

Revisiones

DIAGNOSTIC UTILITY OF TUMORAL MARKERS IN FINE-NEEDLE ASPIRATION CYTOLOGY OF THYROID NODULES

Thyroid nodules are common, affecting approximately 10% of the general population. Fine-needle aspiration biopsy has become the mainstay of thyroid nodule evaluation. The overall accuracy of this procedure is excellent but suspicious or indeterminate cytological samples can pose a diagnostic and management dilemma. In the attempt to find a molecular marker useful as an aid for cytological diagnosis, at least 70 molecular markers have been analyzed in thyroid nodules. This review focuses on some potential markers, such as thyroid peroxidase, thyroglobulin, telomerase, galectin-3, RET/PTC and p53; a few of these potential markers, such as thyroid peroxidases, thyroglobulin and galectin-3, can be studied in routine pathology laboratories and are promising, but do not yet fulfill the criteria for use in clinical practice. The American guidelines and the European consensus for the management of thyroid nodules and differentiated thyroid cancer do not recommend their use because the evidence provided is insufficient.

Key words: Fine-needle aspiration biopsy. Thyroid peroxidase. Thyroglobulin. Telomerase. Galectin-3. RET/PTC. p53.

Utilidad diagnóstica de los marcadores tumorales en la citología del tiroides extraída por punción-aspiración con aguja fina

JOSÉ MANUEL GÓMEZ

Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.

Los nódulos tiroideos son muy frecuentes y afectan aproximadamente al 10% de la población general. La citología tras aspiración con aguja fina es uno de los puntos de partida en la evaluación del nódulo tiroideo y su precisión es excelente, pero las muestras de citología sospechosas o indeterminadas son un dilema diagnóstico y de conducta a seguir. Se ha intentado buscar un marcador o marcadores moleculares útiles para la ayuda al diagnóstico citológico y se han analizado más de 70 moléculas con este propósito. En esta revisión se orienta sobre todo al estudio de algunos, como peroxidasa tiroidea, tiroglobulina, telomerasa, galectina 3, RET/PTC y proteína p53; de ellos, unos pocos, como la peroxidasa tiroidea, la tiroglobulina y la galectina 3, se pueden estudiar en el laboratorio habitual y son prometedores, aunque no cumplen todos los criterios requeridos para su uso en la práctica clínica. La guía estadounidense y el consenso europeo para la conducta a seguir ante el nódulo tiroideo y el cáncer diferenciado de tiroides no recomiendan su utilización, ya que las evidencias que presentan son insuficientes.

Palabras clave: Citología tras punción-aspiración con aguja fina. Peroxidasa tiroidea. Tiroglobulina. Telomerasa. Galectina 3. RET/PTC. Proteína p53.

INTRODUCCIÓN

Más del 10% de la población general desarrollará nódulos a lo largo de su vida y además se ha observado un aumento del número de cáncer de tiroides en las últimas 3 décadas, lo que, por ejemplo, supuso el diagnóstico de 240.000 nuevos casos en Estados Unidos en el año 2004¹. Todo esto es debido, en parte, a que son diagnosticados con más frecuencia, por la mejoría de las técnicas de imagen y de otros procedimientos. Hoy día la citología tiroidea tras punción-aspiración con aguja fina (PAAF) constituye el punto de partida del diagnóstico diferencial del nódulo tiroideo, tal como se expone tanto en la guía estadounidense² como en el consenso europeo³, es la conducta a seguir ante el nódulo y el carcinoma diferenciado de tiroides. No obstante, en las muestras de citología de

Correspondencia: Dr. J.M. Gómez.
Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario de Bellvitge.
Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.
Correo electrónico: jmgm@csub.scs.es

Manuscrito recibido el 20-2-2007 y aceptado para su publicación el 12-3-2007.

TABLA 1. Marcadores potenciales de desdiferenciación

Telomerasa	Factor de crecimiento endotelial
Galectina 1 y 3	MDM2
Fibronectina	RAβ
Lactoferrina	RXRα
Fusión PAX8-PPARγ	Mcm-2
Proteincinasa C	S100A9
LEU 7, LEU M1	Ciclinas D1, E, p27, p21
RAS	GLUT-1
Proteína p53	Lamina
Proteína p63	Citoqueratina
Proteína S-100	Muc 1
Rb	Receptor de estrógenos
Receptor del factor de crecimiento epidérmico	C-erb
Caveolina	E-caderina
14-3-3s	MET
Receptor de somatostatina	DAP
Receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos	Ki-67
CA-19	Grupo 1 de alta movilidad
Betacatenina	HBME-1
Oncoproteína C-erbB	FHL1
Oncoproteína HER-2 (C-erbB-2)	DIO1
Oncoproteína KIT	CITED1
Bcl-2	CA12
TRK	FN1
Dipeptidil-diaminopeptidasa IV	ECM1
PCNA	TMPRSS4
C-myc	EpCAM
Gen RET/PTC	Ciclooxygenasa 2
CD97	Ets-1
CD44V	IGF-II
CD34	Perfiles
CD19	Ploidía del ADN
CD57(LEU 7)	Microsondas genéticas
Transforming growth factor β	Proteómica
Factor de crecimiento epidérmico	

