 2004; D'amour y cols, 2005). Tras 5 días de exposición a la activina-A, EBs derivados de células TSHR⁺ / - ES (W9.5) se ha demostrado una notable disminución en los niveles de transcripción de Oct-4 y Rex-1, marcadores de células madre y en cambio aumentó significativamente la actividad de genes de marcadores endodérmicos como Gata-4, CXCR-4, Foxa-2, y α -fetoproteína (Ma y cols, 2009). En otro tratamiento similar se obtuvo en aproximadamente un 2% de células GFP⁺ y ES TSHR⁺ funcionales dentro de EB, identificando la activina-A como un inductor de NIS⁺, PAX8⁺, y de células progenitoras tiroideas TSHR⁺ en ausencia de TSH (Ma y cols, 2009).

Recientemente, la importancia de la exposición gradual de células madre embrionarias a una secuencia coordinada de los factores endocrinos para la determinación específica y la maduración del tirocito ha supuesto un importante avance en la comprensión de la diferenciación in vitro de la diferenciación tiroidea a partir de células madres pluripotentes. Aunque activina-A aumentó la expresión de los genes específicos endodérmicos Foxa2 y Sox17, su efecto transitorio sobre la expresión TSHR al quinto día 5 fue prorrogado por un día adicional en presencia de TSH, el factor endocrino que afectan a la regulación génica de TSHR durante la diferenciación EB (Lin

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

y cols, 2003; Arufe y cols, 2009). La inducción y determinación del linaje tiroideo mediado por TSH también incluye una sobre regulación temporal de NIS en células resembradas de EBS en condiciones libres de suero. Sin embargo, tanto la activina-A como la TSH no pudo sostener un fenotipo tirocito estable diferenciado (Arufe y cols, 2009). La propagación de tirocitos maduros derivados a partir EB con la expresión y la colocalización parcial de marcadores tiroideos foliculares TSHR (número de GFP + células) y NIS y la aparición de TG requiere la presencia adicional de insulina y / o del factor de crecimiento de insulina-I en etapas posteriores durante el cultivo de EB (Arufe y cols, 2009)

2.3

CÉLULAS PROGENITORAS/MADRE TIROIDEAS EN LA GÁNDULA TIROIDEA EN ADULTOS

Aunque el sistema ES / EB es adecuado en el modelo in vitro para recapitular los pasos en la diferenciación folicular tirocítica y a pesar de sofisticados nuevas condiciones de cultivo, como el factor de crecimiento activin-A-TSH-insulina/ factor de crecimiento insulínico I, las células progenitoras tiroideas generadas son generalmente transitorias, variables y con un muy bajo número de células (1-2%) para otros estudios funcionales. La glándula tiroides en adultos parece ser otra fuente de células madre / progenitoras. Este órgano con un bajo índice proliferación (Coclet y cols, 1989; Dumont y cols, 1992), y con una alta frecuencia de la enfermedad benigna y maligna nodular que no

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

es suficiente ni convincentemente explicado por la predisposición genética, la deficiencia de yodo, mutagénesis, acciones endocrinas perturbadas, y / o sucesos de desregulación ligando-receptor (Derwalh y cols, 2002; Krohn y cols, 2005). Los primeros resultados de los experimentos de trasplantes en ratones nude también sugieren la presencia en los tejidos bocio nodular de crecimiento de forma autónoma de células derivadas del tiroides (Peter y cols, 1985).

Recientemente, la primera evidencia de la presencia de células madre adultas OCT-4+ y de células precursoras de origen endodermo con un fenotipo OCT4+, GATA-4 +, HNF4A +, PAX8 +, y TG se obtuvo en tejidos y células en cultivo derivadas de bocio humano adulto (Thomas y cols, 2006). Basado en la expresión de ABCG2 funcionalmente activa, células fluorescentes activado (FACS), reveló una pequeña población (SP; 0,1% del total de células) de los tirocitos en cultivo obtenidos a partir de tejidos de bocio humanos con un índice nuclear / citoplasmático alto y con un fenotipo ABCG2 +, Oct4 +. Esta fracción de células SP no expresan los marcadores endodérmicos GATA-4, PAX8 y HNF4a, o los marcadores de diferenciación tiroidea típicos TSHR, TPO, NIS y TG que sin embargo se detectaron en la fracción no-SP (52). La población de células SP se mantuvo viable en cultivos en monocapa durante 14 días, pero sólo en cultivos en suspensión no adherentes y en presencia de EGF y FGF, se crearon esferas. Estas tiroesferas se componían de hasta un 5% de células madres progenitoras tiroideas ABCG2+, OCT4+ (SP) o GATA-4 +, HNF4a + (no-SP) (Lan y cols, 2007). TSH inhibió completamente

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

STEM CELLS EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

la formación de esferas. La adición de suero inducía la actividad génica de TSHR y la subsiguiente acción dual del suero más la TSH durante un período de 3 semanas aumentó más la expresión de TSHR mayor y provocó que las células derivadas de esfera se diferenciaron en tirocitos adultos PAX8+, TSHR+, NIS+ TPO+, y TG+ con la consecuente pérdida de marcadores de células madre y endodérmicas. Es importante destacar que estas células mostraban las características de tirocitos diferenciados al ser capaces de generar estructuras foliculares tiroideas y mostrando captación de yodo TSH-dependiente (Lan y cols, 2007).

Los grupos de clones celulares derivados de células humanas OCT4+, Nanog+ tienen núcleos grandes y citoplasma pequeño similar a las células madre tiroideas descritas recientemente por Lan et al. (Lan y cols, 2007) que también generan esferas en presencia de FGF y EGF, pero en ausencia de suero y de TSH (Fierabracci y cols, 2008). Cuando estas tiroesferas fueron sembradas en una matriz de colágeno tridimensional adoptada para tirocitos diferenciados (Toda y cols, 2001; De Tullio y cols, 2000), el 50% de las esferas formaban estructuras similares a los folículos con secreción de T4, de células TG+ que recubrían el lumen y localizadas en la periferia células TPO+, pero el TSHR estaba ausente en estos folículos (Fierabracci y cols, 2008). La formación de folículos en la presencia de suero independiente de TSH, pero requería la ausencia de EGF y FGF. Las esferas cocultivadas con la línea celular de neuroblastoma LAN5 (De Tullio y cols, 2000) que aparecen más grandes morfología, mostró la expresión del marcador neuronal β -tubulina III, y también inició la diferenciación de adipocitos, indicando un alto nivel de plasticidad de las células dentro de la tiroesferas (Fierabracci y cols, 2008).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

Cuando se inyectaron en ratones SCID, los tirocitos no generaron tumores (Greiner y cols, 1998).

En la tiroides de ratón adulto, las células madre que expresan los genes de células ES Oct4 y nucleostemina también residen en la SP que constituye del 0,3-1,4% de la población total de células de la tiroides (Hoshi y cols, 2007; Tsai y cols, 2002; Niwa y cols, 2000). Al igual que en la tiroides humana SP, las células de ratón ABCG2+ representan una población heterogénea con aproximadamente un 50% de expresión Sca1+ (Xin y cols, 2005; van de Rijn y cols, 1986), marcador de células tiroideas y por otro lado un fenotipo ABCG2+, OCT4+, nucleostemina+, c-kit-/CD117-, y CD45-. Al igual que la SP tiroidea humana, las células SP tiroideas de ratón SP carecían de los transcritos de codificación para PAX8, TPO y TG (Hoshi y cols, 2007). Sin embargo, cuando la SP se subdividió en dos fracciones SP1 y SP2 que se asemejan a áreas FACS de alto y bajo flujo Hochst33342, respectivamente, las células de SP2 eran ABCG2+, OCT4+ con una débil positividad para TSHR y TTF-1, lo que sugiere un linaje progenitoras tiroideo presente en SP2 (Hoshi y cols, 2007). Un pequeño número de células ABCG2+ (aproximadamente el 1%) se localizaron en el espacio interfolicular y coexpresaban Sca1 o vimentina (marcador mesenquimal). Interesantemente, algunas células C positivas para calcitonina también lo eran para ABCG2+, sugiriendo la presencia de un linaje progenitor de células C entre las células ABCG2+ tiroideas en el ratón (Hoshi y cols, 2007).

2.4

OTRAS FUENTES DE CÉLULAS PROGENITORAS/MADRE TIROIDEAS EN EL TIROIDES

2.4.1

MÉDULA ÓSEA

En muchos órganos tanto de alta como de baja proliferación, las células madres progenitoras provienen de la médula ósea (Wulf y cols, 2003; Sherwood y cols, 2004). Se ha demostrado que los pacientes que han recibido un trasplante de células madre hematopoyéticas tienen un mayor riesgo de carcinoma de tiroides (Cohen y cols, 2007; Sanders y cols, 2009). De hecho, un trasplante durante la juventud es el factor de riesgo importante, seguido de la irradiación, el sexo femenino, y la enfermedad de rechazo. La ausencia de expresión de los marcadores en las células hematopoyéticas SP (CD45 y CD117) procedentes de adultos humanos (Fierabracci y cols, 2008) y de tiroides murinos (Hoshi y cols, 2007), respectivamente, puede indicar una de dos cosas: (i) las células madre en el tiroides no son nutridas por la médula ósea, o (ii) como consecuencia de las bajas tasas de renovación celular en el tiroides (Coclet y cols, 1989; Dumont y cols, 1992), las células CD45+ humanas y CD45+ de ratón, CD117+ derivadas de médula ósea pierdan la expresión de ambos marcadores mientras que residen en el tiroides durante tiempos prolongados.

2.4.2

MICROQUIMERISMO

El microquimerismo describe el tráfico bidireccional y la persistencia de un pequeño número de células alogénicas en un organismo diferente genéticamente (Liegeois y cols, 1977). Este intercambio materno-fetal de las células es un fenómeno común en todas las especies con placenta (Wang y cols, 2004; Turín y cols, 2007; Jiménez y cols, 2005; Lo y cols, 1990; Klonisch y cols, 2009). La detección de células alogénicas fetales en los tejidos maternos, llamado microquimerismo fetal, se observa con frecuencia pronto en la gestación a la 4-6 semanas (Lo y cols, 1990; Thomas y cols, 1994; Ariga y cols, 2001) y casi al término todas las mujeres embarazadas contienen un bajo número de células circulantes del feto (Bianchi y cols, 2001; Bianchi y cols, 1997; Bianchi y cols, 1996). Se ha detectado supervivencia a largo plazo de células fetales, por ejemplo, células madre hematopoyéticas progenitoras CD34+, células CD45+, y las células madre mesenquimales desmina +, en tejidos maternos (Bianchi y cols, 1996; Campagnoli y cols, 2001; Mikhail y cols, 2008; Nguyen y cols, 2006). Células fetales masculinas se han detectado en adenoma folicular y en glándula tiroidea normal de las madres (Renne y cols, 2004; Srivatsa y cols, 2001; Koopmans y cols, 2008, Imaizumi y cols, 2002) y estas células con frecuencia pueblan los tejidos tiroideos en la enfermedad autoinmune de Graves y la tiroiditis de Hashimoto (Klitschar y cols, 2001). Recientemente se ha detectado un subconjunto de la población humana de células madre progenitoras CD34 (+), CD45 (-) (19.3%) con alta plasticidad se detectó recientemente en siete líneas esferoide generados a partir de tejidos de tiroides normales y de tiroides perinodulares normales (Fierabracci y cols, 2008). De estas líneas celulares, tres fueron TG+ y dos

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

Oct4 (+) y Nanog (+) (Fierabracci y cols, 2008), sin embargo aún no se ha demostrado el potencial origen microquimérico de estas células tiroideas madre progenitoras.

2.4.3

NIDOS CELULARES DERIVADOS DE RESTOS EMBRIONARIOS

Los nidos sólidos celulares (SCNs) han fascinado a los patólogos desde su descubrimiento en 1907 por Getzowa y cols. Los SCNs son un componente normal de la glándula tiroidea humana que se encontraría en el 60% de los tiroides adultos y en el 89% de los tiroides neonatales si se examinasen en su totalidad (Harach y cols, 1993). Actualmente se acepta que los SCNs son remanentes del cuerpo último branquial (Harach y cols, 1988; Cameselle-Teijeiro y cols, 1994; Martin y cols, 2000; Harach, 1987; Bykov, 1993; Fraser y cols, 1979; Mizukami y cols, 1994; Ozaki y cols, 1991; Beckner y cols, 1990), sin embargo su significado biológico aun no ha sido aclarado (Harach y cols, 1988; Cameselle-Teijeiro y cols, 1994; Martin y cols, 2000; Williams y cols, 1989; Chan y cols, 1989; Janzer y cols, 1979; Fraser y cols, 1979; Cameselle-Teijeiro y cols, 1994; Cameselle-Teijeiro y cols, 1995; Cameselle-Teijeiro y cols, 1996). Se ha sugerido que estas estructuras embrionarias pueden constituir el origen de algunas estructuras ectópicas raramente descritas en la glándula tiroidea, así como algunos tipos peculiares de neoplasias tiroideas (Cameselle-Teijeiro y cols, 1995; Cameselle-Teijeiro y cols, 1996; Harach y cols, 1985; Harach y cols; 1993).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

Además, los SCNs pueden ser una fuente de confusión en la patología tiroidea dado que pueden confundirse con metaplasia escamosa, carcinoma de células escamosas primario o metastático, quistes tiroglosas, hiperplasia de células C y microcarcinomas papilares y medulares (Harach y cols, 1988; Cameselle-Teijeiro y cols, 1994).

Distintos estudios han tratado de realizar descripciones histológicas, inmuno histoquímicas y ultraestructurales de los SCNs (Harach y cols, 1988; Cameselle-Teijeiro y cols, 1994; Martin y cols, 2000; Harach, 1987; Bykov, 1993; Fraser y cols, 1979; Mizukami y cols, 1994; Ozaki y cols, 1991; Beckner y cols, 1990; Martin y cols, 2000; Williams y cols, 1989; Faggiano y cols, 2003). Actualmente se acepta que los SCNs están compuestos por dos tipos distintos de células (Cameselle-Teijeiro y cols, 1994): las células principales que son poligonales o alargadas o incluso en forma de huso con localización central, núcleo oval o fusiforme con desarrollo desigual nuclear mostrando de forma ocasional surcos, y citoplasma intensamente eosinófilo (incluyendo citoqueratinas de alto peso molecular), con ausencia de puentes intercelulares (Harach y cols, 1988; Cameselle-Teijeiro y cols, 1994; Martin y cols, 2000); y las células C, que cuenta con la menor proporción en la población de SCNs y que se caracterizan por un citoplasma claro y un núcleo compacto pequeño localizado centralmente (Harach y cols, 1988; Cameselle-Teijeiro y cols, 1994; Martin y cols, 2000).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

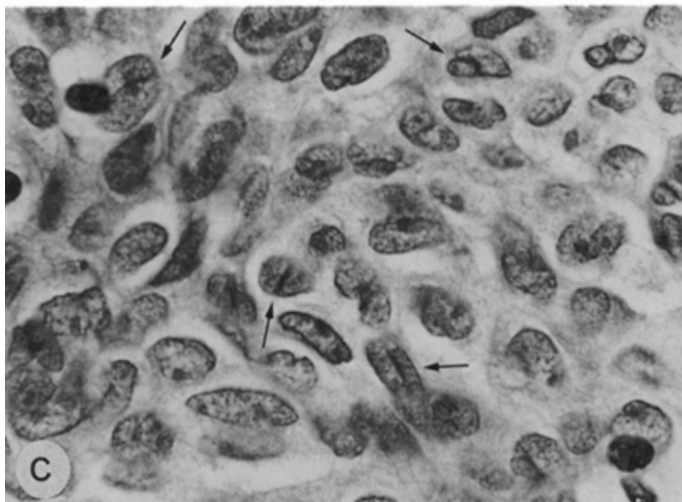
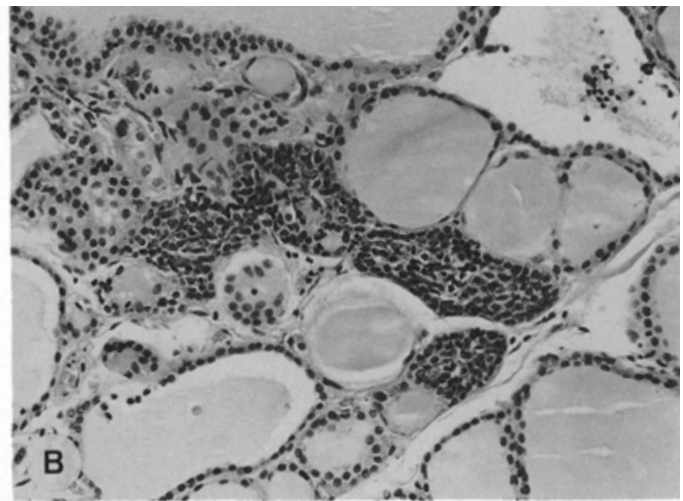
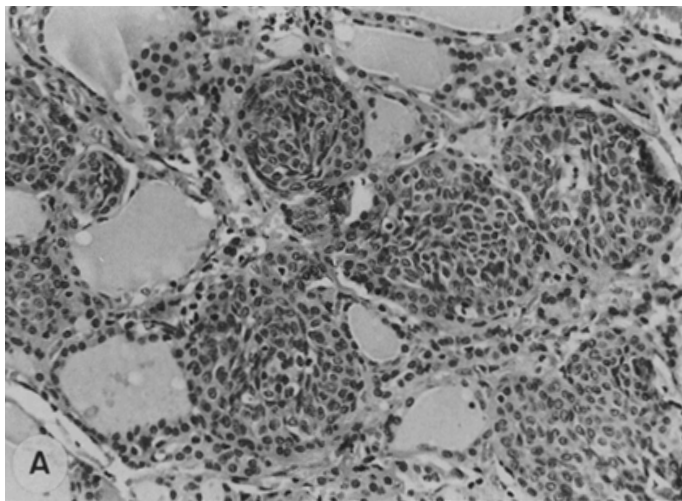


Figura 3. Nidos sólidos celulares. Nidos sólidos de células poligonales o elongadas. (A) y (B) (HE; X160) en contacto con folículos tiroideos normales. (C) (HE; X160) Células principales (flechas) con núcleo oval y ocasionalmente con surcos o estrías (Reis-filho y cols, 2003).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE
EN LA GLÁNDULA
TIROIDEA

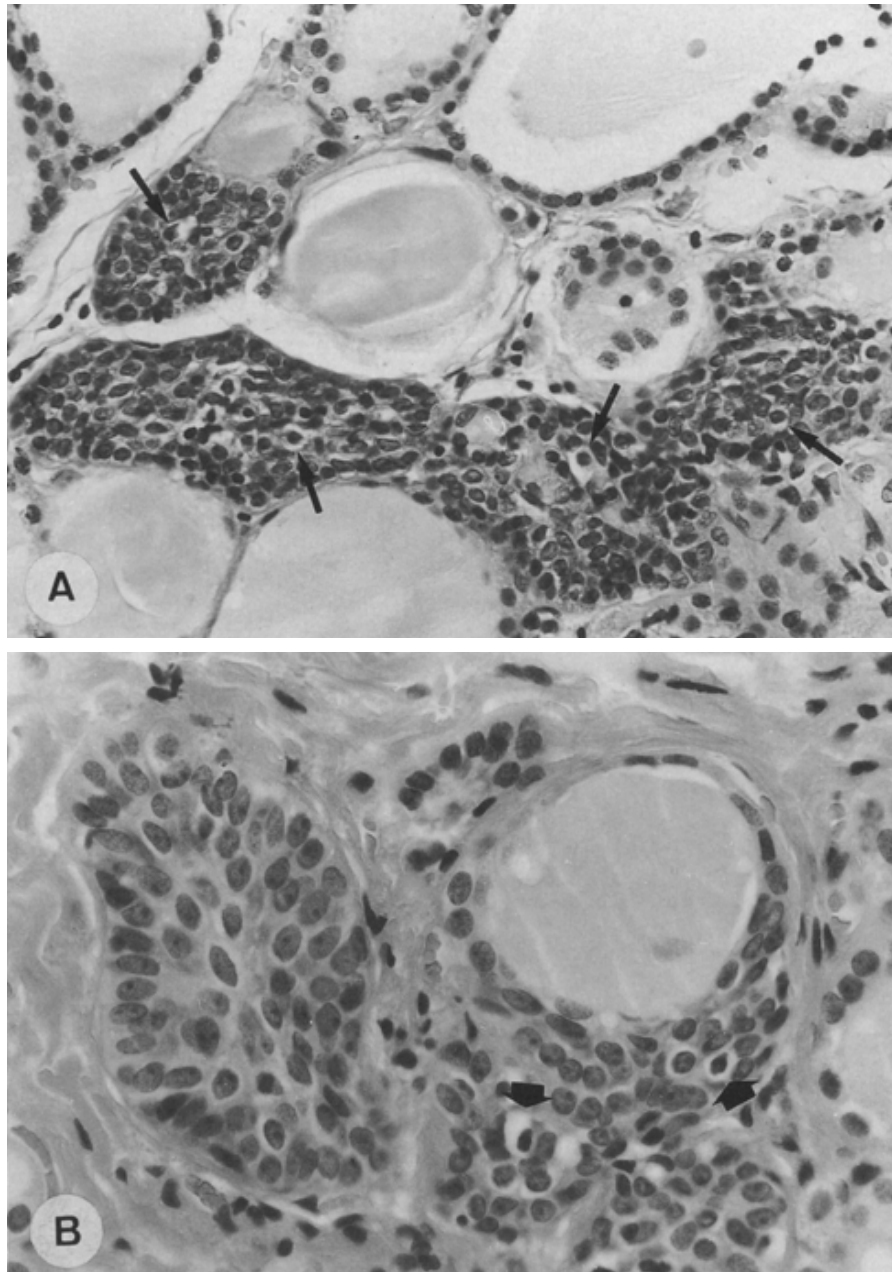


Figura 4. Nidos sólidos celulares. **A.** HE (x250) Células C (flechas) entremezcladas entre las Células Principales. **B.** HE (x400) Células C con citoplasma claro, núcleo pequeño y compacto. (Reis-filho y cols, 2003).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

Hasta en un 81% de los casos, los folículos mixtos se pueden encontrar mezclados con los SCNs (Harach y cols, 1988; Cameselle-Teijeiro y cols, 1994; Martin y cols, 2000). Los folículos mixtos están compuestos de un remanente de células principales y células foliculares, formando una luz de aspecto folicular. La luz contiene material coloide PAS+, mucinas acidas, restos celulares y material granular PAS+ (Cameselle-Teijeiro y cols, 1994; Harach y cols, 1987).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

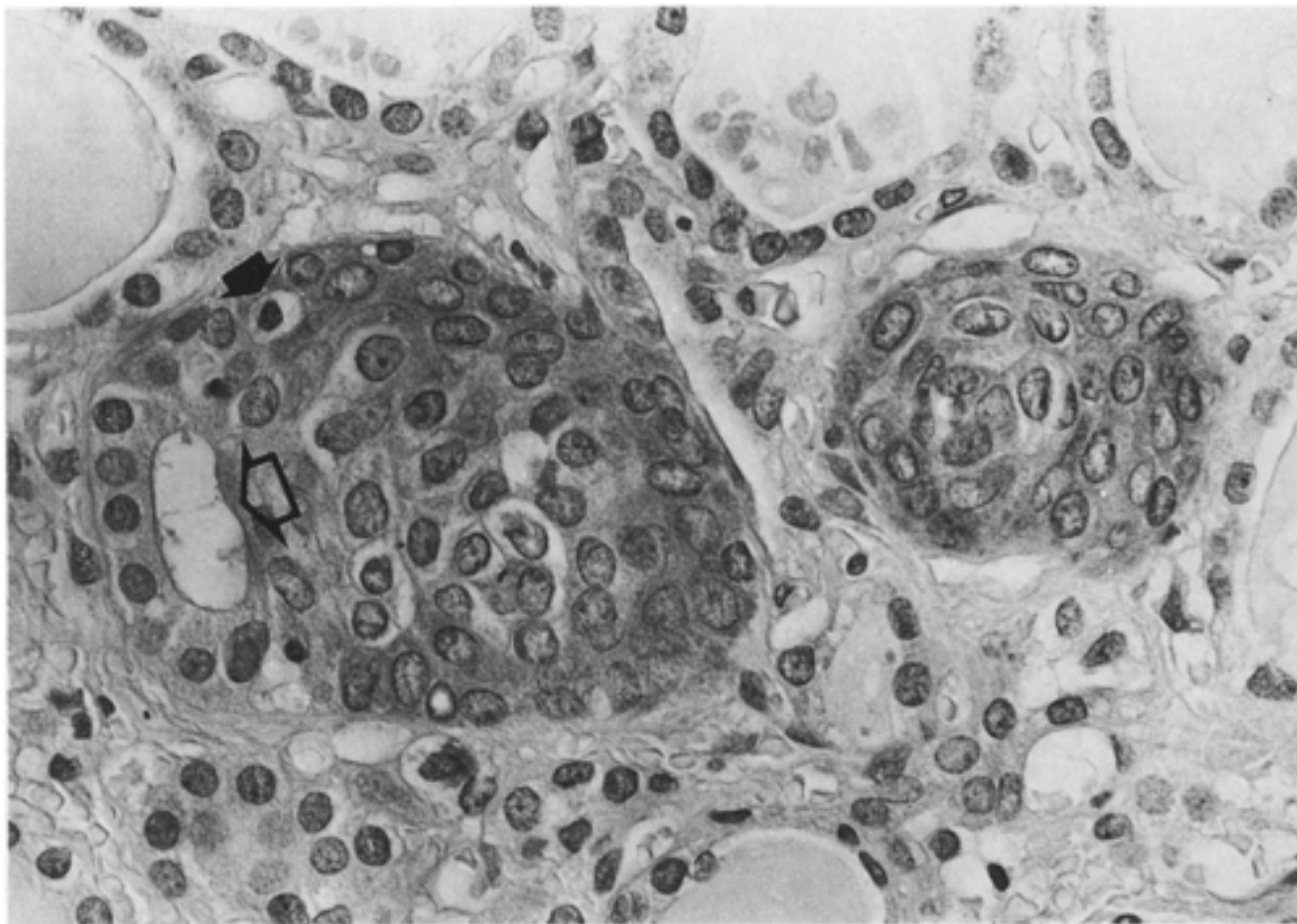


Figura 5. Nidos sólidos celulares. IHC para neurotensina (x250). Algunas de las células de los nidos sólidos celulares muestran formación de lumen (flecha) originando los denominados folículos tiroideos mixtos. Se identifica inmunoreacción difusa en los citoplasmas de las células principales para neurotensina. Puede observarse una célula C (flecha negra), (Reis-filho y cols, 2003).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE
EN LA GLÁNDULA
TIROIDEA

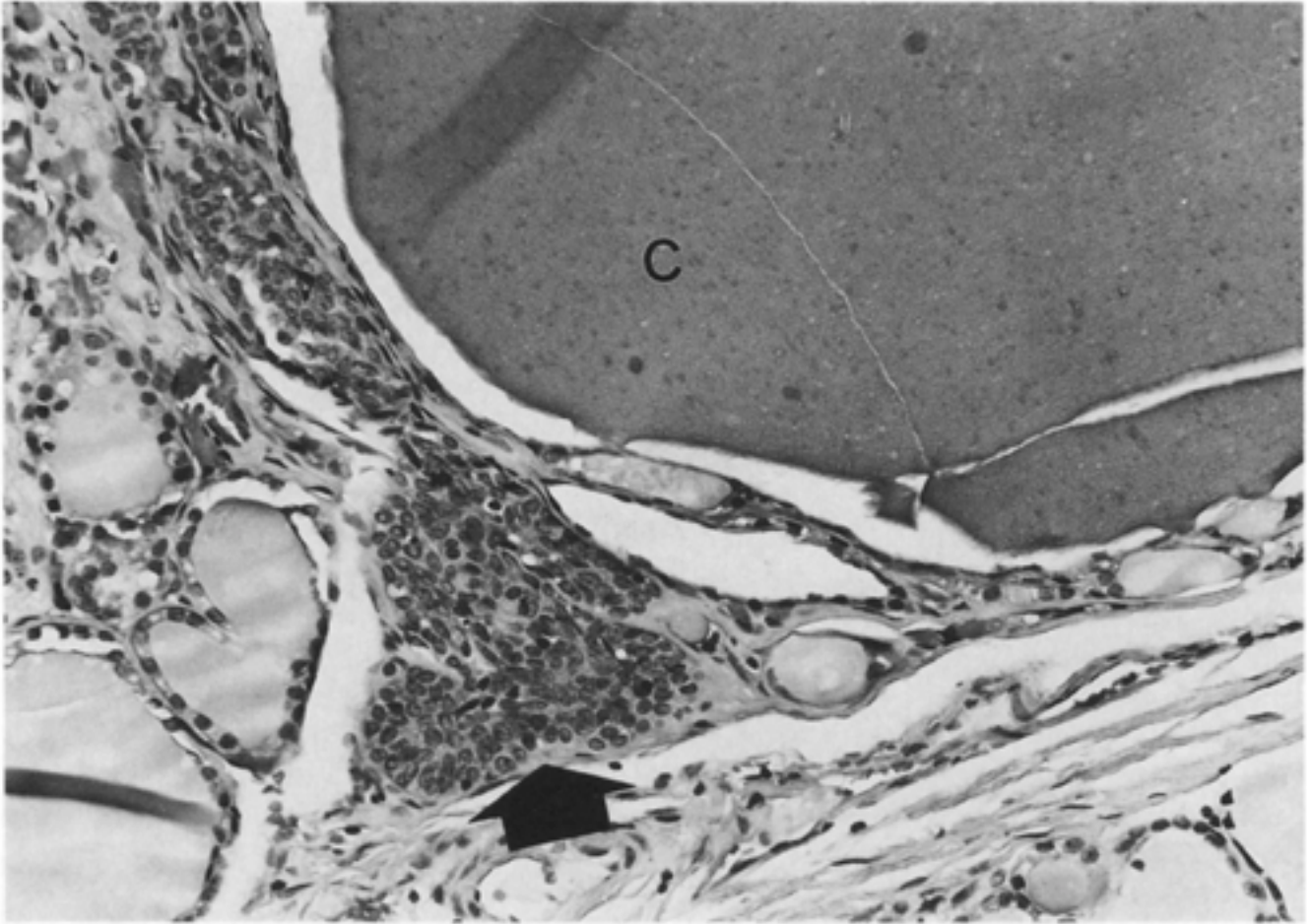


Figura 6. Nidos sólido celulares. Mucicarmina de Mayer (x160) Se observan microquistes con material granular eosinófilo (C) asociados con nidos sólidos celulares (flecha), (Reis-filho y cols, 2003).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

La evaluación inmunohistoquímica realizada hasta ahora en SCNs ha revelado que tanto las células principales como las células C expresan citoqueratinas de alto y bajo peso molecular (Cameselle-Teijeiro y cols, 1994; Martin y cols, 2000; Harach, 1987; Bykov, 1993; Fraser y cols, 1979; Mizukami y cols, 1994; Harach y cols, 1993), así como antígeno carcinoembrionario, pero sin embargo muestran una expresión diferencial de marcadores neuroendocrinos; mientras las células principales son normalmente positivas para somatostatina y neurotensina, las células C son inmunorreactivas para calcitonina y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Cameselle-Teijeiro y cols, 1994; Reis-Filho y cols, 2003). La vimentina es normalmente negativa, mientras que sobre la expresión de tiroglobulina en SCNs existe controversia (Harach y cols, 1988; Mizukami y cols, 1994; Janzer y cols, 1979; Harach y cols, 1993, Reis-Filho y cols, 2003).

TTF-1 es un marcador de diferenciación temprano tanto para células foliculares y parafoliculares (Reis-Filho y cols, 2001; Reis-Filho y cols, 2000) y p63 se expresa constitutivamente en células madre/basales de varios tipos de epitelio y normalmente se encuentra ausente en células diferenciadas (Mills y cols, 1999; Yang y cols, 1999; Levrero y cols, 2000; Di Como y cols, 2002; Reis-Filho y cols, 2002). Reis-Filho y cols (2003) observaron una expresión diferencial de p63 y TTF-1 en el núcleo de las células principales

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

y el de las células C, apreciando que en las células principales se expresaba p63 y queratina celular basal (34βE12), en cambio no se detectaba expresión de TTF-1. En contraste las células C, expresaban TTF-1, calcitonina y no presentaban inmunorreactividad para p63, lo que les llevo a especular que las células C de los SCNs ya habían comenzado su diferenciación parafolicular y que las células principales podría ser células madres (Reis-Filho y cols, 2003). En los folículos mixtos se detecto también una expresión diferencial de p63, citoqueratinas, TTF-1 y tiroglobulina; mientras que las células que parecían células principales mostraban una intensa tinción positiva para p63 y citoqueratina 34βE12 no se detectaba en ellas inmunoexpresión para TTF-1 y tiroglobulina, las células cuboides dispuestas en un patrón folicular eran positivas para tiroglobulina y TTF-1 y negativas para p63 y citoqueratina 34βE12. Todo ello sugería que las células ordenadas en las estructuras foliculares habían iniciado su diferenciación folicular (Reis-Filho y cols, 2003).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

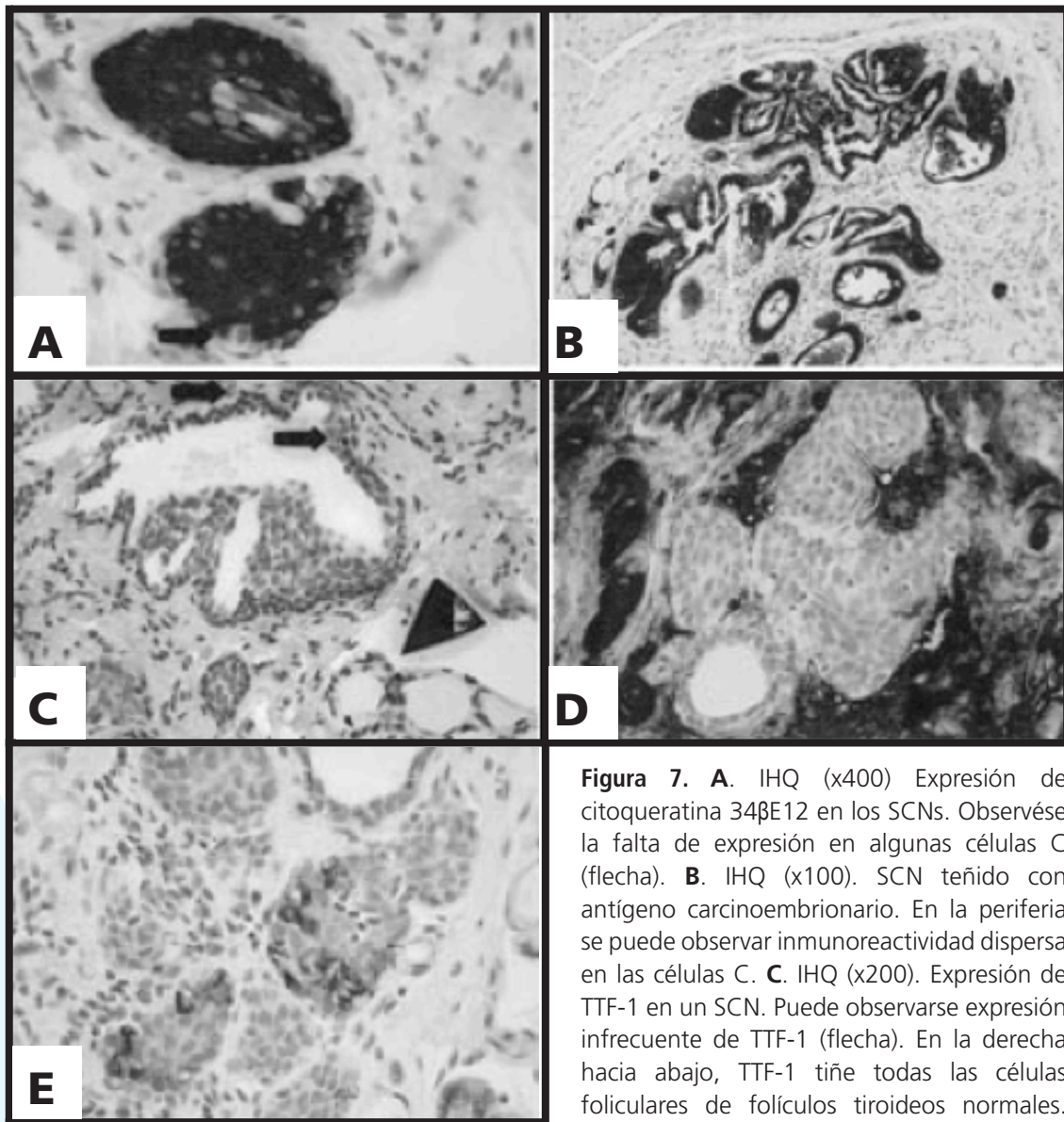


Figura 7. **A.** IHQ (x400) Expresión de citoqueratina 34βE12 en los SCNs. Obsérvese la falta de expresión en algunas células C (flecha). **B.** IHQ (x100). SCN teñido con antígeno carcinoembrionario. En la periferia se puede observar inmunoreactividad dispersa en las células C. **C.** IHQ (x200). Expresión de TTF-1 en un SCN. Puede observarse expresión infrecuente de TTF-1 (flecha). En la derecha hacia abajo, TTF-1 tiñe todas las células foliculares de folículos tiroideos normales. **D.** IHQ (x200). Células foliculares y estroma tiroideo teñido con tiroglobulina. Los SCNs negativos para este marcador. **E.** IHQ (x200). Inmunoreactividad para calcitonina en células C dispersas de los SCNs (Reis-filho y cols, 2003).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

En otro estudio posterior se encontró una sobreexpresión de bcl-2 en las células principales de los SCNs (Preto y cols, 2004). Previamente se había demostrado que la proteína bcl-2 prolonga la supervivencia de la células, la capacidad de diferenciación y promueve la diferenciación y la morfogénesis (Lu y cols, 1996). El incremento de la expresión de bcl-2 en los SCNs parece estar en concordancia con un fenotipo de célula madre.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

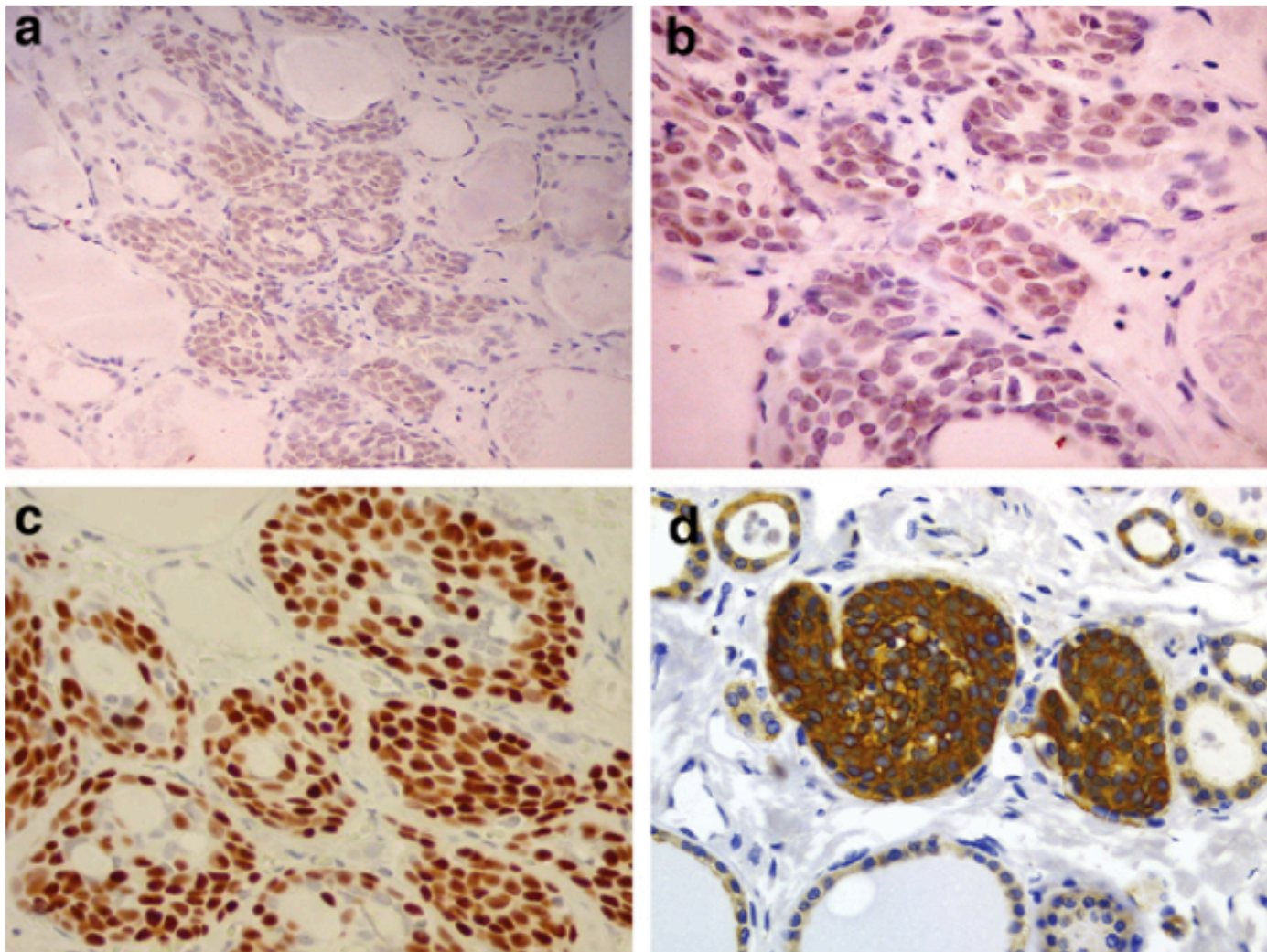


Figura 8. SCNs de glándula tiroidea humana (A y B). IHQ (x400). Expresión de la telomerasa en los núcleos de las células principales; también puede observarse la ausencia de inmunorreactividad en las células foliculares tiroideas adyacentes al SCN. C. IHQ (x400). Intensa tinción nuclear para p63 en las células principales de los SCNs. D. IHQ (x400). Intensa reactividad citoplasmática para bcl-2 en los SCNs (Preto y cols, 2004).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

Aún existe ambigüedad sobre que constituye exactamente una célula madre. La definición de célula madre más aceptada es aquélla que la define como una célula con capacidad de autorenovación y de generar progenie diferenciada (Morrison y cols, 1997). Existen también otras propiedades que se asocian con las células madre que son la habilidad para sobrevivir de una forma quiescente, la capacidad de clonarse regenerando algunos o todos los tipos celulares que conforman el tejido en el que ubica, y la habilidad de someterse a divisiones celulares asimétricas (Hall y cols, 1989; Potten y cols, 1990).

Las células somáticas normales tienen un potencial replicativo limitado denominado "límite de Hayflick" que al alcanzarlo las células se encuentran en un estado no-creciente viable. Las células que han adquirido un potencial de autorrenovación amplio como las células madre necesitan sobrepasar esta barrera de crecimiento mediante activación de la telomerasa. Se han descrito niveles bajos de expresión de la telomerasa en células madres de varios tejidos como en células basales de las criptas intestinales, células basales de la piel y células progenitoras hematopoyéticas, entre otras (Hiyama y cols, 1995; Hastie y cols, 1990; Matthews y cols, 2001).

Preto y cols (2004) han detectaron expresión de telomerasa mediante inmunohistoquímica en las células principales de los SCNs. Otros autores

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

también han detectado actividad de la telomerasa en el tiroides normal (Haugen y cols, 1997; Yashima y cols, 1997; De Deken y cols, 1998; Onoda y cols, 1998; Kammori y cols, 2000). Estas observaciones parecen indicar que las células foliculares podrían tener su origen en las células telomerasas positivas derivadas de la estructura de los SCNs (Preto y cols, 2004).

Aunque el perfil inmunohistoquímico obtenido hasta ahora para las células principales de los SCNs parece indicar un fenotipo de célula madre, no se han realizado estudios para analizar la expresión de marcadores específicos de células madre como OCT4 o SALL4.