14-3-3s: regulador del ciclo celular; Bcl-2: oncogen; Caveolina: inhibidor de señal de transducción; CD: marcadores de linfocitos; C-erb: oncoproteína; C-myc: oncogen; DIO1, CITED1, CA12, FN1: genes; ECM1, TMPRSS4, EPCAM: moléculas de adhesión; Ets-1: factor de proliferación tiroidea; GLUT-1: transportador de glucosa 1; HBME-1: Hector Battifora *mesothelial cell*; Ki-67: marcador de proliferación celular; LEU 7, LEU M1: fenotipos linfocitarios; Mcm-2: *minichromosome maintenance protein-2*; PAX 8: factor de transcripción del tiroides; PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*; PPARγ: *peroxisome-proliferator-activated receptor*; RAβ: receptor beta del ácido retinoico; RXRα: receptor alfa del ácido retinoico; S100A9: proteína transportadora del calcio; TRK: tirosincinasa.

los nódulos tras PAAF, del 60 al 70% se considera benignas; el 5%, malignas, y entre el 10 y el 30%, indeterminadas o sospechosas. De estas últimas, sólo el 20-25% es finalmente cáncer tras la cirugía, con lo que del 75 al 80% de los pacientes de este subgrupo sufrirán una tiroidectomía, en muchos casos innecesaria⁴⁻⁶. En los que presentan citología sospechosa se puede encontrar una superposición de hallazgos citológicos entre: nódulo hiperplásico, adenoma folicular, adenoma de células de Hürthle, cáncer de células de Hürthle y variante folicular del carcinoma papilar. Numerosos estudios han intentado matizar mejor sus características por la presencia de coloide, atipias nucleares, superposición de núcleos, etc., que ha sido insuficiente⁵.

Los avances recientes en inmuncitoquímica, ensayos basados en actividad enzimática, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, etc., han hecho posible otro tipo de análisis, así como la búsqueda de marcadores de diferentes características y naturaleza, cuya rentabilidad se ha de considerar en esta revisión⁶⁻¹¹.

Las condiciones ideales que debe reunir el marcador tumoral de la citología son: *a)* debería distinguir los

nódulos benignos de los malignos, especialmente en los casos indeterminados; *b)* debería ser confirmado por diferentes grupos de investigadores; *c)* debería poderse utilizar en las muestras extraídas por punción, y *d)* sería de gran interés que además tuviese significado pronóstico y fuese indicativo de la patogenia y las opciones terapéuticas⁴.

Se ha analizado más de 70 marcadores moleculares (tabla 1) y algunos de ellos con gran interés científico, pero ninguno ha llegado a ser aún de uso habitual en clínica.

MARCADORES TUMORALES ESTUDIADOS

Son numerosos y de naturaleza diferente y pueden agruparse en: marcadores de diferenciación y marcadores de desdiferenciación. Los de diferenciación son: peroxidasa tiroidea, tiroglobulina, receptor de tirotriptina (TSH), intercambiador Na/I (NIS), deyodasa tiroidea y factores de transcripción del tiroides PAX8 y TTF-1 (*thyroid transcription factor-1*).

MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN

Peroxidasa tiroidea

Es uno de los más estudiados y prometedores, ya que inicialmente se demostró que estaba en tejido normal y formaciones benignas y no estaba o era escaso en los cánceres. Se expresaría en tejido normal pero no el neoplásico y además se generaron anticuerpos monoclonales comerciales específicos^{12,13} (MoAb 47) lo que permite en la actualidad la inmunocitoquímica. La muestra se considera benigna si más del 80% de las células son positivas para peroxidasa tiroidea. En las citologías intermedias su utilidad es relativa, ya que el 60% de los que presentan más del 80% de positividad son benignos, según un análisis comparativo de 6 series de la literatura médica¹⁴, y el resto, malignos. Por todo ello, con los datos expuestos, la opinión actual es que su utilidad es limitada ya que tendría una especificidad diagnóstica del 60% y una sensibilidad del 79%¹⁴.