Como ya hemos mencionado, los nidos sólidos celulares pueden ocasionar algunas dificultades en la práctica rutinaria de patología tiroidea dado que pueden confundirse con metaplasia escamosa, carcinoma escamoso metastásico, microcarcinoma papilar, carcinoma medular e hiperplasia de las células C (Harach y cols, 1988; Camesselle-Tejeiro y cols, 1994). Hasta hace poco tiempo se asumía que una evaluación morfológica basada en un perfil inmunohistoquímico de los SCNs (antígeno carcinoembrionario y queratinas "epidérmicas") podría ser suficiente para diferenciarlos (Harach y cols, 1988; Camesselle-Tejeiro y cols, 1994). Sin embargo, algunos carcinomas neuroendocrinos y carcinomas mucoepidermoides primarios o metastásicos pueden coexpresar antígeno carcinoembrionario y citoqueratinas de alto

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE EN LA GLÁNDULA TIROIDEA

peso molecular “epidérmicas” (Camesselle-Tejeiro y cols, 1995; Harach y cols, 1985; Sturn y cols, 2001; Schroder y cols, 1996; Baloch y cols, 2000). La inmunoreactividad de p63 podría ayudar en la identificación de los SCNs. p63 no se expresa en células foliculares ni parafoliculares (Di Como y cols, 2002; Reis-Filho y cols 2002) ni en carcinomas foliculares ni medulares (Di Como y cols, 2002; Reis-Filho y cols 2002). En cambio en un estudio realizado por Preto y cols (2002), se detecto inmunoexpresión en 4 carcinomas papilares en el 5-30% de las células. Además, la expresión de p63 casi se restringio a focos de diferenciación escamosa (Preto y cols, 2002). Por otro lado Faggiano y cols (2003), han identificado la Galectina-3 como un posible marcador para distinguir los SCNS de células parafoliculares normales.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE
EN LA GLÁNDULA
TIROIDEA

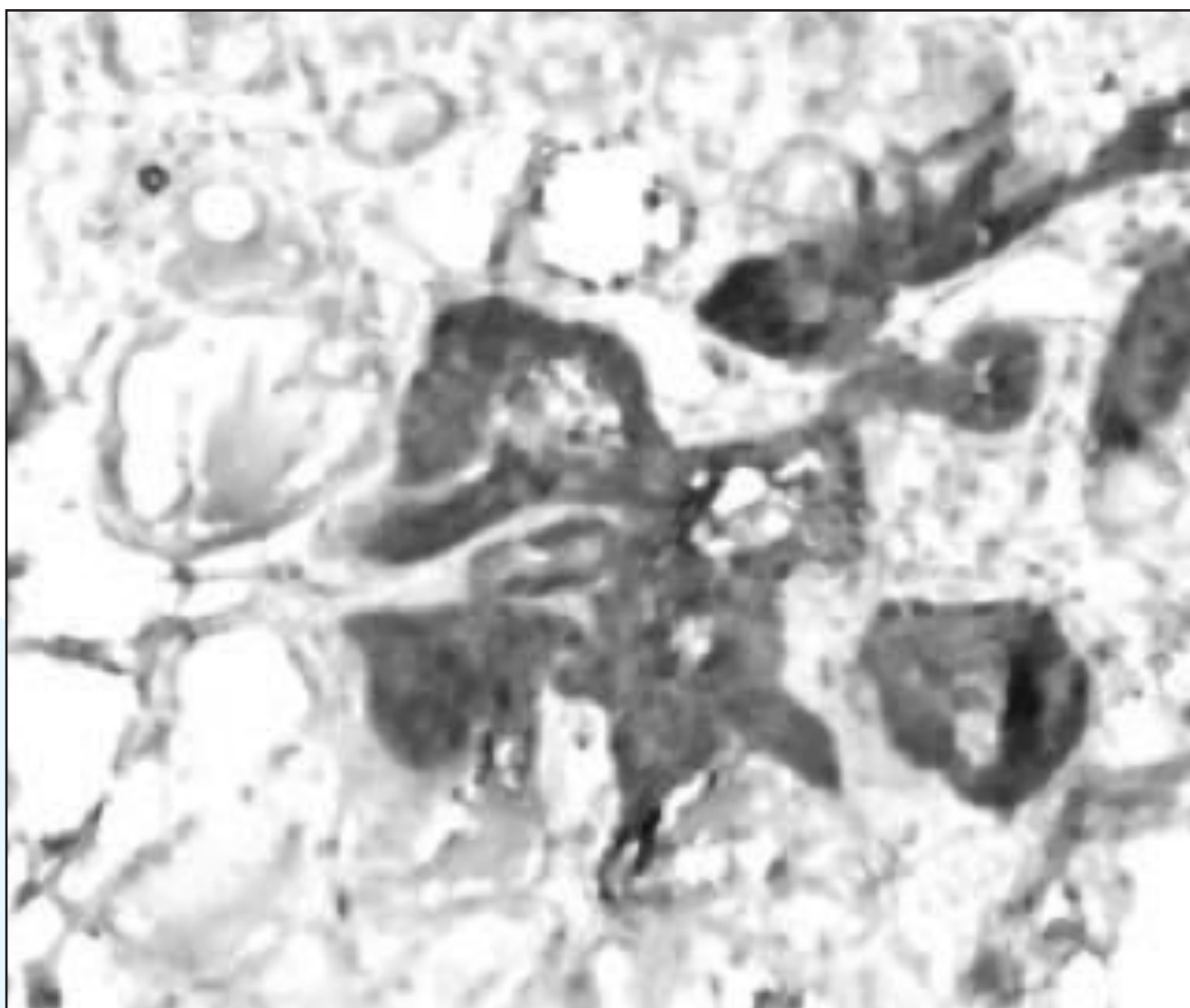


Figura 9. Inmunexpresión nuclear y citoplasmática de Galectina 3 en SCNs (Faggiano y cols, 2003)

3

**CÉLULAS MADRES Y CÁNCER
DE TIROIDES**

Los recientes progresos en la biología celular tumoral y en genética proporcionan cada vez más pruebas de que una subpoblación específica de las células tumorales juega un papel crucial en la iniciación del tumor, el crecimiento invasivo, y la metástasis de tumores malignos varios (Montero y cols, 2010). Estas células, denominadas células madre del cáncer (CSCs) o células iniciadoras del tumor, tienen capacidad de división celular asimétrica, es decir, generan una copia de sí mismas (auto-renovación) y dan lugar a células progenitoras que progresivamente se diferencian en varios linajes de masas celulares tumorales heterogéneas (Visvaderi y cols, 2008). Cuando se trasplantan a inmunodeficientes, por ejemplo a ratones NOD / SCID, las CSCs regeneran una fenocopia del cáncer de origen. En varios tumores sólidos, en leucemias, y en líneas celulares cancerosas se han detectado CSCs (Visvaderi y cols, 2008).

Las CSCs puede surgir a través de la adquisición de mutaciones o cambios epigenéticos a partir de células madre adultas o a partir de células progenitoras comprometidas. Las células madre adultas, tienen capacidad de auto-renovación y de diferenciación durante toda la vida del organismo, y se caracterizan por su pluripotencia y su estado indiferenciado.

El modelo CSC (modelo jerárquico) sostiene que la llamativa heterogeneidad morfológica y funcional, es una característica de la mayoría de los tumores, y que se sustenta por subpoblaciones distintas de CSCs (Dick y cols, 2009). Sin embargo, no todos los tumores malignos siguen este modelo de CSCs de

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán



CÉLULAS MADRE Y
CÁNCER DE TIROIDES

heterogeneidad. De foma que, se ha propuesto un modelo alternativo para explicar esta heterogeneidad. El modelo estocástico para la iniciación tumoral predice que un tumor es un principio, biológicamente homogéneo y adquiere la heterogeneidad por azar al ocurrir eventos secundarios que alteran la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células individuales. Todas las células tumorales son igualmente sensibles a factores intrínsecos (por ejemplo, a los niveles de factores de transcripción, vías de señalización) o extrínsecos (por ejemplo, microambiente, la respuesta inmune) que afectan a las células individuales y por lo tanto puede generar heterogeneidad (Dick y cols, 2008).

Este modelo de carcinogénesis se fundamenta en los hallazgos encontrados en varias vías de señalización que han demostrado que regulan las células madre adultas que se alteran en enfermedades malignas, incluyendo las vías: Wnt canónica, Hedgehog y Notch (Jiang y cols, 2008; Koch y cols, 2007; Reya y cols, 2005; Klonisch y cols, 2009, Takano y cols, 2004; Thomas y cols, 2006; Thomas y cols, 2006). Además, existe una estrecha relación entre el patrón de expresión genético de las células madre embrionarias y el de algunos tumores malignos (Montero y cols, 2010).

3.1

CÉLULAS MADRES EN TEJIDOS TIROIDEOS BENIGNOS Y MALIGNOS, Y EN LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA TIROIDEO

El concepto de la carcinogénesis de múltiples pasos en el tiroides sugiere un proceso de desdiferenciación de las células foliculares tiroideas diferenciadas normales a un carcinoma tiroideo anaplásico o a un carcinoma papilar o folicular que ha sido recientemente cuestionado por distintas razones: 1) la baja tasa de proliferación de tirocitos adultos que limita la acumulación de mutaciones y otros cambios genéticos o epigenéticos, un requisito previo de la transformación celular, 2) la inconsistencia e incluso la ausencia de aberraciones moleculares en algunos carcinomas de tiroides diferenciado e indiferenciado, que no refleja un proceso de varios pasos, 3) la notable heterogeneidad morfológicas y funcional de los diversos carcinomas de tiroides, que difícilmente se puede atribuir a una sola lesión derivada de la célula, y 4) la detección de marcadores oncofetales en los carcinomas de tiroides y de restos de células fetales dentro de la glándula tiroides (Klonisch y cols, 2009; Kondo y cols, 2006). Más recientemente, como una hipótesis alternativa de la carcinogénesis del tiroides, se postuló el origen fetal de las células cancerosas (Takano y cols, 2004). Esta hipótesis puede ser una anticipación del modelo jerárquico de CSCs en tiroides, sin embargo aún no se ha comprobado dicha hipótesis. De hecho, las células madre adultas de un tejido específico comparten muchas características con las células madre embrionarias, incluyendo la capacidad de autorrenovación y diferenciación, pero se distinguen de las células madre embrionarias porque su diferenciación

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán



CÉLULAS MADRE Y
CÁNCER DE TIROIDES

se limita en gran medida a ciertos tipos de células en un órgano en particular. Por lo tanto, las CSCs de tiroides derivan de células madre adultas mutadas o células progenitoras comprometidas que puede no ser idénticas a células fetales como el origen del cáncer de tiroides, aunque comparten algunas propiedades con estas células.

Actualmente, se ha detectado y caracterizado células madre adultas tiroideas en tejidos normales del tiroides y bocio y supuestas CSCs procedentes de líneas celulares de carcinoma de tiroides (Thomas y cols, 2006; Fierabracci y cols, 2088; Mitsutake y cols, 2007; Zitu y cols, 2008; Firedman y cols, 2009). En la glándula tiroides humana, las células madre adultas y las células progenitoras se muestran como células dispersas individuales o en grupos por todo el tejido (Thomas y cols, 2006).

En la edición de JCEM, Malaguarnera et cols. (2007), revelaban la existencia de CSCs en el carcinoma papilar de tiroides. Demostraron que CSCs, aisladas como tiroferas, mostraban un patrón de expresión típico de marcadores de células madre y que sólo algunas eran marcadores de diferenciación, mientras que las células madre adultas derivadas de las tiroferas de los tejidos tiroideos normales conservaban la capacidad de diferenciarse en una progenie más diferenciada. En contraste, las células progenitoras derivadas de CSCs habían perdido la capacidad de generar una descendencia con un fenotipo diferenciado.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE Y CÁNCER DE TIROIDES

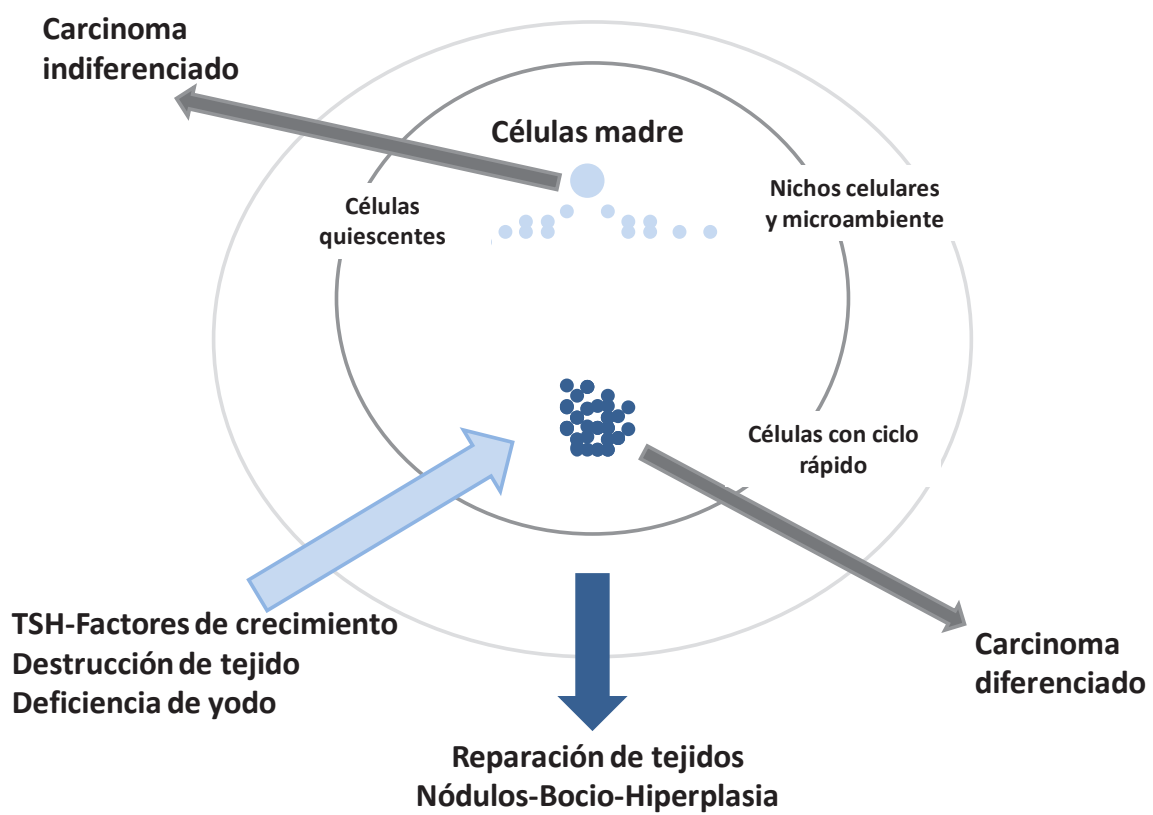


Figura 10. Hipótesis de células madre para cáncer de tiroides (Gibelli y cols, 2009)

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán



CÉLULAS MADRE Y
CÁNCER DE TIROIDES

Mientras que este trabajo estaba en desarrollo, Todaro y cols (2010), también informaron sobre el aislamiento de CSCs como tirosferas de carcinomas folicular, papilar e indiferenciado de tiroides. Interesantemente, las inyecciones ortotópicas de unas pocas CSCs de tiroides recapitulaba el comportamiento del tumor parental, incluyendo la metástasis agresiva del carcinoma indiferenciado de tiroides. Estos resultados son de suma importancia ya que se ha cuestionado la capacidad CSCs de tiroides para formar tumor. En realidad, sólo algunas de las poblaciones CSCs proceden de líneas celulares de carcinoma de tiroides conservan la capacidad de generar tumores en ratones inmunodeficientes o siendo incluso menos tumorigénicas in vivo que la población principal de las células cancerosas (Mitsutake y cols, 2007). Esta discrepancia puede explicarse por un lado, por las diferentes localizaciones de las inyecciones (ortotópico, es decir, dentro de la glándula tiroides, frente a una inyección subcutánea), lo que puede afectar tumorigenidad de las CSCs. Ciertamente, sólo las ortotópicas de CSCs proporcionan el microambiente óptimo para el crecimiento del tumor. Por otra parte, puede deberse a los diferentes marcadores que se han aplicado para el aislamiento de las CSCs y caracterización de la población heterogénea de las presuntas células madre (Visvader y cols, 2008).

3.2

SEÑALIZACIÓN IGF EN CÁNCER DE TIROIDES Y CSCs DERIVADAS DE CARCINOMAS PAPILARES

El receptor de IGF-I, es un receptor tirosin quinasa para IGF-I e IGF-II, que desempeña un papel en la transformación maligna, la progresión tumoral y metástasis en tumores malignos diferentes (Frasca y cols, 2008). La señalización IGF también está implicada en la regulación de células madre. IGF aumenta la expresión y actividad OCT-4 y Nanog, marcadores de células madre que son altamente expresados en CSCs derivadas de carcinoma papilar de tiroides, tal como se muestra en el actual trabajo de Malaguarnera et al. (Malaguarnera y cols (2011). Además, IGF puede mantener la capacidad de las células madre para autorrenovarse, diferenciarse, promover su supervivencia El receptor de IGF-I, es un receptor tirosin quinasa para IGF-I e IGF-II, que desempeña un papel en la transformación maligna, la progresión tumoral y metástasis en tumores malignos diferentes (Frasca y cols, 2008). La señalización IGF también está implicada en la regulación de células madre. IGF aumenta la expresión y actividad OCT-4 y Nanog, marcadores de células madre que son altamente expresados en CSCs derivadas de carcinoma papilar de tiroides, tal como se muestra en el actual trabajo de Malaguarnera et al. (Malaguarnera y cols (2011). Además, IGF puede mantener la capacidad de las células madre para autorrenovarse, diferenciarse, promover su supervivencia y la migración de las mismas (Bendall y cols, 2007). Cabe destacar que los distintos patrones de expresión de las diferentes isoformas del receptor de la insulina y el receptor IGF-I en las tiroferas procedentes de carcinoma papilar de tiroides o de tejido normal y en tejido tiroideo diferenciado enlaza la señalización de

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán



CÉLULAS MADRE Y
CÁNCER DE TIROIDES

IGF implicada en la regulación y diferenciación de las células madre tanto en tejidos benignos y malignos de tiroides.

Con respecto al reciente debate sobre la mayor incidencia de cáncer en pacientes con diabetes, obesidad y la importancia de la hiperinsulinemia en estas enfermedades, es sorprendente que tanto los IGFs como la insulina estimulan significativamente un aumento del volumen de las tiroferas y promueve el crecimiento de CSCs (Malaguarnera y cols, 2011; Vigneri y cols, 2006).

3.3

CONCEPTOS EMERGENTES EN LA CARCINOGENESIS DEL TIROIDES: RECONCILIACIÓN CON LA HIPÓTESIS CARCINOGENESIS TIROIDEA EN VARIAS ETAPAS CON EL MODELO DE CSC

El concepto que el adenoma de tiroides, y los carcinomas papilares, foliculares e indiferenciado de tiroides originados a partir células foliculares tiroideas bien diferenciadas, que acumularon múltiples mutaciones durante años o incluso décadas, ha estimulado la investigación sobre las aberraciones moleculares en estos tumores desde hace tiempo. Según el modelo clásico de carcinogénesis de múltiples pasos (Figura 11), se cree que las células

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán



CÉLULAS MADRE Y
CÁNCER DE TIROIDES

cancerosas de tiroides provienen generalmente de una acumulación secuencial de alteraciones genéticas durante el ciclo de vida de los tirocitos premalignos bien diferenciado, hasta la expresión de un fenotipo neoplásico, seguido del ilimitado crecimiento de clones (Kondo y cols, 2006). Hay dos clases de genes, en los que las mutaciones son de particular importancia en la carcinogénesis: 1) los genes supresores de tumores, en ellos las mutaciones son eventos importantes en la progresión tumoral y 2) los oncogenes, genes anormales generados mediante mutación/activación de los proto-oncogenes "normales". Los reordenamientos cromosómicos que conduce a la expresión de oncogenes con dominio tirosina quinasa son hallazgos comunes en los cánceres de tiroides diferenciados (Kim y cols, 2003).

EL primer receptor tirosin quinasa desregulado, el proto-oncogen RET, se localiza en el cromosoma 10 y codifica un receptor tirosin quinasa transmembrana que está implicado en las primeras etapas de la patogénesis de los carcinomas papilar y medular de tiroides. Los mecanismos de activación RET son diversos: encontrándose una mutación puntual en el caso del carcinoma medular y un reordenamiento intra o inter-cromosómica (RET / PTC) para el carcinoma papilar, con mayor prevalencia en PTCs inducidos por radiación y una prevalencia mucho menor en tumores esporádicos.

La segunda alteración se debe a una mutación puntual en el proto-oncogen B-RAF, que se encuentra en el cromosoma 7 y que se encuentra implicado en la vía de transducción de señal de MAPK, y que están estrechamente vinculados en los eventos tempranos del carcinoma papilar, y más frecuentemente en

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán



CÉLULAS MADRE Y
CÁNCER DE TIROIDES

tumores esporádicos y excepcionalmente en PTCs inducidos por radiación (Fagin y cols, 2008).

Otro reordenamiento cromosómico en los carcinomas papilares implica el proto-oncogen NTRK1 (receptor de la tirosina quinasa neuotrófico), ubicado en el cromosoma 1, que forma con oncogenes quiméricos diferentes patrones, y que está implicado en varias cascadas de señalización celular.