Tiroglobulina y receptor de la tirotropina

Puede ser determinada en el bloque celular a partir de la citología extraída por PAAF, tal como se recomienda en el consenso europeo³ como demostración de que se trata de tejido tiroideo. Por otro lado, la expresión reducida del ARNm de tiroglobulina se observa en piezas quirúrgicas del cáncer de tiroides^{15,16}. Más recientemente se ha demostrado que también se puede determinar en citología de adenopatías metastásicas o de restos cervicales diluyendo la aguja de la punción, y en lo obtenido tras el lavado se mide la tiroglobulina, en la que se ha demostrado que no interfieren los anticuerpos antitiroglobulínicos circulantes del paciente, con lo que mejora el resultado de la citología¹⁷. Si además la PAAF se realiza guiada por ecografía, se llega a obtener una sensibilidad del 100% con este procedimiento, aunque no se pueda valorar la especificidad en la serie dado el escaso número de adenopatías debidas a otros procesos y, por lo tanto, negativos para cáncer¹⁸.

También se ha mostrado en los casos de citología indeterminada la concordancia diagnóstica entre la presencia de ARNm del receptor de la TSH en la muestra de citología, su presencia en sangre circulante y la benignidad o malignidad del nódulo, que es más prevalente en los casos malignos¹⁹.

MARCADORES DE DESDIFERENCIACIÓN

Telomerasa

Los telómeros son secuencias repetitivas del ADN que contribuyen a su estabilidad; disminuyen con cada división celular y llevan finalmente a la apoptosis. La telomerasa es una enzima con una proteína y un componente ARN que añade repeticiones al final del ADN y no suele estar en los tejidos del adulto. Se ha demos-

TABLA 2. Sensibilidad de la telomerasa^{20,21}

	Por telomere repeat-amplification protocol	Por reacción en cadena de la polimerasa
Cáncer	31/62 (50%)	120/154 (78%)
Adenoma	6/34 (17,6%)	40/81(49%)
Hiperplasia	4/125 (3,2%)	40/52 (18,8%)

trado que muchos tumores presentan actividad telomerasa que inmortaliza las células neoplásicas. Se determina por reacción en cadena de la polimerasa y *enzyme-linked-immunoabsorbent assay* o por *telomere repeat-amplification protocol*, por ello no es un marcador para uso habitual, que además tiene el inconveniente de que proporciona falsos positivos en la tiroiditis de Hashimoto que con frecuencia acompaña al cáncer de tiroides^{20,21}. Todo ello hace que la telomerasa sólo sea un instrumento auxiliar en el diagnóstico diferencial del cáncer de tiroides. En la tabla 2 se resumen los resultados de los estudios realizados hasta la actualidad para la determinación de telomerasa con los 2 métodos mencionados²¹.

Galectina 3

La galectina 3, conocida también como L-14 o HLBP14, forma parte de una familia de lectinas, no integrinas, que transportan betagalactósido; regula el crecimiento, tiene funciones citostáticas, transporta la lamina, interviene en la adhesión, la inflamación, la transformación maligna y las metástasis. Se puede determinar en la citología por inmunohistoquímica y *Western blot*. Se expresa en el cáncer de tiroides, es de distribución citoplasmática y nuclear y se conoce desde 1995²². Primero se detectó en los carcinomas papilares, después en los foliculares y también en los medulares^{23,24}. Puede determinarse bien en citología o en piezas quirúrgicas de forma sencilla por la existencia de anticuerpos comerciales para inmunohistoquímica. Se sobreexpresa en la mayoría de los carcinomas foliculares pero también en los adenomas, entre el 1 y el 72%, según los resultados acumulados de 8 series con numerosos casos²³⁻³¹; por ello se piensa que no distingue de forma fiable los adenomas de los carcinomas y que podría representar un papel en la transformación del nódulo de benigno a maligno⁴.

La precisión diagnóstica de la positividad de galectina 3 por inmunohistoquímica presenta una sensibilidad del 86%, una especificidad del 36%, un valor predictivo positivo del 53%, un valor predictivo negativo del 75% y la precisión diagnóstica del 59%. Por lo tanto, se puede utilizarla como un marcador suplementario pero no absoluto³¹.