Finalmente, el oncogén RAS está involucrado en los primeros pasos de la transformación de las células foliculares del tiroides, y se han encontrado mutaciones puntuales en RAS tanto en adenomas como en carcinomas foliculares. Un papel crucial en la progresión del adenoma folicular y del carcinoma folicular parece ser una translocación que genera un gen quimérico, PAX8-PPAR (Nikiforowa y cols, 2008; Zhu y cols, 2009).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE Y CÁNCER DE TIROIDES

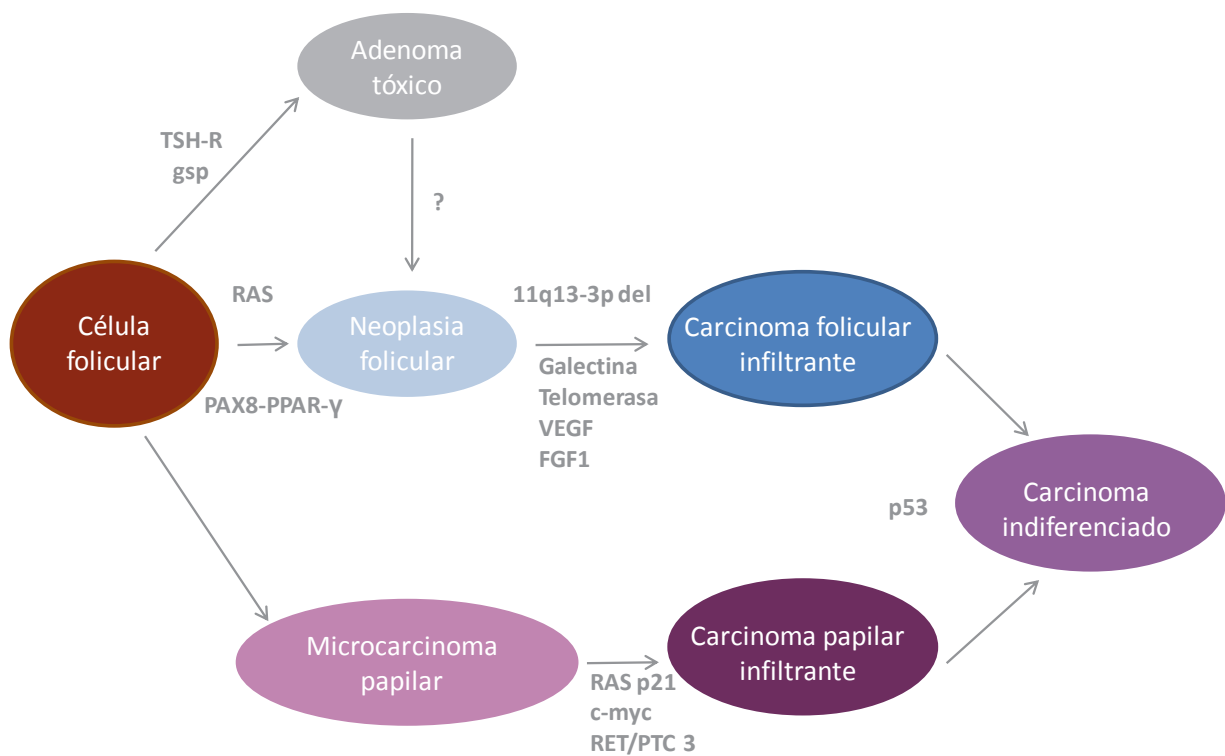


Figura 11. Patógenesis en múltiples pasos en el cáncer tiroideo diferenciado

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán



CÉLULAS MADRE Y
CÁNCER DE TIROIDES

El concepto actual de la patogénesis del carcinoma indiferenciado de tiroides es que puede evolucionar a través de desdiferenciación de los carcinomas foliculares o papilares y la alteración genética más frecuente encontrada en la transición tardía a carcinoma indiferenciado de tiroides implica la inactivación mediante una mutación puntual de p53 (Kondo y cols, 2006; Kim y cols, 2003; Suarez y cols, 2003).

Como se ha descrito existe un importante conocimiento de alteraciones de vías de señalización, receptores, de mecanismos de regulación, alteraciones cromosómicas, y de cambios epigenéticos (Kondo y cols, 2006).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CÉLULAS MADRE Y CÁNCER DE TIROIDES

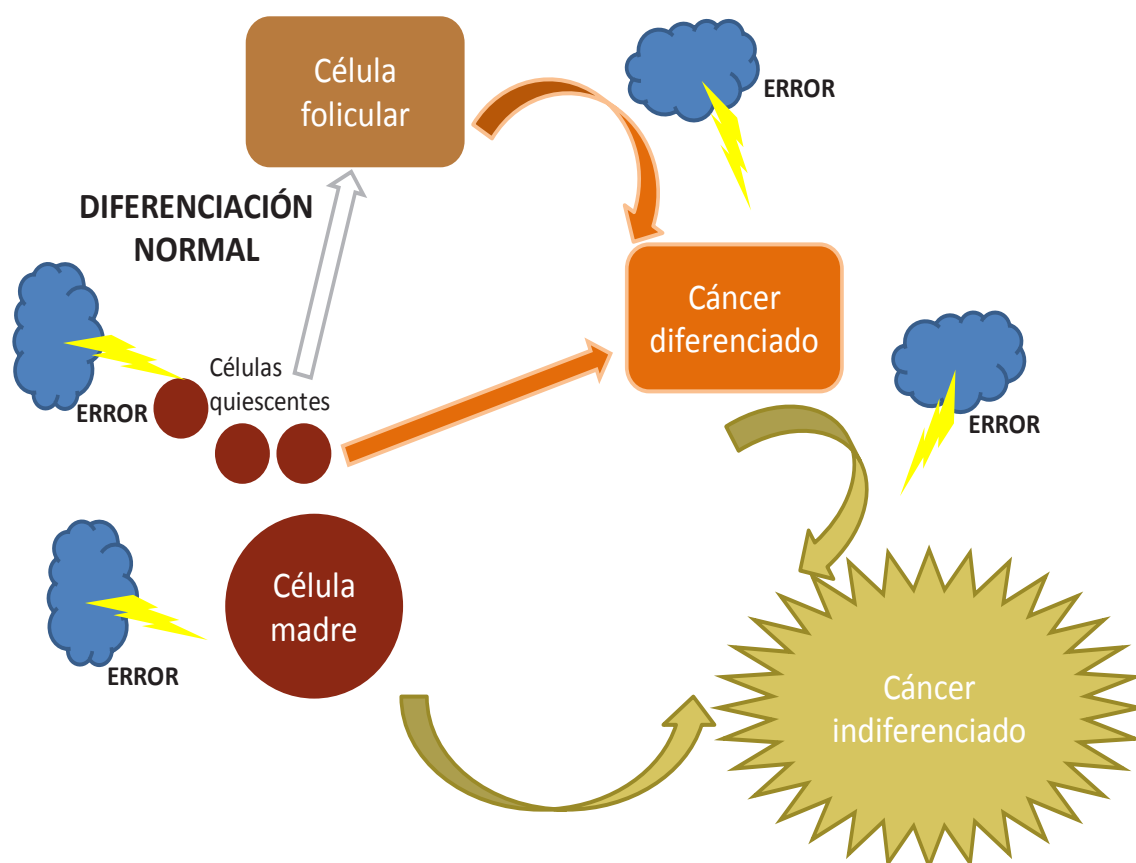


Figura 12. Células madre y ruta de múltiples pasos para el cáncer de tiroides (Gibelli y cols, 2009)

Los resultados recientemente publicados de Todaro y cols. (2010) han revelado una activación constitutiva de CMET y Akt en las CSCs no diferenciadas derivadas de tejidos de cáncer de tiroides lo que vincula algunos detalles del conocimiento actual de la patogénesis molecular del cáncer de tiroides para CSCs. De hecho, la activación aberrante de β -catenina y Met se ha descrito en diversos tumores humanos, incluyendo el cáncer de tiroides (Cassinelli y cols, 2009). Nuevas investigaciones serán necesarias para reconciliar el conocimiento de las mutaciones genéticas y de los cambios epigenéticos en el cáncer de tiroides con el concepto de CSC.

3.4

POTENCIAL METÁSTASICO DE CSCs

Todaro y cols. (2010) han descrito características agresivas metastásicas de CSCs provenientes de carcinomas indiferenciados de tiroides después de un trasplante ortotópico en ratones inmunodeficientes, lo que plantea la cuestión que si las metástasis derivan directamente de CSCs (Visvader y cols, 2008). Para las neoplasias epiteliales, la transición epitelio-mesenquimal se considera crucial en el proceso metastásico, lo que implica la interrupción de la homeostasis de las células epiteliales y la adquisición de un fenotipo mesenquimal migratorio. Se cree que la transición epitelio-mesenquimal se relaciona con la adquisición de propiedades de células madre. Sin embargo, aún no se ha comprobado si esto se debe a las CSCs o a una generación de CSCs distintas metastásicas dentro de un tumor o la evolución de un

segunda CSC con un inmunofenotipo distinto de la CSC de origen (Visvader y cols, 2008), lo que puede tener una importante relevancia clínica.

3.5

POSIBLE PAPEL DE LOS SCNs EN EL CÁNCER DE TIROIDES

Como parte de la búsqueda general para identificar poblaciones específicas de células madre en una serie de órganos y tejidos, tanto en pacientes sanos y enfermos, algunos autores han postulado el posible papel de las células madre de los SCNs en la glándula tiroides (Ríos y cols, 2011), algunos estudios lo han vinculado a la génesis de varios tumores, incluyendo el carcinoma papilar, mucoepidermoide y escamosas (Harach y cols, 1993; Camesselle-Tejeiro y cols, 1996; Camesselle-Tejeiro y cols, 1995, Burstein y cols, 2004). Recientemente se ha publicado un estudio biomolecular que ha demostrado la presencia de la misma mutación BRAF (V600E) en los SCNs y en el carcinoma micropapilar, sugiriendo una relación histogenética entre SCN y el carcinoma papilar de tiroides (Camesselle-Tejeiro y cols, 2009). Por otro lado, en un trabajo publicado en este año, se ha detectado una lesión central de un tumor de tiroides encapsulado demostró pose un perfil inmunohistoquímico similar al SCN en el tumor de manera que los autores creen que puede representar el primer caso documentado de un tumor de SNC (Eloy y cols, 2011).

La literatura, ofrece puntos de vista contradictorios sobre la posible relación entre células madre, el carcinoma de tiroides y los SCNs sin embargo, todas estas opiniones se basan en los perfiles de inmunohistoquímica, en los que no se ha valorado marcadores específicos de células madre (Camesselle-Tejeiro y cols, 2005; Burstein y cols, 2005).

3.6

CSCs DERIVADAS DE CÁNCER DE TIROIDES: IMPLICACIONES CLÍNICAS Y PERSPECTIVAS

El aislamiento y caracterización de las CSCs de cáncer de tiroides tienen importantes implicaciones clínicas que pueden en el futuro mejorar el diagnóstico de cáncer de tiroides y puede conducir al desarrollo de nuevas opciones de tratamiento para el carcinoma indiferenciado de tiroides que carecen de captación de yodo suficiente y son bastante resistentes a la quimioterapia convencional y la radioterapia. Esta conclusión se basa en los siguientes supuestos. En primer lugar, un conocimiento detallado de las células iniciadoras del tumor puede proporcionar nuevos conocimientos sobre los primeros pasos celulares de la carcinogénesis y puede conducir a la detección de nuevos marcadores para mejorar el diagnóstico de las neoplasias de tiroides, por ejemplo, con respecto a la biopsia por aspiración con aguja fina. En segundo lugar, estudios patogenéticos, sobre el microambiente celular que controla el crecimiento y función de las células madre adultas (Visvader y cols, 2008), pueden responder a la pregunta de cuando una célula madre que ha acumulado varias aberraciones genéticas durante un largo

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán



CÉLULAS MADRE Y
CÁNCER DE TIROIDES

período de tiempo atraviesa la barrera para iniciar crecimiento tumoral. Este conocimiento puede ser de suma importancia para el diagnóstico precoz y la prevención del cáncer. En tercer lugar, se ha demostrado que las CSCs son más resistentes a la quimioterapia y la radioterapia que la población principal de las células cancerosas. Lo que parece predecir una quimiosensibilidad del tumor, de forma que se debería evaluar la resistencia a ciertos fármacos de las CSCs mediante ensayos in vitro, que en definitiva puede ofrecer estrategias individualizadas y tratamientos altamente específicos para pacientes con carcinoma indiferenciado de tiroides con una baja o ausente cantidad de simportadores de yoduro sódico y por tanto no captan yodo radioactivo.

De hecho, hace muy poco se ha demostrado que la quimioterapia con doxorubicina no elimina las células cancerosas tiroideas anaplásicas ni detiene el progreso del tumor lo que podría ser debido a la falta de medicamentos efectivos para las CSCs (Zheng y cols, 2010). Considerando que la principal población de células de cáncer muere por la quimioterapia, la fracción de CSCs son relativamente resistentes a la doxorubicina y de esta forma pasan a tener una proporción elevada de las células tumorales. La exposición a largo plazo a la doxorubicina aumentó el porcentaje de CSC al 80% de las células tumorales. El mal resultado de la quimioterapia con doxorubicina en células indiferenciadas cáncer de tiroides puede ser explicado por la sobre-regulación de diferentes transportadores resistentes a múltiples fármacos de la familia de genes ABC, incluyendo los transportadores ABCG2 (transportador resistente a multi-fármacos) y MDR1 que exporta la droga fuera de las CSCs

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán



CÉLULAS MADRE Y
CÁNCER DE TIROIDES

y de esta forma confiere resistencia a estas células y mantiene el crecimiento del tumor (Zheng y cols, 2010).

Para los carcinomas indiferenciados de tiroides que no pueden ser tratados por la absorción de yodo radioactivo, las estrategias terapéuticas deben no sólo estar dirigidas a eliminar población principal de células de cáncer de tiroides, sino también a las CSCs que parecen ser responsables de la progresión del tumor y la recidiva.

PLANTEAMIENTO DEL TEMA



NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

PLANTEAMIENTO DEL TEMA

Los SCNs de células del tiroides han fascinado a los patólogos, desde que fueron descritos por primera vez por Getzowa en 1907. Aunque ampliamente se acepta que los nidos sólidos y los llamados folículos “mixtos” son en realidad restos del cuerpo ultimobranquial, su significado biológico sigue aún siendo controvertido. Se ha sugerido que estos restos embrionarios puede ser el origen de ciertas estructuras ectópicas que raramente están presentes en la glándulas tiroidea, así como de ciertos tipos de tumor tiroideo. También se ha apuntado que las células principales podría ser células pluripotenciales que contribuyen a la histogénesis de las células C y las células foliculares y de ciertos tumores del tiroides, sin embargo poco se ha investigado al respecto. Si este fuera el caso, en las células principales se podría esperar un fenotipo de células madre, con capacidad tanto para autorrenovarse, o diferenciarse y de existir en una forma mitóticamente inactiva, si bien estas propiedades no están siempre presentes en todas las células madre de tejidos humanos.

Por otra parte, los SCNs pueden ser una fuente de confusión en la patología tiroidea, ya que pueden imitar una serie de trastornos patológicos como la metaplasia escamosa, el carcinoma escamoso metastásico, el microcarcinoma papilar, el carcinoma medular y la hiperplasia de células C.

En el presente estudio se pretende analizar y caracterizar los marcadores de diferenciación tiroidea (p63, bcl-2, citoqueratina 19, galectina-3, TTF-1, tiroglobulina, calcitonina), así como marcadores de células madre (OCT4 y SALL4) en los nidos sólidos que se encuentran en la hiperplasia nodular.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL Y MÉTODO



1. TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio retrospectivo casos. Este estudio fue aprobado por el comité ético local, y se respetaron los principios establecidos en la declaración de Helsinki.

2. POBLACIÓN ESTUDIADA Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se incluyeron de forma consecutiva y aleatoria 10 pacientes diagnosticados de hiperplasia nodular con SCNs celulares en el Hospital Infanta Luisa de Sevilla, en el periodo de abril de 2010 a agosto de 2010. Las muestras se obtuvieron durante una tiroidectomía total.

Se revisó la historia clínica de los pacientes incluidos en el estudio.

3. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Las muestras se fijaron en formol tamponado al 10%, se incluyeron en parafina de forma rutinaria y se tiñeron cortes de 5 μm con hematoxilina-eosina. De cada caso se observaron todas las preparaciones disponibles (entre 1 y 5). El diagnóstico histológico fue realizado por dos patólogos a doble ciego.

4. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Para llevar a cabo el análisis de expresión de p63, bcl-2, citoqueratina 19 (CK19), galectina-3 (GAL-3), factor de transcripción tiroideo (TTF-1), tiroglobulina (TG), calcitonina (CT), OCT4 Y SALL4, 4 µm de cada muestra fueron teñidas con un panel de anticuerpos (Tabla I) utilizando la técnica complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa. Se incluyeron controles negativos (el anticuerpo primario se sustituyó por suero del ratón no inmunes) y positivos en cada serie. El protocolo utilizado fue el siguiente:

4.1

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- Utilizar tejido fijado en formol tamponado al 10%.
- Realizar cortes de 4 µm en portaobjetos xilanizados.
- Secar durante dos horas en estufa a 60° C.

4.2

PRETRATAMIENTO:

- Desparafinar e hidratar con gradiente decreciente de etanol.
- Agua oxigenada al 2% en metanol para eliminar peroxidasa endógena.
- Alcohol 96%.
- Agua destilada.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

MATERIAL Y MÉTODO

- PBS.
- Desenmascarar antígenos mediante digestión enzimática en tripsina colocando los cristales en la placa caliente unos 20-30 minutos.
- Lavar con PBS.

4.3

TÉCNICA

- PBS.
- Anticuerpo primario, 30 min.
- Lavado en PBS.
- Anticuerpo biotinado.
- Lavado en PBS.
- Estreptavidina.
- Lavado en PBS.
- Cromógeno, 10 min.
- Lavado en PBS y luego en agua destilada.
- Hematoxilina acuosa, 3 min.
- Pasar por agua caliente y montar en medio acuoso.

4.4

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Todos los controles dieron resultados satisfactorios. Un mínimo del 10% de tinción positiva se adoptó como un punto de corte para todos los marcadores. Para p63 y TTF-1, sólo la tinción nuclear se considera específica, mientras que para otros marcadores, sólo se aceptó la tinción citoplasmática. En cambio la tinción de GAL-3 se consideró positiva cuando se observa tanto en el núcleo como en el citoplasma. Para los marcadores OCT4 y SALL 4 se evaluó tinción nuclear y citoplasmática.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

MATERIAL Y MÉTODO

Antígeno	Anticuerpo	Dilución
Calcitonina	Polyclonal (BioGenex, San Ramon CA)	1:5000
TTF-1	8G7G3/1 (Dako, Glustrup, Denmark)	1:2000
Tiroglobulina	DAK-Tg6 (Dako, Glustrup, Denmark)	1:2000
CK 19	RCK108 (Dako, Glustrup, Denmark)	1:100
P63	4A4 (Dako, Glustrup, Denmark)	1:50
Bcl-2	124 (Dako, Glustrup, Denmark)	1:20
Galectina-3	9C4 (Dako, Glustrup, Denmark)	1:200

Abreviaturas: *TTF-1* factor de transcripción tiroideo-1, *CK 19* citoqueratina 19

Tabla II. Anticuerpos primarios usados para el análisis inmunohistoquímico.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de resultados se ha utilizado el paquete estadístico SPSS 18.0. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar. Para comparar las edades entre hombres y mujeres se llevo a cabo un análisis de varianza ANOVA. Se consideró el nivel de significación para un valor de $p \leq 0.05$

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

RESULTADOS



NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán



RESULTADOS

1. ESTUDIO HISTOLÓGICO Y CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

Se estudiaron muestras provenientes de 15 pacientes (8 hombres y 7 mujeres), con edades comprendidas entre los 36 y 70 años. La media de edad de los hombres fue de 53 ± 9 años y la de las mujeres de 49 ± 13 , no existiendo diferencias significativas entre los pacientes de ambos sexos, de forma que ambos grupos tenían edades comparables.

Todos presentaron niveles normales de las hormonas tiroideas T3, T4 y TSH y fueron diagnosticados de hiperplasia nodular. En la tabla II se describe la edad, sexo y estado funcional de cada uno de los pacientes.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán



RESULTADOS

Caso	Edad (años)	Sexo (H/M)	T3, T4, TSH	DP
1	64	M	ELN	HN
2	45	H	ELN	HN
3	43	M	ELN	HN
4	36	M	ELN	HN
5	70	M	ELN	HN
6	37	M	ELN	HN
7	44	H	ELN	HN
8	69	H	ELN	HN
9	62	H	ELN	HN
10	46	H	ELN	HN
11	53	H	ELN	HN
12	45	M	ELN	HN
13	48	M	ELN	HN
14	51	H	ELN	HN
15	58	H	ELN	HN

Abreviaturas: ELN en límites normales, DP diagnóstico patológico, H/M (Hombre/Mujer), HN Hiperplasia nodular

Tabla III. Resumen de las características clinicopatológicas de los pacientes

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

En todos los casos se detectó SCNs formados por una compleja mezcla de células principales y células C, tal como se ha descrito en la introducción (Fig 13). Las células principales aparecieron con rasurados nucleares frecuentes. Entremezcladas con las células principales, y confinadas en la periferia de los SCNs, las células C fueron numéricamente menos visible y se caracterizaban por citoplasma claro y vacío, así como por núcleos redondeados. En seis de los casos, el 60% los SCNs contenían una mezcla de folículos mixtos y estructuras delimitadas por células principales y epitelio folicular con coloide y/o material eosinófilo en el lumen (Fig. 14).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

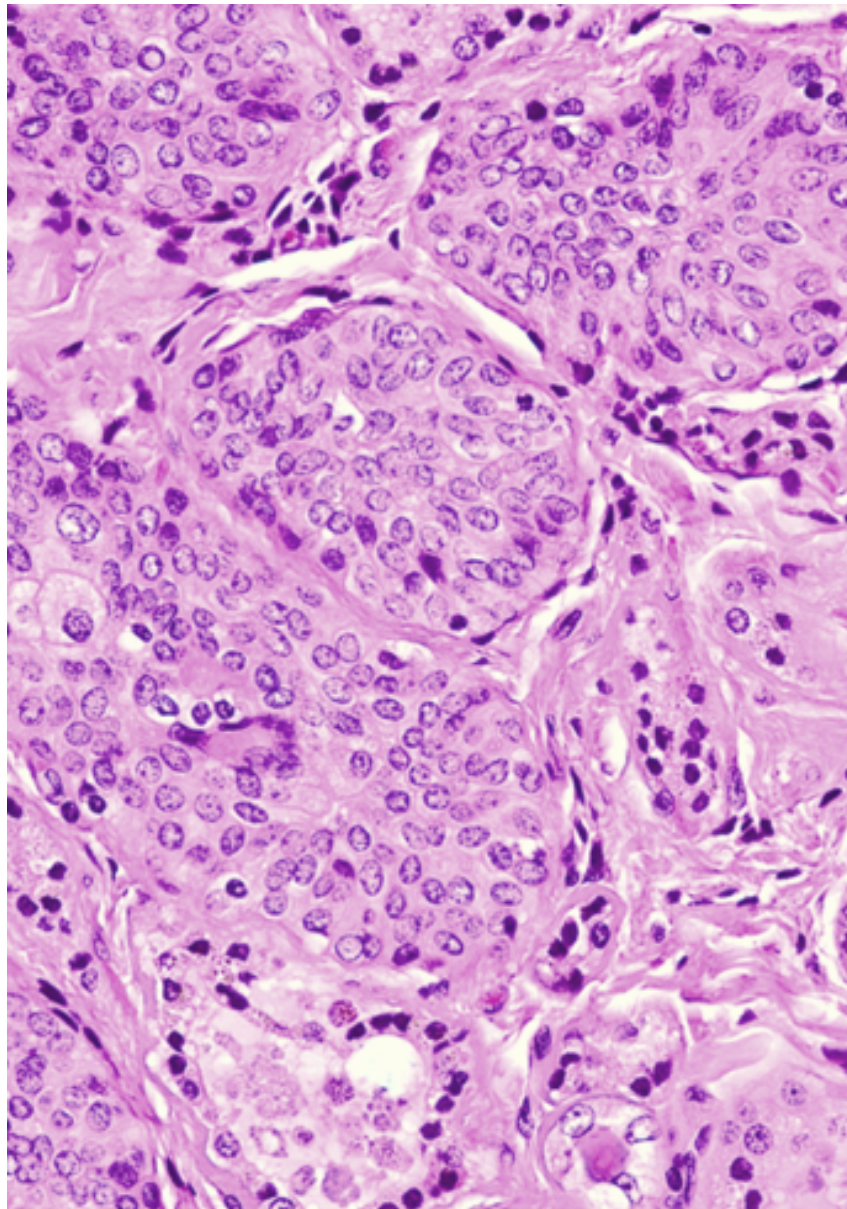


Figura 13. SCN de un tiroides humano compuesto por una mezcla de células principales y células C (H/E x20).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

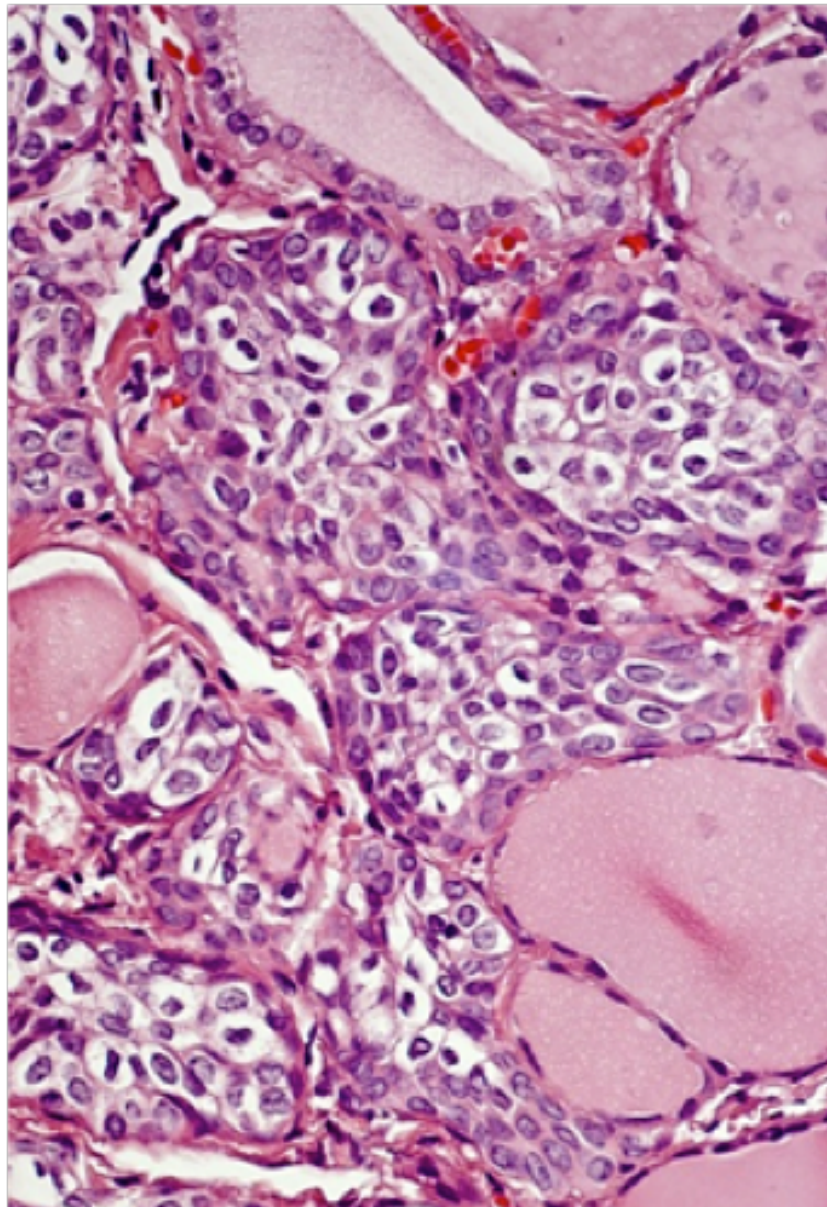


Figura 14. SCNs quístico. Mezcla de folículos compuesto por células que recuerdan a las células principales de los SCNs y células cúbicas dispuestas en una estructura folicular (H/E, $\times 40$)

2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

La inmunotinción positiva para p63 se restringió a las células principales de los nidos sólidos. (Fig. 15). En todos los cortes analizados, no se detectó inmunotinción en las células C. Tampoco se detectó inmunotinción positiva para p63 en el tejido tiroideo subyacente. En todas las secciones de tejido las células principales mostraron una intensa tinción para bcl-2, mientras que la tinción fue negativa en las células C (Fig. 16).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

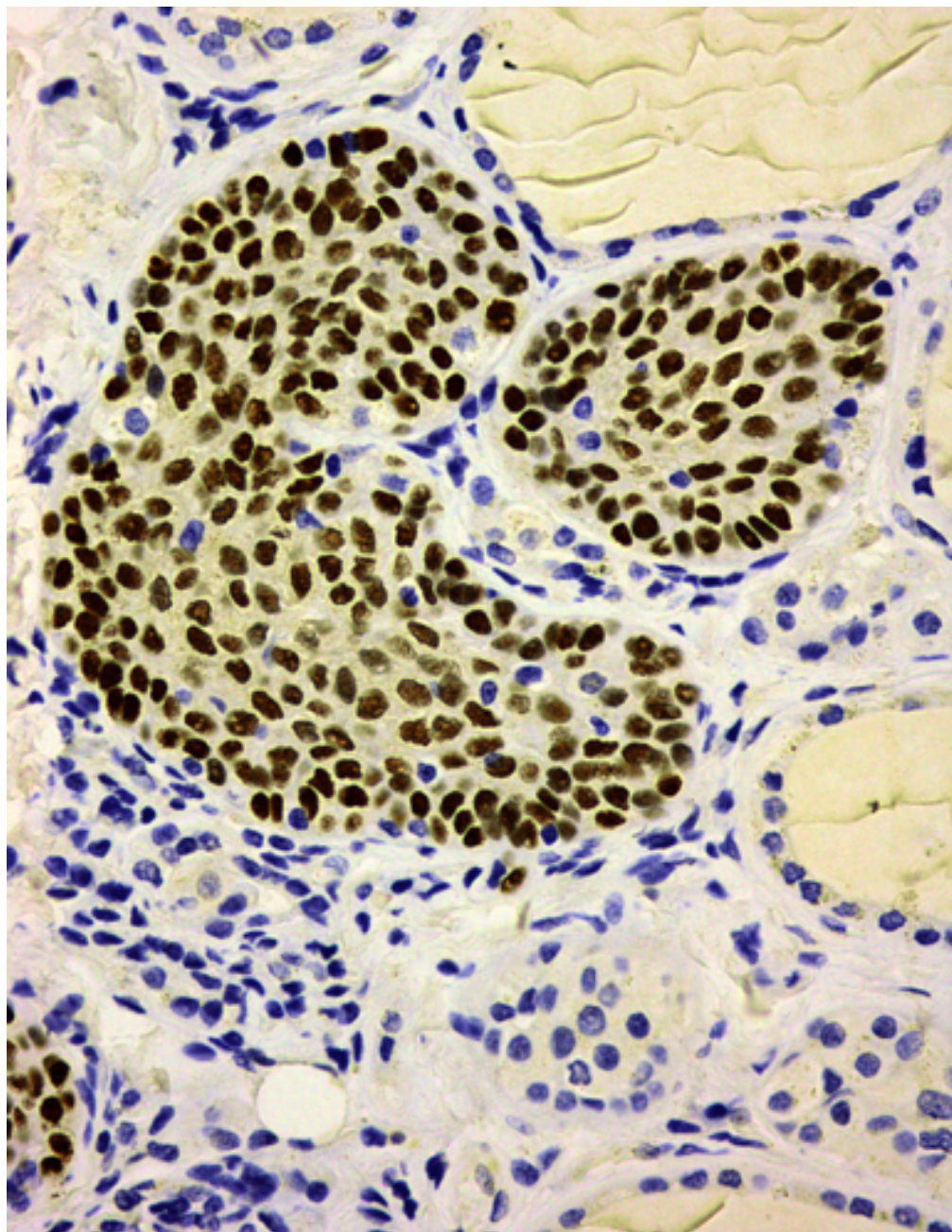


Figura 15. Análisis inmunohistoquímico de p63 donde se observa una intensa tinción nuclear en las células principales (x40).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

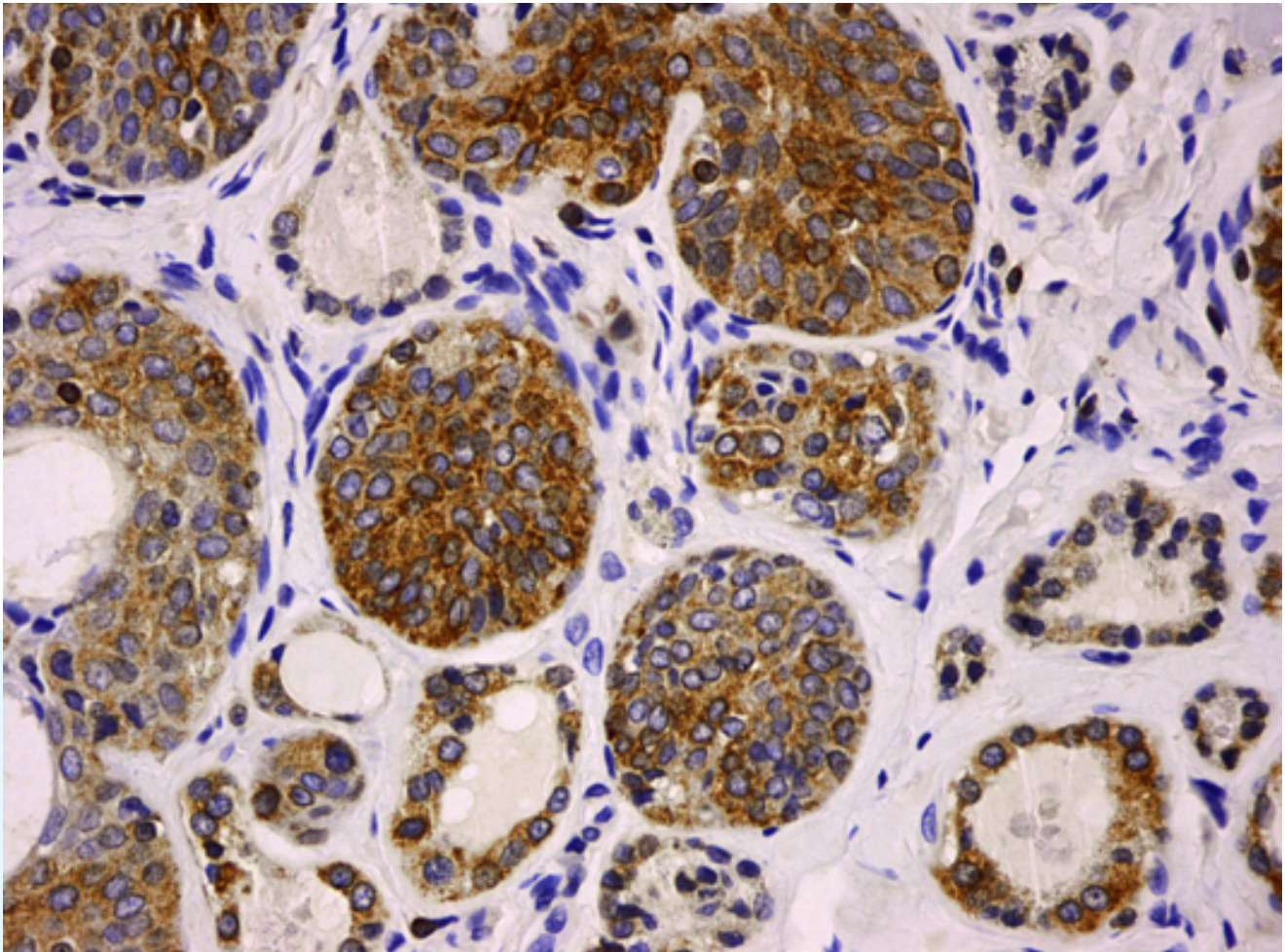


Figura 16. Análisis inmunohistoquímico de bcl-2 en el que se detecto una intensa tinción citoplasmática en las células principales (x40).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

Se detectó inmunoreacción positiva para CK19 en las células principales así como en las células de los folículos mixtos y algunos folículos adyacentes (5) (Figura 17). En todos los cortes analizados, tanto las células principales como las células C mostraron una intensa tinción nuclear y citoplasmática para GAL-3 (6). No se detectó inmunotinción de GAL-3 en el tejido tiroideo subyacente. (Figura 18).

TG se considera el marcador más específico de diferenciación folicular tiroideo. En este estudio, ninguno de los SCNs fueron positivos para TG (Figura 18). Por el contrario, las células foliculares tiroideas y el coloide mostraron una fuerte tinción positiva de TG. Tinción de CT se detectó en las células C de todos los SCNs y en las células parafoliculares del tejido tiroideo subyacente (Figura 19). Se detectó inmunoreacción en todas las células diferenciadas del parénquima tiroideo y en algunas células de los SCNs, principalmente en aquellas que forman folículos mixtos (Figura 20). No se detectó inmunotinción de PTH ni en SCNs ni en el tejido tiroideo circundante (Figura 21). Sólo dos casos mostraron tinción citoplasmática granular para OCT4 y todos los casos fueron negativos SALL4 (Figuras 22 y 23).

Los resultados del análisis inmunohistoquímico se resumen en la Tabla IV.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

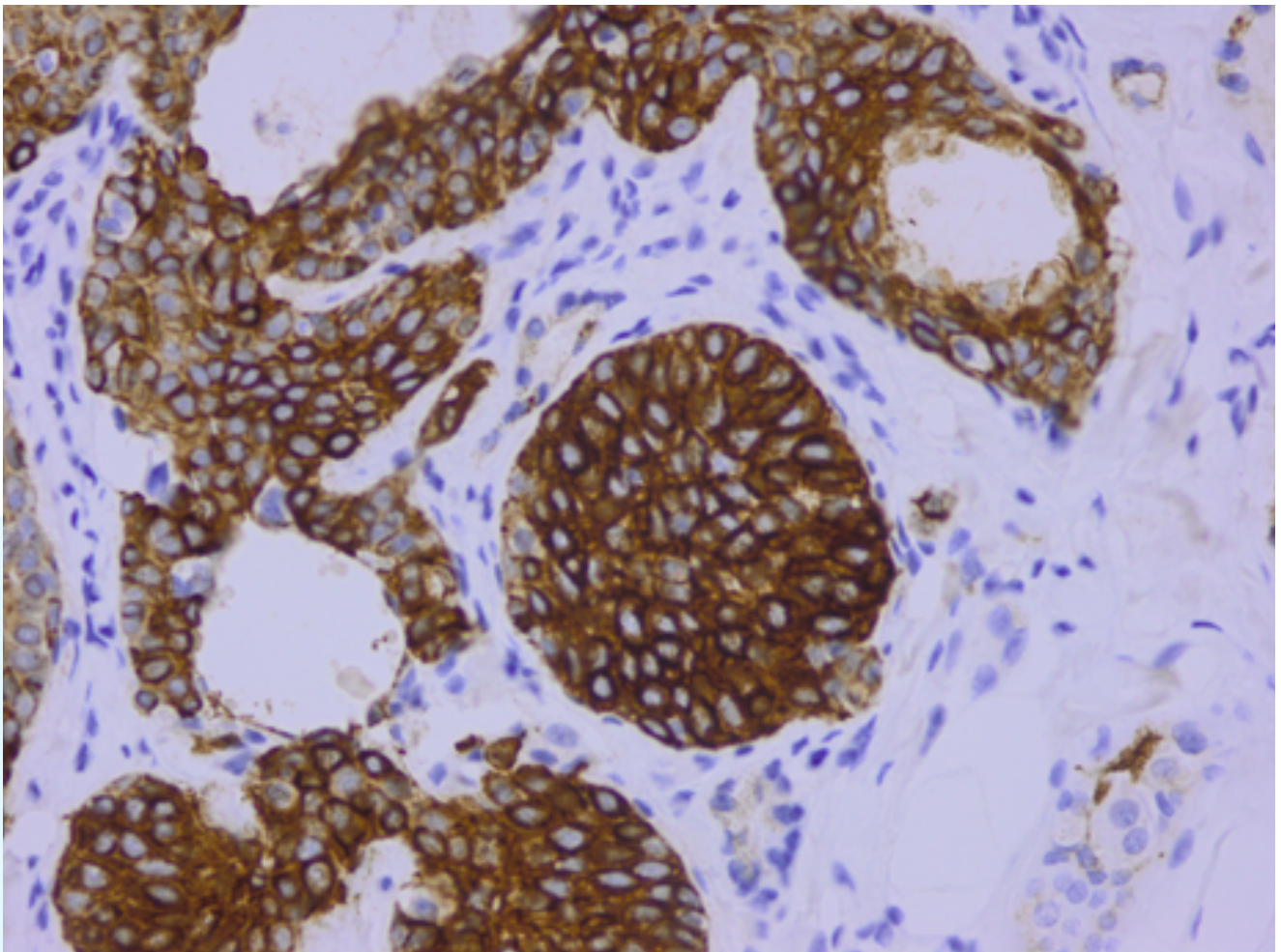


Figura 17. Inmunohistoquímica de CK 19 con positividad citoplasmática moderada en las células principales (x40).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

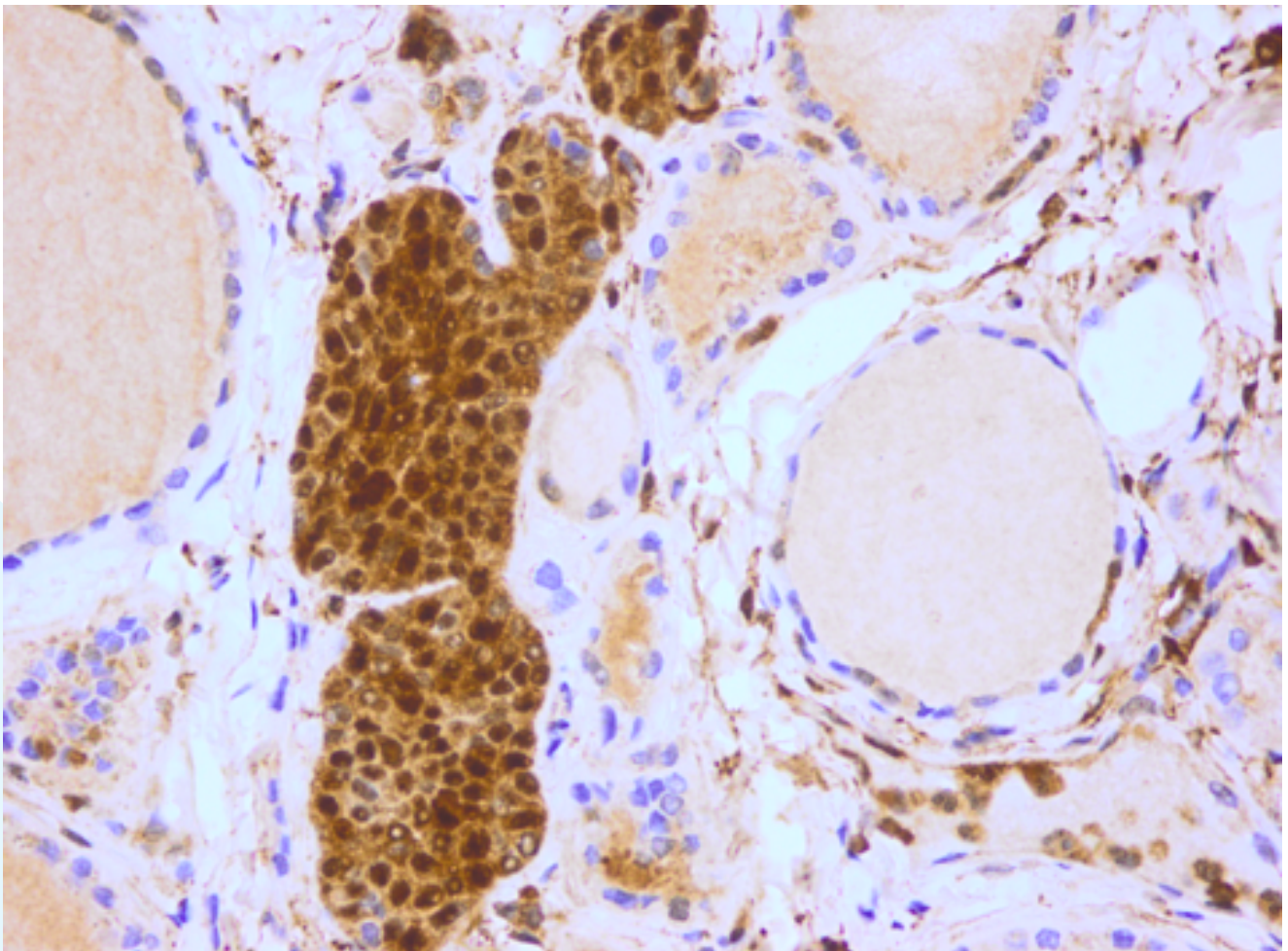


Figura 18. Inmunohistoquímica de GAL-3 con positividad nuclear y citoplasmática intensa tanto en las células principales como en las células C (x40).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

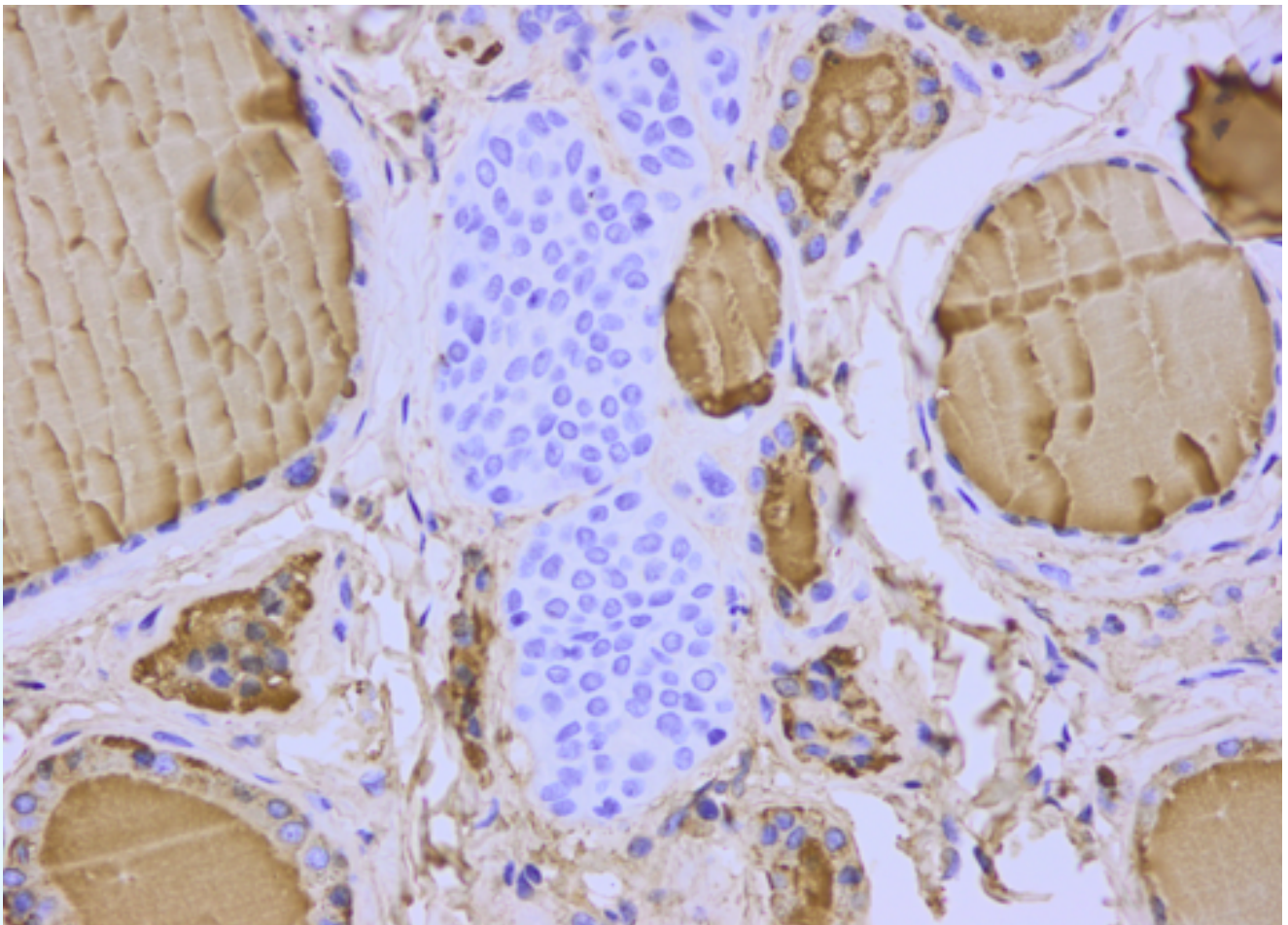


Figura 19. Análisis inmunohistoquímico de TG que fue negativo tanto en las células principales como en células C (x40)

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

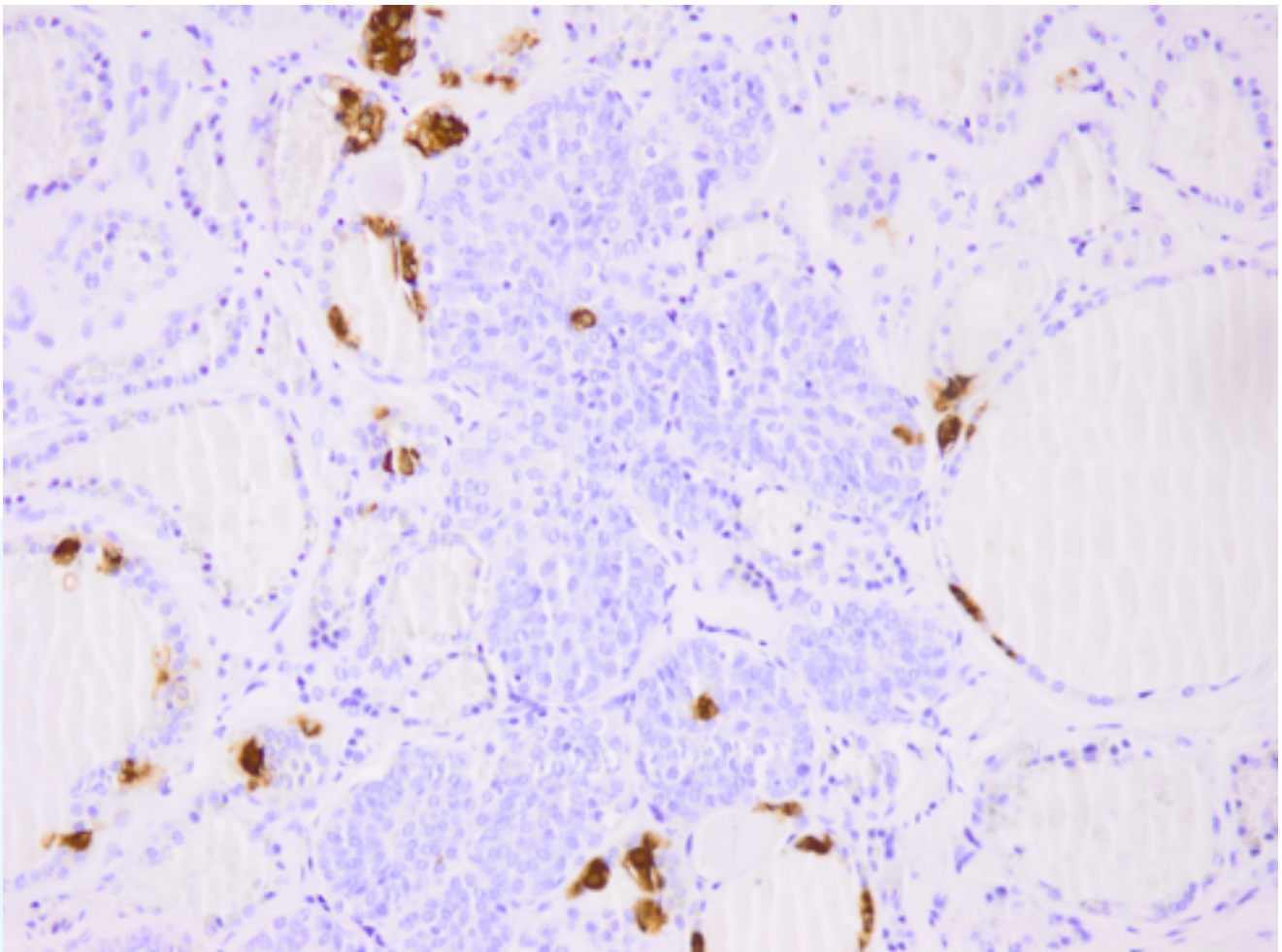


Figura 20. Inmunohistoquímica de CT con positividad citoplasmática moderada en las células C (x40).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

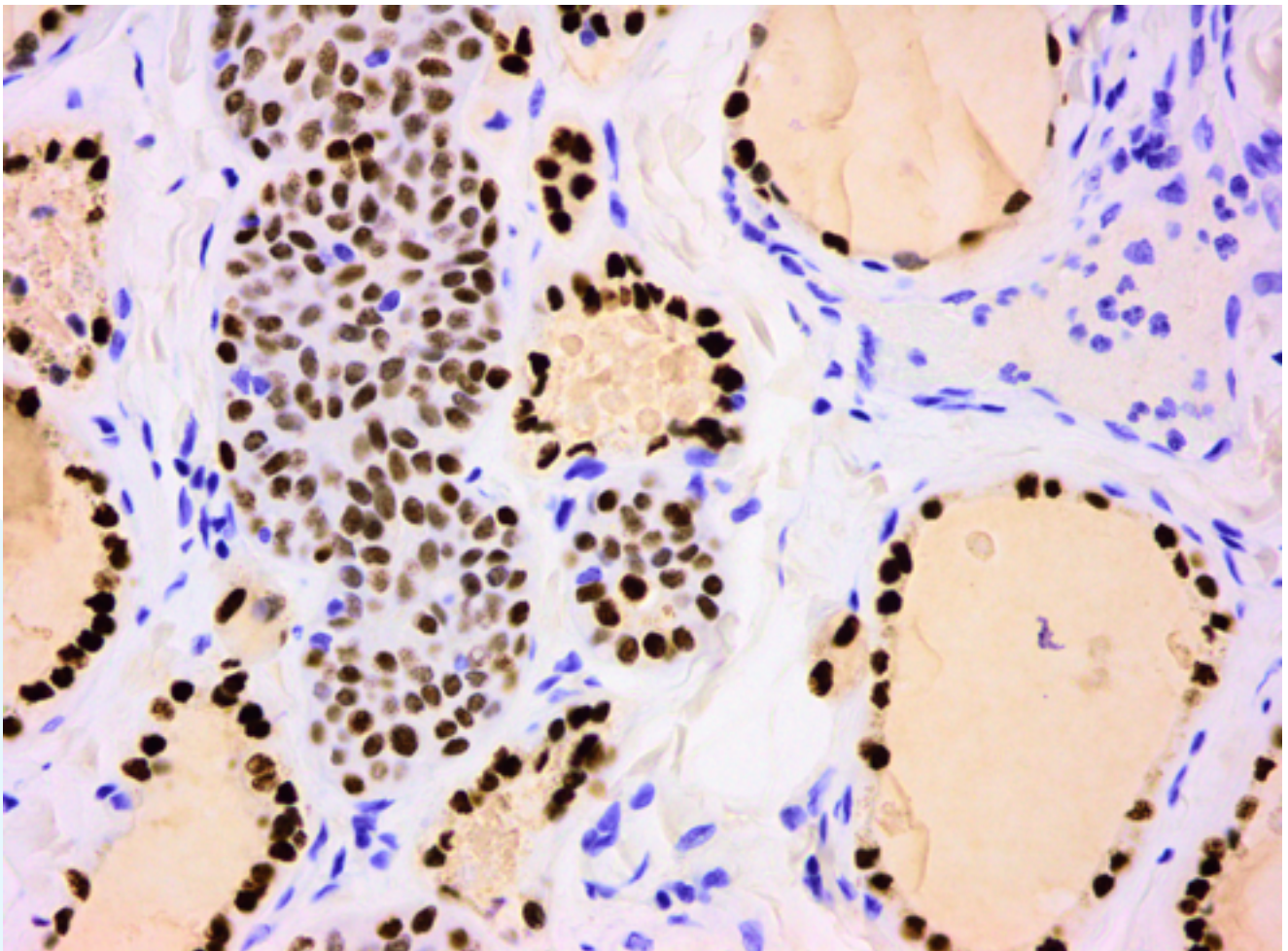


Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de TTF-1 en el que se detectó tinción nuclear en un pequeño número de células de los SCNs, principalmente en aquellas que forman folículos mixtos (x40).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

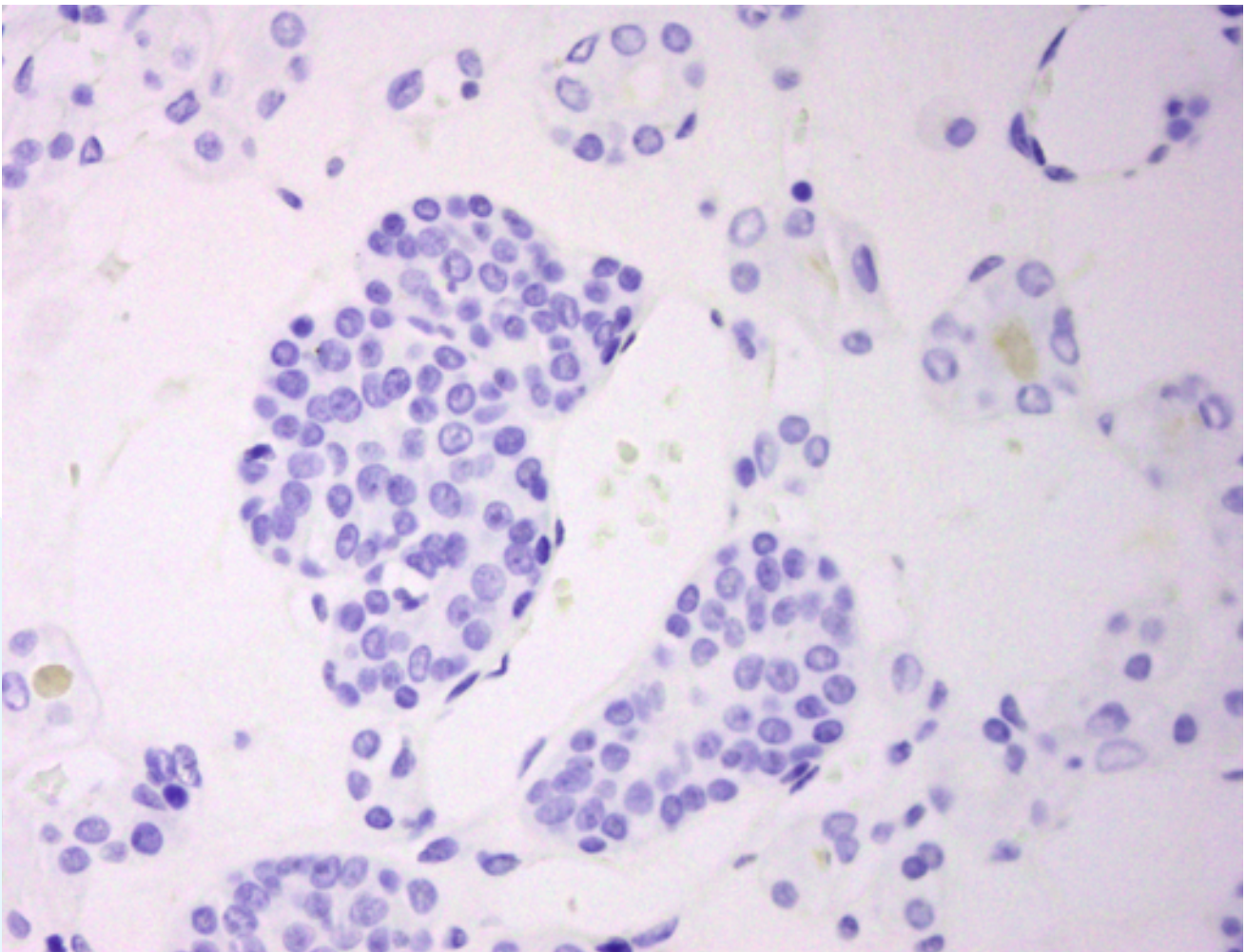


Figura 22. Inmunohistoquímica de PTH negativa tanto en células principales como en las células C (x20).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

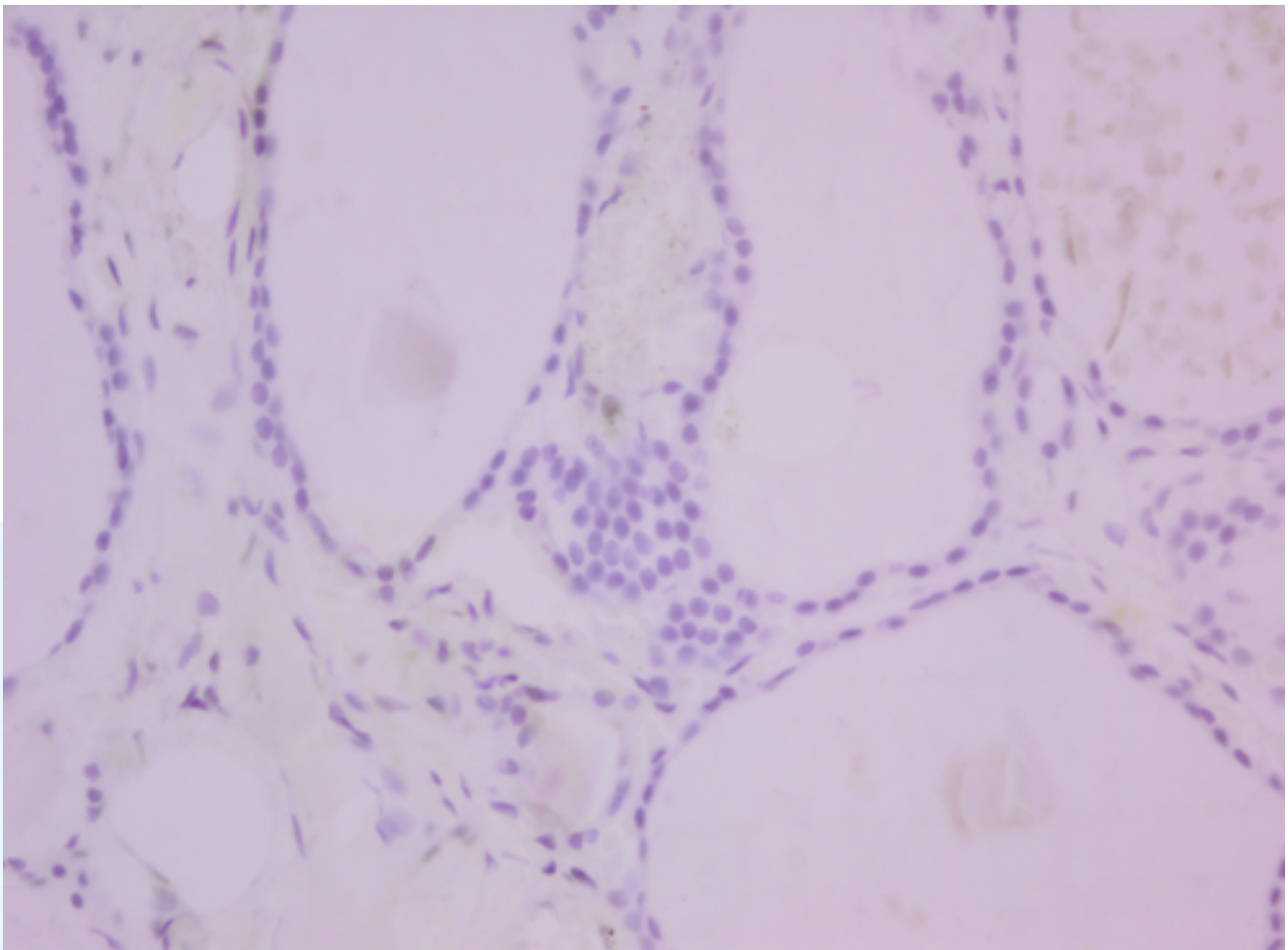


Figura 23. Inmunohistoquímica de OCT4 negativa tanto en células principales como en las células C (x40).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESULTADOS

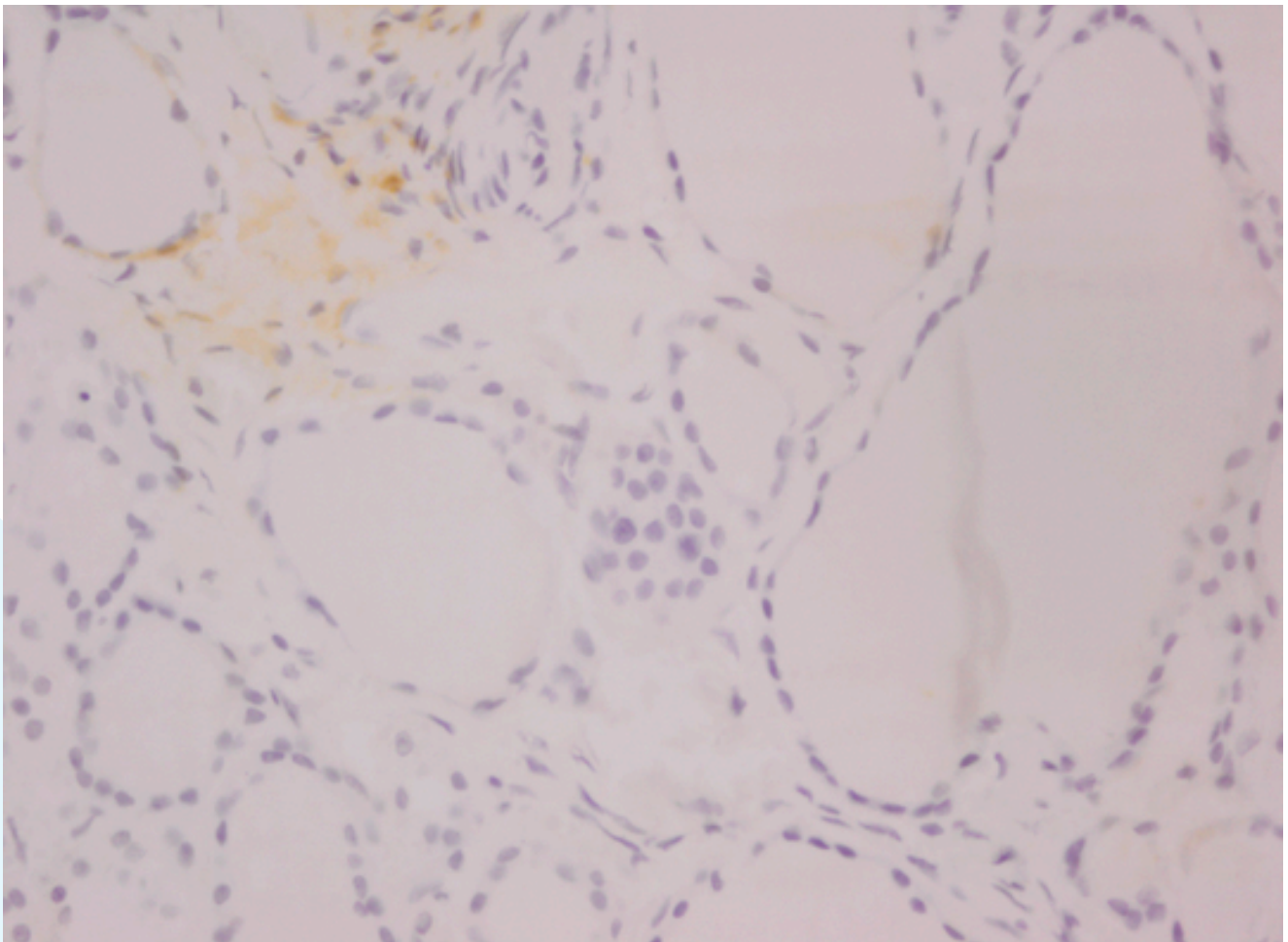


Figura 24. Inmunohistoquímica de SALL4 negativa tanto en células principales como en las células C (x40).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán



Caso	Células principales							Células C						
	p63	bcl-2	CK19	GAL-3	TG	TTF-* 1	CT	p63	bcl-2	CK19	GAL-3	TG	TTF-1	CT
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
8	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
11	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
13	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
14	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
15	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

Tabla IV. Resumen de los resultados del análisis inmunohistoquímico en los nidos sólidos del tiroides.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN



NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

DISCUSIÓN

Los SCNs del tiroides han fascinado a los patólogos desde su descripción por Getzowa (Getzowa S, y cols) en 1907. Actualmente se acepta que los SCNs o también denominados folículos mixtos son remanentes del cuerpo ultimo branquial (Harach HR y cols, 1988; Camesselle-Tejeiro y cols, 1994; Martin y cols, 2000; Harach HR y cols, 1987; Bykov VL y cols, 1993, Becker ME y cols, 1990), pero su significado biologico aún es desconocido (Harach HR y cols, 1988; Camesselle-Tejeiro J y cols, 1994; Martin y cols, 2000; Williams y cols, 1989; Camesselle-Tejeiro y cols, 1996). Se ha sugerido que estas estructuras embrionarias remanentes pueden representar estructuras ectópicas rara vez descritas en las glándulas tiroideas (Camesselle-Tejeiro y cols, 1994; Bykov y cols, 1993), así como en ciertos tipos de neoplasias tiroideas (Camesselle-Tejeiro y cols, 1996; Camesselle-Tejeiro y cols, 1995).

Se cree que los quistes de los conducto tiroglobulares, tiroides lingual y SCNs albergan células madre pluripotentes (Harach y cols, 1988; Camesselle-Tejeiro y cols, 1994; Becker ME y cols, 1990). Los SCNs se componen de dos tipos de células denominadas como "células principales" y células "C" (Camesselle-Tejeiro y cols, 1994). Las células principales, que representan una proporción importante, son células alargadas, poligonales con núcleos ovales, céntricos e irregulares. En ocasiones, estas células muestran un citoplasma profundamente eosinófilo con características escamoides (incluyendo citoqueratinas de alto peso molecular) pero que carecen de puentes intercelulares (Camesselle-Tejeiro y cols, 1994). Las células C, representan en

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

DISCUSIÓN

cambio una pequeña proporción de la población de SCNs, se caracterizan por un citoplasma claro y pequeños núcleos compactos con ubicación céntrica, (Harach y cols, 1988; Camesselle-Tejeiro y cols, 1994; Martin y cols, 2000). En hasta un 81% de los casos, los folículos se puede encontrar mezclado con auténticos SCNs (Harach HR y cols, 1988; Camesselle-Tejeiro y cols, 1994; Martin y cols, 2000). Estos folículos mixtos están compuestos de algunas células que se asemejan a las células principales y células foliculares diferenciadas, formando un lumen folicular-como patrón.

En la práctica rutinaria de la patología tiroidea los SCNs plantean ciertas dificultades dado que pueden ser confundidos con metaplasia escamosa, carcinoma escamoso metastásico, microcarcinoma papilar, carcinoma medular e hiperplasia de células C (Harach y cols, 1988; Camesselle-Tejeiro y cols, 1994). Se ha asumido que una evaluación histológica basada en un perfil inmunohistoquímico (CEA y citoqueratinas) de los SCNs podría ser suficiente para diferenciarlos (Harach y cols, 1988; Camesselle-Tejeiro y cols, 1994). No obstante, los marcadores apuntados se coexpresan en algunos carcinomas neuroendocrinos (Morrison y cols, 1997; Camesselle-Tejeiro y cols, 1996), por lo que son necesarios otros marcadores más específicos.

En este trabajo se ha detectado expresión de GAL-3, suficientemente restringida a los SCNs tal como otros autores han descrito (Lu y cols, 1996). También se ha observado inmunorreacción positiva de p63 en las células principales de los SCNs, mientras que en tejido adyacente no se advierte

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

DISCUSIÓN

la presencia de este marcador. Otros autores han encontrado resultados similares (Camesselle-Tejeiro y cols, 1995, Preto y cols, 2004, Faggiano y cols, 2003), añadiendo que p63 no se expresa en algunos carcinomas diferenciados (medular y folicular) (Preto y cols, 2004, Camesselle-Tejeiro y cols, 2009), pues parece ser que de forma excepcional se expresa en focos de cambio escamoso de carcinomas papilares (DiComo y cols, 2002). En consecuencia, p63 puede ser un magnífico marcador para distinguir los SCNs de otras entidades patológicas.

Aunque no existe una definición precisa de células madre generalmente se acepta que estas exhiben capacidad de autorrenovación, potencial de diferenciación y que pueden existir en una forma mitóticamente quiescente, pero células con estas propiedades no están siempre presentes en todos los tejidos humanos (Reis-Filho y cols, 2003). P63 es un miembro de la familia de genes supresores p53 (estructuras homologas), estando esta última implicada en la supervivencia y diferenciación de las células madre en diferentes epitelios. No sé conoce con precisión si esta función la realiza la p53 genuina o bien isoformas de la misma (Preto y cols, 2002; Barbareschi y cols, 2001). Se ha sugerido que p63 podría desencadenar la diferenciación de algunas líneas celulares específicas (Preto y cols, 2002; Barbareschi y cols, 2001; Mills y cols, 1999).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, adicionalmente se ha encontrado inmunorreacción intensa (expresión) de bcl-2 en células principales lo que es característico de un fenotipo embrionario no comprometido que se asocia con las células madre (Reis-Filho y cols, 2002).

Por otro lado, las células principales no mostraron inmunorreacción para algunos marcadores de diferenciación, PTH y TG, lo que permite distinguir a los SCNs de restos tisulares de paratiroides y afirmar que no presentan diferenciación hacia células foliculares productoras de TG. Sin embargo la inmunorreacción para CT demuestra positividad en algunas células aisladas dentro de los SCNs, similares a las células parafoliculares del tejido glandular adyacente, lo cual demuestra la diferenciación intranido de esta línea celular. Con respecto a la inmunorreacción positiva TTF-1 se advirtió en algunas células periféricas de los SCNs, probablemente células C pues así lo apuntan otros autores (Mills y cols, 1999), así como en células de folículos mixtos y de todos los folículos del tejido tiroideo adyacente. Con el intento de reafirmar la naturaleza embrionaria de los SCNs conviene tener en cuenta que TTF-1 es un marcador temprano de diferenciación de células tiroideas (Lu y cols, 1996; Reis-Filho y cols, 2001) y la mayoría de las células de los SCNs carecen de su expresión (células indiferenciadas). Con el sentido de apoyar la naturaleza de células madre en los SCNs se advierte la continuidad que existe entre células principales, folículos mixtos y células foliculares y parafoliculares. Tanto es así que se ha sugerido que las células principales podrían ser pluripotenciales

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

DISCUSIÓN

y contribuir a la histogénesis de las células C y de las células foliculares así como a algunos tumores tiroideos (Camesselle-Tejeiro y cols, 1996). Los resultados descritos anteriormente sobre el perfil inmunohistoquímico de los SCNs apoyan esta hipótesis. Contribuye a esta interpretación el trabajo de otros autores en el que se describe la marcada capacidad de autorenovación (actividad telomerasa), junto a bajos índices de proliferación, en estas células (Camesselle-Tejeiro y cols, 1995).

Hasta ahora se han individualizado los SCNs como un hecho morfológico del tejido tiroideo, al mismo tiempo que se han emitido interpretaciones sobre su naturaleza y su significado.

Siguiendo esta orientación de identificar poblaciones de células madre específicas en órganos y tejidos, tanto sanos como enfermos (Hombach-Klonisch y cols, 2008; Klonisch y cols, 2008), en el tiroides se ha tratado de vincular este protagonismo a los SCNs (Camesselle-Tejeiro y cols, 1996) e incluso a relacionar con la génesis de tumores como el carcinoma papilar, mucoepidermoide y escamoso (Camesselle-Tejeiro y cols, 1995; Camesselle-Tejeiro y cols, 1996; Burstein y cols, 2004). En este mismo sentido se ha pretendido demostrar la presencia de la misma mutación BRAF (V600E) en SCNs y en el carcinoma micropapilar (Faggiano y cols, 2003). Además no existen evidencias que soporten la relación entre SCNs y carcinoma medular, lo cual ha sido apuntado por algunos autores (Martin y cols, 2000; Ozaki y cols, 1994).

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

DISCUSIÓN

Por consiguiente, opiniones contradictorias sobre esta vinculación de células madre, SCNs y carcinoma de tiroides son frecuentes en la literatura pero siempre basadas en perfiles inmunohistoquímicos que no recogen marcadores absolutamente específicos de células madre (Camesselle-Tejeiro y cols, 2005, Burstein y cols, 2005).

Oct4, un factor de transcripción expresado en las células madre embrionarias y células germinales, está implicado en la regulación y el mantenimiento de la pluripotencialidad. Se ha detectado en seminoma (Gashaw y cols, 2007; Jones y cols, 2004; Cao y cols, 2009; Ezeh y cols, 2005) y otros tipos de tumores incluyendo carcinoma de mama (Ezeh y cols, 2005).

Sall4 también está implicado en el mantenimiento de la auto-renovación y pluripotencialidad de las células madre embrionarias mediante la formación de una red de regulación, junto con Oct4, Sox2, y Nanog. Recientemente, Sall4 ha sido identificado como un nuevo marcador diagnóstico para los tumores primarios del mediastino gonadales de células germinales (Cao y cols, 2009; Cao y cols, 2009 BIS), mostrando 100% de sensibilidad para los tumores gonadales del saco vitelino, seminomas o disgerminomas y carcinomas embrionarios. Nuestros resultados con marcadores de células madre no confirman la hipótesis planteada pues sólo dos casos presentan inmunoreacción positiva de significado incierto para OCT4 y negativa en todos los casos para SALL4.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

DISCUSIÓN

En resumen el perfil inmunohistoquímico de las células principales, caracterizadas por la expresión de p63 y citoqueratinas basales en ausencia de marcadores de diferenciación tiroideo como TTF-1, tiroglobulina, and calcitonina, sugieren un fenotipo de célula madre; sin embargo en este estudio no se ha confirmado esta, dado que se detecto expresión de OCT4 en solo dos casos mientras que en ninguno se detecto expresión de SALL4 .

Nuestros resultados contribuyen a un mejor conocimiento de la naturaleza de los SCNs y pueden proporcionar una discreta ayuda a la correcta interpretación de la génesis de los tumores tiroideos, pero no indican ninguna vía importante para orientar otras estrategias terapéuticas distintas a la quirúrgica, por el momento.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES



NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CONCLUSIONES

- 1** Los SCNs se acepta que son restos del cuerpo último branquial y que se encuentran en una gran mayoría de glándulas tiroideas normales y patológicas. En la hiperplasia nodular la posibilidad de identificarlos depende de la extensión del estudio histológico.
- 2** Los SCNs no se confunden con metaplasia escamosa, carcinoma escamoso, microrcarinoma papilar, carcinoma nodular o hiperplasia de células C. Su perfil inmunohistoquímico es bien definido, al menos para evitar tal confusión.
- 3** Las células principales de los SCNs muestran inmunoreacción positiva, citoplásmica y nuclear, para GAL-3, solo citoplásmica para bcl-2 y CK-19, y solo nuclear para p63, siendo negativa la inmunotinción para TG, TTF-1 y CT.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

CONCLUSIONES

- 4** Las células claras muestran solo positividad para GAL-3 (citoplásmica y nuclear) y para CT (citoplásmica).

- 5** La inmunoreacción positiva para bcl-2 en las células principales se entiende como componente de la expresión de un fenotipo embrionario no comprometido que puede facilitar la interpretación de células madre.

- 6** La discutida presencia de células madre en los SCNs no se ha podido demostrar, pues el estudio inmunohistoquímico de marcadores específicos para estas células, como el OCT4 y el SALL4, han ofrecido resultado negativo.

**NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL
TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL**

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA



NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

A

Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, Reed W, Lee TH. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 2001;41:1524–1530.

Arufe MC, Lu M, Lin RY. Differentiation of murine embryonic stem cells to thyrocytes requires insulin and insulin-like growth factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;381:264–270.

B

Baloch ZW, Solomon AC, Livolsvi VA. Primary mucoepidermoid carcinoma and sclerosing mucoepidermoid carcinoma with eosinophilia of the thyroid gland: a report of nine cases. *Mod Pathol* 2000;13:802-7.

Beamer WJ, Eicher EM, Maltais LJ, Southard JL. Inherited primary hypothyroidism in mice. *Science* 1981;212:61–63.

Beckner ME, Shultz JJ, Richardson T. Solid and cystic ultimobranchial body remnants in the thyroid. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:1049–1052.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, George D, Vijayaragavan K, Werbowetski-Ogilvie T, Ramos-Mejia V, Rouleau A, Yang J, Bossé M, Lajoie G, Bhatia M. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* 2007;448:1015–1021.

Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:705–708.

Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997;61:822–829.

Bianchi DW, Farina A, Weber W, Delli-Bovi LC, Deriso M, Williams JM, Klinger KW. Significant fetal-maternal hemorrhage after termination of pregnancy: implications for development of fetal cell microchimerism. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:703–706.

Burstein DE, Nagi C, Wang BY, Unger P. Immunohistochemical detection of p53 homolog p63 in solid cell nests, papillary thyroid carcinoma, and hashimoto's thyroiditis: A stem cell hypothesis of papillary carcinoma oncogenesis. *Hum Pathol.* 2004;35(4):465-73.

Burstein DE, Unger P, Nagi C, Wang BY. Thinking “out of the nest”--a reply to “a stem-cell role for thyroid solid cell nests [letter]”. *Hum Pathol.* 2005 May;36(5):591-2.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Bykov VL. Tissue of ultimobranchial origin in normal and pathologically altered thyroid gland. *Arkh Patol* 1993;55: 81–84.

C

Cameselle-Teijeiro J, Varela-Duran J, Sambade C, Villanueva JP, Varela-Nunez R, Sobrinho-Simoes M. Solid cell nests of the thyroid: light microscopy and immunohistochemical profile. *Hum Pathol* 1994;25: 684–693.

Cameselle-Teijeiro J, Varela-Durán J. Intrathyroid salivary gland-type tissue in multinodular goiter. *Virchows Archiv* 1994;425:331–334.

Cameselle-Teijeiro J, Varela-Duran J. Intrathyroid salivary gland-type tissue in multinodular goiter. *Virchows Arch* 1994; 425: 331–334.

Cameselle-Teijeiro J. Mucoepidermoid carcinoma and solid cell nests of the thyroid. *Hum Pathol* 1996;27:861–863.

Cameselle-Teijeiro J, Febles-Perez C, Sobrinho-Simoes M. Papillary and mucoepidermoid carcinoma of the thyroid with anaplastic transformation: a case report with histologic and immunohistochemical findings that support a provocative histogenetic hypothesis. *Pathol Res Pract* 1995;191:1214–1221.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Cameselle-Teijeiro J. Mucoepidermoid carcinoma and solid cell nests of the thyroid. *Hum Pathol* 1996;27:861–863.

Cassinelli G, Favini E, Degl’Innocenti D, Salvi A, De Petro G, Pierotti MA, Zunino F, Borrello MG, Lanzi C. RET/PTC 1-driven neoplastic transformation and proinvasive phenotype of human thyrocytes involve Met induction and β -catenin nuclear translocation. *Neoplasia* 2009;11:10–21

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98:2396–2402.

Cao D, Guo S, Allan RW, et al. SALL4 is a novel sensitive and specific marker of ovarian primitive germ cell tumors and is particularly useful in distinguish yolk sac tumor from clear cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2009, 3:894-904.

Cao D, Li J, Guo CC, Allan RW, Humphrey PA. SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* 2009, 33(7): 1065-1077.

Celli G, LaRochelle WJ, Mackem S, Sharp R, Merlino G. Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning. *EMBO* 1998;17:1642–1655.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Chan JK, Tse CC. Solid cell nest-associated C-cells: another possible explanation for “C-cell hyperplasia” adjacent to follicular cell tumors. *Hum Pathol* 1989;20:498–499.

Coclet J, Foureau F, Ketelbant P, Galand P, Dumont JE. Cell population kinetics in dog and human adult thyroid. *Clin Endocrinol* 1989;31:655–665.

Cohen A, Rovelli A, Merlo DF, van Lint MT, Lanino E, Bresters D, Ceppi M, Bocchini V, Tichelli A, Socie G. Risk for secondary thyroid carcinoma after hematopoietic stem-cell transplantation: an EBMT Late Effects Working Party Study. *J Clin Oncol* 2007;25:2449–2454.

D

D’Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 2005;23:1534–1541.

Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA* 2006;295:2164–2167.

De Deken X, Vilain C, Van Sande J, et al. Decrease of telomere length in thyroid adenomas without telomerase activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4368–4372.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, Macchia PE, Mattei MG, Mariano A, Scholer H, Macchia V, Di Lauro R. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* 1998;19:395–398.

De Felice M, Postiglione MP, Di Lauro R. Minireview: thyrotropin receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland: insights from mouse models and human diseases. *Endocrinology* 2004;145:4062–4067.

De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev* 2004;25:722–746.

De Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev* 2006;27:535–560.

Derwahl M, Studer H. Hyperplasia versus adenoma in endocrine tissues: are they different? *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:23–28.

Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 2000;85:645–651.

De Tullio R, Aversa M, Salamino F, Pontremoli S, Melloni E. Differential degradation of calpastatin by mu- and m-calpain in Ca(2+)-enriched human neuroblastoma LAN-5 cells. *FEBS Lett* 2000;475:17–21.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 2008;112:4793–4807.

Dick JE. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol* 2009; 27:44–46.

Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, et al. p63 Expression Profiles in Human Normal and Tumor Tissues. *Clin Cancer Res* 2002;8:494–501.

Di Palma T, D'Andrea B, Liguori GL, Liguoro A, de Cristofaro T, Del Prete D, Pappalardo A, Mascia A, Zannini M. TAZ is a coactivator for Pax8 and TTF-1, two transcription factors involved in thyroid differentiation. *Exp Cell Res* 2009;315:162–175.

Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev* 1992;72:667–697.

E

Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 2005, 104(10):2255-2265.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

F

Faggiano A, Talbot M, Baudin E, Bidart JM, Schumberger M, Caullou B. Differential expression of galectin 3 in solid cell nests and C cells of human thyroid. *J Clin Pathol* 2003;56:142-143.

Fagin JA, Mitsiades N. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:955-969.

Fagman H, Grande M, Edsbagge J, Semb H, Nilsson M. Expression of classical cadherins in thyroid development: maintenance of an epithelial phenotype throughout organogenesis. *Endocrinology* 2003;144:3618-3624.

Fierabracci A, Puglisi MA, Giuliani L, Mattarocci S, Gallinella-Muzi M. Identification of an adult stem/progenitor cell-like population in the human thyroid. *J Endocrinol* 2008; 198:471-487.

Filip S, English D, Mokry J. Issues in stem cell plasticity. *J Cell Mol Med* 2004;8:572-577.

Fontaine J. Multistep migration of calcitonin cell precursors during ontogeny of the mouse pharynx. *Gen Comp Endocrinol* 1979;37:81-92.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Pezzino V, Squatrito S, Belfiore A, Vigneri R. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Arch Physiol Biochem* 2008;114:23–37.

Fraser BA, Duckworth JW. Ultimobranchial body cysts in the human foetal thyroid: pathological implications. *J Pathol* 1979;127:89–92.

Fraser BA, Duckworth JW. Position of ultimobranchial body cysts in the human fetal thyroid gland. *Acta Anat (Basel)* 1979;105:269–272.

Friedman S, Lu M, Schultz A, Thomas D, Lin RY. CD133+ anaplastic thyroid cancer cells initiate tumors in immunodeficient mice and are regulated by thyrotropin. *PLoS One* 2009;4:e5395.

G

Gashaw I, Dushaj O, Behr R, Biermann K, Brehm R, Rübber H et al. Novel germ cell markers characterize testicular seminoma and fetal testis. *Molecular Human Reproduction* 2007,13(1):721-727.

Getzowa S. Ueber die Glandula parathyreoidea, intrathyreoidale Zellhaufen derselben und Reste des postbranchialen köpers. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1907;188:181–234.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Gibelli B, El-Fattah AMA, Giugliano G, Proh M, Grosso E. Thyroid stem cells-danger or source?. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* 2009;29:290-295.

Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* 1998;16:166-177.

Gu WX, Du GG, Kopp P, Rentoumis A, Albanese C, Kohn LD, Madison LD, Jameson JL. The thyrotropin (TSH) receptor transmembrane domain mutation (Pro556-Leu) in the hypothyroid hyt/hyt mouse results in plasma membrane targeting but defective TSH binding. *Endocrinology* 1995; 136:3146-3153.

H

Hall PA. What are stem cells and how are they controlled?. *J Pathol* 1989;158:275-277.

Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989;106:619-633.

Harach HR. A study on the relationship between solid cell nests and mucoepidermoid carcinoma of the thyroid. *Histopathology* 1985;9:195-207.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Harach HR. Mixed follicles of the human thyroid gland. *Acta Anat (Basel)* 1987;129:27–130.

Harach HR. Solid cell nests of the thyroid. *J Pathol* 1988;155:191–200.

Harach HR, Vujanic GM, Jasani B. Ultimobranchial body nests in human fetal thyroid: an autopsy, histological, and immunohistochemical study in relation to solid cell nests and mucoepidermoid carcinoma of the thyroid. *J Pathol* 1993;169:465–469.

Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, et al. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990;346:866–868.

Haugen BR, Nawaz S, Markham N, et al. Telomerase activity in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* 1997;7:337–342.

Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, Kurpisz M, Schulze-Osthoff K, Mackiewicz A, Los M. Adult stem cells and their trans-differentiation potential-perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med* 2008;86:1301–1314.

Hoshi N, Kusakabe T, Taylor BJ, Kimura S. Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics. *Endocrinology* 2007;148:4251–4258.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995;155:3711–3715.

Huang YH, Chin CC, Ho HN, Chou CK, Shen CN, Kuo HC, Wu TJ, Wu YC, Hung YC, Chang CC, Ling TY. Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1-dependent pathway. *FASEB J* 2009; 23:2076–2087.

Imaizumi M, Pritsker A, Unger P, Davies TF. Intrathyroidal fetal microchimerism in pregnancy and postpartum. *Endocrinology* 2002; 143:247–253.

Janzer RC, Weber E, Hedinger C. The relation between solid cell nests and C cells of the thyroid gland: an immunohistochemical and morphometric investigation. *Cell Tissue Res* 1979;197:295–312.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43–66.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell* 2008;15:801–812.

Jimenez DF, Leapley AC, Lee CI, Ultsch MN, Tarantal AF. Fetal CD34+ cells in the maternal circulation and long-term microchimerism in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Transplantation* 2005;79:142–146.

Jones T, Ulbright T, Eble J, Baldrige L, Cheng L. OCT4 Staining in testicular tumors: a sensitive and specific marker for seminoma and embryonal Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2004,28(7):935-940.

Junqueira LC y Carneiro J. *Histología Básica, 6ª ed. Masson, 2005. 408-411.*

K

Kameda Y, Ito M, Nishimaki T, Gotoh N. FRS2alpha is required for the separation, migration, and survival of pharyngeal-endoderm derived organs including thyroid, ultimobranchial body, parathyroid, and thymus. *Dev Dyn* 2009; 238:503–513.

Kammori M, Takubo K, Nakamura K, et al. Telomerase activity and telomere length in benign and malignant human thyroid tissues. *Cancer Lett* 2000;159:175–181.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Kim DS, McCabe CJ, Buchanan MA y cols. Oncogenes in thyroid cáncer. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2003;28:386-395.

Kimelman D, Griffin KJ. Vertebrate mesendoderm induction and patterning. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:350–356.

Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* 1996;10:60–69.

Klintschar M, Schwaiger P, Mannweiler S, Regauer S, Kleiber M. Evidence of fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:2494–2498.

Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, Los M. Cancer stem cell markers in common cancers—therapeutic implications. *Trends Mol Med* 2008;14:450–460.

Klonisch T, Drouin R. Fetal-maternal exchange of multipotent stem/progenitor cells: microchimerism in diagnosis and diseases. *Trends Mol Med* 2009;15:510–518.

Klonisch T, Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S. Thyroid stem cells and cancer. *Thyroid* 2009;19:1303–1315.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Koch U, Radtke F. Notch and cancer: a double-edged sword. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:2746–2762.

Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2006;6:292–306.

Koopmans M, Kremer Hovinga IC, Baelde HJ, Harvey MS, de Heer E, Bruijn JA, Bajema IM. Chimerism occurs in thyroid, lung, skin and lymph nodes of women with sons. *J Reprod Immunol* 2008; 78:68–75.

Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, Fehling HJ, Keller G. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development* 2004; 131:1651–1662.

Kusakabe T, Hoshi N, Kimura S. Origin of the ultimobranchial body cyst: T/ebp/Nkx2.1 expression is required for development and fusion of the ultimobranchial body to the thyroid. *Dev Dyn* 2006; 235:1300–1309.

Krohn K, Fuhrer D, Bayer Y, Eszlinger M, Brauer V, Neumann S, Paschke R. Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocr Rev* 2005; 26:504–524.

L & LL

Lan L, Cui D, Nowka K, Derwahl M. Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require thyrotropin for differentiation into thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3681–3688.

Lawson KA, Pedersen RA. Cell fate, morphogenetic movement and population kinetics of embryonic endoderm at the time of germ layer formation in the mouse. *Development* 1987; 01:627–652.

Lazzaro D, Price M, de Felice M, Di Lauro R. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* 1991;113:1093–1104.

Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 1991;113:891–911.

Le Douarin N, Fontaine J, Le Lievre C. New studies on the neural crest origin of the avian ultimobranchial glandular cells—interspecific combinations and cytochemical characterization of C cells based on the uptake of biogenic amine precursors. *Histochemistry* 1974;38:297–305.

Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* 2000;113:1661–1670.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Li S, Crenshaw EB, 3rd, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 1990;347:528–533.

Lin RY, Kubo A, Keller GM, Davies TF. Committing embryonic stem cells to differentiate into thyrocyte-like cells in vitro. *Endocrinology* 2003;144:2644–2649.

Lin RY, Davies TF. Derivation and characterization of thyrocyte-like cells from embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol Biol* 2006;330:249–261.

Liegeois A, Escourrou J, Ouvre E, Charreire J. Microchimerism: a stable state of low-ratio proliferation of allogeneic bone marrow. *Transplant Proc* 1977;9:273–276.

Lo YM, Patel P, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA, Wainscoat JS. Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet* 1990;335:1463–1464.

M

Ma R, Latif R, Davies TF. Thyrotropin-independent induction of thyroid endoderm from embryonic stem cells by activin A. *Endocrinology* 2009;150:1970–1975.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Malaguarnera R, Frasca F, Garozzo A, Gianì F, Pandini G, Vella V, Vigneri R, Belfiore A. Insulin receptor isoforms and insulin-like growth factor receptor in human follicular cell precursors from papillary thyroid cancer and normal thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:766–774.

Manley NR, Capecchi MR. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development* 1995;121:1989–2003.

Martin V, Martin L, Viennet G, Challier B, Carbillet J, Fellmann D. Solid cell nests and thyroid pathologies. Retrospective study of 1,390 thyroids. *Annu Pathol* 2000;20:196–201.

Martin V, Martin L, Viennet G, Hergel M, Carbillet JP, Fellmann D. Ultrastructural features of “solid cell nest” of the human thyroid gland: a study of 8 cases. *Ultrastruct Pathol* 2000;24:1–8.

Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D, Kioussis D, Beddington RS. The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* 2000;127:2433–2445.

Matthews P, Jones CJ. Clinical implications of telomerase detection. *Histopathology* 2001;38:485–498.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Meunier D, Aubin J, Jeannotte L. Perturbed thyroid morphology and transient hypothyroidism symptoms in *Hoxa5* mutant mice. *Dev Dyn* 2003; 27:367–378.

Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med* 2007;11:981–1011.

Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 1999;398: 708–713.

Mikhail MA, M’Hamdi H, Welsh J, Levicar N, Marley SB, Nicholls JP, Habib NA, Louis LS, Fisk NM, Gordon MY. High frequency of fetal cells within a primitive stem cell population in maternal blood. *Hum Reprod* 2008;23:928–933.

Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, Namba H, Ohtsuru A, Saenko V, Yamashita S. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology* 2007;148:1797–1803.

Mizukami Y, Nonomura A, Michigishi T, Noguchi M, Hashimoto T, Nakamura S, et al. Solid cell nests of the thyroid. A histologic and

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 1994;101:186–191.

Monteiro J, Fodde R. Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives. *Eur J Cancer* 2010;46:1198–1203.

Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* 1998;19:87–90.

Morkel M, Huelsken J, Wakamiya M, Ding J, van de Wetering M, Clevers H, Taketo MM, Behringer RR, Shen MM, Birchmeier W. Beta-catenin regulates Cripto- and Wnt3-dependent gene expression programs in mouse axis and mesoderm formation. *Development* 2003;130:6283–6294.

Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997;88:287–298.

N

Nguyen Huu S, Dubernard G, Aractingi S, Khosrotehrani K. Feto-maternal cell trafficking: a transfer of pregnancy associated progenitor cells. *Stem Cell Rev* 2006;2:111–116.

Ninomiya H, Takahashi S, Tanegashima K, Yokota C, Asashima M. Endoderm differentiation and inductive effect of activin-treated ectoderm in *Xenopus*. *Dev Growth Differ* 1999;41:391–400.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular genetics of thyroid cancer: implication for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8:83-95.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000;24:372–376.

Norris DP, Robertson EJ. Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. *Genes Dev* 1999;13:1575–1588.

O

Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, Itoh N. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:643–649.

Onoda N, Ishikawa T, Yoshikawa K, et al. Telomerase activity in thyroid tumors. *Oncol Rep* 1998;5:1447–1450.

Ozaki O, Ito K, Sugino K, Yasuda K, Yamashita T, Toshima K, et al. Solid cell nests of the thyroid gland. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991;418: 201–205.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

P

Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, Mansouri A, Kimura S, Di Lauro R, De Felice M. An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev Biol* 2004;276:464–475.

Peter HJ, Gerber H, Studer H, Smeds S. Pathogenesis of heterogeneity in human multinodular goiter. A study on growth and function of thyroid tissue transplanted onto nude mice. *J Clin Invest* 1985;76:1992–2002.

Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 1998;12:2735–2747.

Postiglione MP, Parlato R, Rodriguez-Mallon A, Rosica A, Mithbaokar P, Maresca M, Mariani RC, Davies TF, Zannini MS, De Felice M, Di Lauro R. Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc Natl Acad Sci* 99:15462–15467.

Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990;110:1001–1020.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Preto A, Reis-Filho JS, Ricardo S, Soares P. p63 expression in papillary and anaplastic carcinomas of the thyroid gland: lack of an oncogenetic role in tumorigenesis and progression. *Pathol Res Pract* 2002;198:449–454.

Q

Que J, Okubo T, Goldenring JR, Nam KT, Kurotani R, Morrisey EE, Taranova O, Pevny LH, Hogan BL. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development* 134:2521–2531.

R

Reis-Filho JS, Carrilho C, Valenti C, Leitao D, Ribeiro CA, et al. Is TTF-1 a good immunohistochemical marker to distinguish primary from metastatic lung adenocarcinomas?. *Pathol Res Pract* 2000;196,835-40.

Reis-Filho JS, Milanezi F, Silva P, Schmitt FC. Maspin expression in myoepithelial tumors of the breast. *Pathol Res Pract* 2001;197:817-21.

Reis-Filho JS, Schmitt FC. Taking advantage of basic research: p63 is a reliable myoepithelial and stem cell marker. *Adv Anat Pathol* 2002;9:280–289.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Reis-Filho JS, Preto A et al. P63 expression in solid cell nests of the thyroid: further evidence for a stem cell origin. *Mod Pathol* 2003;16:43-48.

Renne C, Ramos Lopez E, Steimle-Grauer SA, Ziolkowski P, Pani MA, Luther C, Holzer K, Encke A, Wahl RA, Bechstein WO, Usadel KH, Hansmann ML, Badenhoop K. Thyroid fetal male microchimerisms in mothers with thyroid disorders: presence of Y-chromosomal immunofluorescence in thyroid-infiltrating lymphocytes is more prevalent in Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease than in follicular adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5810–5814.

Revest JM, Spencer-Dene B, Kerr K, De Moerlooze L, Rosewell I, Dickson C. Fibroblast growth factor receptor 2-IIIb acts upstream of Shh and Fgf4 and is required for limb bud maintenance but not for the induction of Fgf8, Fgf10, Msx1, or Bmp4. *Dev Biol* 2001;231:47–62.

Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434:843–850.

Rodaway A, Patient R. Mesendoderm. An ancient germ layer?. *Cell* 2001;105:169–172.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

S

Sanders JE, Hoffmeister PA, Woolfrey AE, Carpenter PA, Storer BE, Storb RF, Appelbaum FR. Thyroid function following hematopoietic cell transplantation in children: 30 years' experience. *Blood* 113:306–308.

Schroder S, Wodzynski A, Padberg B. Cytokeratin expression of benign and malignant epithelial thyroid gland tumours. An immunohistological study of 154 neoplasm using 8 different monoclonal cytokeratin antibodies. *Pathologie* 1996;17:425-32.

Serls AE, Doherty S, Parvatiyar P, Wells JM, Deutsch GH. Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development* 132:35–47.

Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL, Wagers AJ. Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 22:1292–1304.

Smallridge RC, Marlow LA, Copland JA. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. *Endocr Relat Cancer* 16:17–44.

Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL, Samura O, Lee SL, Bianchi DW. Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case–control study. *Lancet* 358:2034–2038.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Sturn N, Lantuejoul S, Laverriere MH, et als. Thyroid transcription factor 1 and cytokeratins 1, 5, 10, 14 expression in basaloid and large-cell neuroendocrine carcinomas of the lung. *Human Pathol* 2001;32:918-25.

Suarez y cols. Molecular basis of epithelial thyroid tumorigenesis. *C R Acad Sci III* 2003;323:519-528.

T

Takano T. Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: a hypothesis for better understanding of gene expression profile and genomic alternation in thyroid carcinoma. *Endocr J* 2004;51:509–515.

Thomas MR, Williamson R, Craft I, Yazdani N, Rodeck CH. Y chromosome sequence DNA amplified from peripheral blood of women in early pregnancy. *Lancet* 1994;343:413–414.

Thomas T, Nowka K, Lan L, Derwahl M. Expression of endoderm stem cell markers: evidence for the presence of adult stem cells in human thyroid glands. *Thyroid* 2006;16:537–544.

Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev* 2006;27:208–219.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Trueba SS, Auge J, Mattei G, Etchevers H, Martinovic J, Czernichow P, Vekemans M, Polak M, Attie-Bitach T. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:455–462.

Tsai RY, McKay RD. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev* 2002;16:2991–3003.

Toda S, Koike N, Sugihara H. Thyrocyte integration, and thyroid folliculogenesis and tissue regeneration: perspective for thyroid tissue engineering. *Pathol Int* 2001;51:403–417.

Toda S, Watanabe K, Yokoi F, Matsumura S, Suzuki K, Ootani A, Aoki S, Koike N, Sugihara H. A new organotypic culture of thyroid tissue maintains three-dimensional follicles with C cells for a long term. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:906–911.

Todaro M, Iovino F, Eterno V, Cammareri P, Gambarà G, Espina V, Gulotta G, Ieli F, Giordano S, De Maria R, Stassi G. Tumorigenic and metastatic activity of human thyroid cancer stem cells. *Cancer Res* 2010;70:8874–8885.

Turin L, Tribbioli G, Invernizzi P, Grati FR, Crema S, Laible G, Riva F. Fetal microchimerism in normal and embryo transfer bovine pregnancies. *Vet Res Commun* 2007;31 Suppl 1:205–207.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

U

V

Van de Rijn M, Heimfeld S, Spangrude GJ, Weissman IL. Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:4634–4638.

Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Frittitta L, Vigneri R. Obesity and cancer. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:1–7.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008;8:755–768.

W

Wang Y, Iwatani H, Ito T, Horimoto N, Yamato M, Matsui I, Imai E, Hori M. Fetal cells in mother rats contribute to the remodeling of liver and kidney after injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:961–967.

Wulf GG, Luo KL, Jackson KA, Brenner MK, Goodell MA. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* 2003;88:368–378.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Williams ED, Toyn CE, Harach HR. The ultimobranchial gland and congenital thyroid abnormalities in man. *J Pathol* 1989;159:135–141.

X

Xin L, Lawson DA, Witte ON. The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:6942–6947.

Xu PX, Zheng W, Laclef C, Maire P, Maas RL, Peters H, Xu X. Eya1 is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. *Development* 2002; 129:3033–3044.

Y

Yamamoto M, Saijoh Y, Perea-Gomez A, Shawlot W, Behringer RR, Ang SL, Hamada H, Meno C. Nodal antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo. *Nature* 2004; 428:387–392.

Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999;398:714–718.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

BIBLIOGRAFÍA

Yashima K, Vuitch F, Gazdar AF, et al. Telomerase activity in benign and malignant thyroid diseases. *Surgery* 1997;122:1141–1145.

Z

Zheng X, Cui D, Xu S, Brabant G, Derwahl M. Doxorubicin fails to eradicate cancer stem cells derived from anaplastic thyroid carcinoma cells: characterization of resistant cells. *Int J Oncol* 2010;37:307–315.

Zhu XG, Cheng SY. Modelling thyroid cancer in the mouse. *Horm Metab Res* 2009;41:488-99.

Zito G, Richiusa P, Bommarito A, Carissimi E, Russo L, Coppola A, Zerilli M, Rodolico V, Criscimanna A, Amato M, Pizzolanti G, Galluzzo A, Giordano C. In vitro identification and characterization of CD133(pos) cancer stem-like cells in anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *PLoS One* 2008;3:e3544.

Zorn AM, Wells JM. Molecular basis of vertebrate endoderm development. *Int Rev Cytol* 2007;259: 49–111.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

ANEXO

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Es ampliamente reconocido que los nidos sólidos celulares (SCN) de la tiroides son los restos del cuerpo ultimobranquial (UBB). Los SCNs se componen de células principales y células C. Se ha sugerido que las células principales podrían ser células pluripotentes que contribuyen a la histogénesis de células C y las células foliculares, así como a la formación de determinados tumores de la tiroides.

OBJETIVO: El presente estudio pretende analizar el perfil inmunohistoquímico de los SCNs e investigar potencial papel de célula madre de las células principales de los SCNs.

MATERIAL Y MÉTODO: Las secciones de tejido de cada diez casos de hiperplasia nodular (no tumoral bocio) con SCN fueron recuperados de los archivos de el Hospital Infanta Luisa (Sevilla, España). Parathormona (PTH), calcitonina (CT), tiroglobulina (TG), el factor de transcripción tiroideo (TTF-1), la galectina 3 (GAL3), citoqueratina 19 (CK 19), p63, Bcl-2, Oct4, y la expresión SALL4 fueron evaluados mediante técnicas de inmunohistoquímica. Datos clínicos del paciente fueron recolectados, y las secciones de tejido fueron teñidas con hematoxilina-eosina para su examen histológico. Para el análisis estadístico de resultados se ha utilizado el paquete estadístico SPSS 18.0.

RESULTADOS: La mayoría de las células mostraron inmunotinción negativa para PTH, CT, TG y TTF-1. Algunas células con tinción positiva para TTF-1 y CT requirieron discusión. Sin embargo, la expresión de bcl-2, p63, GAL3, y CK se detectó en las células principales. Por otro lado, la expresión de OCT4 se detectó sólo en dos casos, y la de SALL4 en ninguno.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

DISCUSIÓN/CONCLUSIONES: La tinción positiva para bcl-2 y p63, y negatividad para la PTH, CT y TG en las células principales de los SCNs son ambas consistentes con la ampliamente aceptada definición minimalista de células madre, lo que apoya la hipótesis de que puede jugar un papel de célula madre en la glándula tiroides, aunque más investigación es requerida en el terreno de los marcadores de células madre. Por otra parte, la tinción de p63 y GAL-3 ofrece un medio mucho más sensible de detección de SCNs que la tinción para el antígeno carcinoembrionario, la calcitonina, u otros marcadores, lo que puede ayudar a distinguir los SCNs de sus imitadores.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

ABSTRACT

INTRODUCTION: It is widely held that solid cell nests (SCN) of the thyroid are ultimobranchial body remnants. SCNs are composed of main cells and C cells. It has been suggested that main cells might be pluripotent cells contributing to the histogenesis of C cells and follicular cells, as well as to the formation of certain thyroid tumors.

PURPOSE: The present study sought to analyze the immunohistochemical profile of SCN and to investigate the potential stem cell role of SCN main cells.

PATIENTS AND METHOD: Tissue sections from ten cases of nodular hyperplasia (non-tumor goiter) with SCNs were retrieved from the files of the Hospital Infanta Luisa (Seville, Spain). Parathormone (PTH), calcitonin (CT), thyroglobulin (TG), thyroid transcription factor (TTF-1), galectin 3 (GAL3), cytokeratin 19 (CK 19), p63, bcl-2, OCT4, and SALL4 expression were evaluated by immunohistochemistry. Patient clinical data were collected, and tissue sections were stained with hematoxylin-eosin for histological examination. Finally, statistical analysis of results was performed using SPSS 18.0.

RESULTS: Most cells stained negative for PTH, CT, TG, and TTF-1. Some cells staining positive for TTF-1 and CT required discussion. However, bcl-2, p63, GAL3, and CK 19 protein expression was detected in main cells. OCT4 protein expression was detected in only two cases, and SALL4 expression in none.

NATURALEZA DE LOS NIDOS SÓLIDOS DEL TEJIDO TIROIDEO TESIS DOCTORAL

Dña. María Dolores Martínez de Olcoz Cerdán

DISCUSSION/CONCLUSIONS: Positive staining for bcl-2 and p63, and negative staining for PTH, CT, and TG in SCN main cells are both consistent with the widely accepted minimalist definition of stem cells, thus supporting the hypothesis that they may play a stem cell role in the thyroid gland, although further research will be required into stem cell markers. Furthermore, p63 and GAL-3 staining provides a much more sensitive means of detecting SCNs than staining for carcinoembryonic antigen, calcitonin, or other markers; this may help to distinguish SCNs from their mimics.