RET/PTC

La inversión paracéntrica con fusión del protooncogén RET con el gen H4/D10S170 o el gen RFG/ELE1

da lugar a la forma activa RET/PTC que codifica una proteína con actividad proteincinasa presente en el 50% de los cánceres papilares, pero también en nódulos benignos (29,2%), por lo que su activación por sí misma no es suficiente como marcador de malignidad. Puede detectarse en la citología mediante transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, que no es de uso habitual y de difícil estandarización. En los estudios el 50% de los carcinomas papilares presentan el RET/PTC en la citología extraída por PAAF, pero su estudio es difícil y puede ser útil en combinación con otros marcadores^{6,10,16,32}.

Proteína p53

Es una fosfoproteína codificada por un gen supresor que se une a secuencias específicas del ácido desoxirribonucleico (ADN) regulando el ciclo celular y proteínas que inhiben la división celular, reparan el ADN y promueven la apoptosis. Las formas mutadas son dominantes e impiden que el ADN sea reparado en fase G1 y su vida media es de horas en lugar de minutos; esto permite su detección relativamente fácil por inmunohistoquímica. Su inactivación por mutación predispone al crecimiento celular. El 50% de todos los cánceres presentan mutaciones de p53, por lo que constituye la alteración genética más frecuente del cáncer en general.

Sus mutaciones se observan entre el 0 y el 10% de los cánceres papilares, en el 40% de los poco diferenciados y entre el 60 y el 90% de los anaplásicos. Su presencia se ha relacionado con peor pronóstico, pero no se piensa que sea el desencadenante de la transformación del nódulo de benigno a maligno. Por lo tanto, tiene un gran potencial como indicador pronóstico en casos poco diferenciados o anaplásicos^{4,16}.

Fusión PAX8-peroxisome-proliferator-activated receptor gamma

Hay estudios recientes que demuestran la importancia que puede tener la traslocación genética entre las regiones 3p25 y 2q13 que supone la fusión del factor de transcripción tiroideo PAX8 con el *peroxisome-proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ)³³. Se comporta como un oncogén³⁴ que acelera el crecimiento celular, reduce la apoptosis y permite la unión de las líneas celulares al lecho tisular que lo rodea³³. Se ha descrito preferentemente en el carcinoma folicular, pero no es un marcador específico del cáncer de tiroides³⁴. Su método de detección no es la inmunohistoquímica, sino la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real. En la actualidad, se cree que el carcinoma folicular que presenta esta fusión es una entidad biológica diferente; los casos que presentan PAX8-PPAR γ típicamente expresan inmunopositividad para galectina 3 pero no para el factor *Hector Battifora mesothelial cell-1*, tienden a presentarse en pacientes más jóvenes y son de tamaño reducido pero infiltrantes^{35,36}, a diferencia de los que presentan la mutación RAS que no expresan ni galectina 3 ni el

factor *Hector Battifora mesothelial cell-1*. No se ha utilizado como marcador, de forma sistemática hasta la actualidad, en la citología extraída por PAAF^{37,38}.

Combinación o perfiles de marcadores

Dadas las dificultades y limitaciones que presentan los diferentes marcadores, se ha propuesto también la utilización de sus perfiles, como^{9,15,16,25,27-29}: a) *Hector Battifora mesothelial cell-1*, citoqueratina de alto peso molecular y RET/PTC; b) galectina 3 y peroxidasa tiroidea; c) galectina 3, fibronectina 1, gen *CITIDED-1*; d) *Hector Battifora mesothelial cell-1*, citoqueratina 19, y e) *Hector Battifora mesothelial cell-1* y galectina 3.

Otros marcadores

Se ha utilizado un gran número de ellos que intervienen en la carcinogénesis o que se expresan en los tumores de forma diferente. Su abordaje es multidisciplinario y difícil dada su complejidad y la variedad de resultados que se han obtenido. Así, se ha utilizado un inhibidor del crecimiento de la señal de transducción como la caveolina o reguladores del ciclo celular como la 14-3-3 σ que interviene en el ciclo celular³⁹. Igualmente se ha estudiado las ciclinas y las cinasas dependientes de las ciclinas, así como las independientes⁴⁰. También se ha estudiado como marcador el S100A9, una proteína transportadora del calcio relacionada con la diferenciación celular y que sería un marcador de desdiferenciación^{8,41}. También se ha analizado diferentes moléculas de adhesión, ya que se encuentran sobreexpresadas en los carcinomas⁴². También se ha estudiado marcadores de los linfocitos *natural-killer*, como el CD57 cuya expresión aumentada estaría en los cánceres, así como el transportador de glucosa (GLUT-1), cuya determinación conjunta con el CD57 no añade nada más al diagnóstico de malignidad⁴³. Se ha analizado diversos marcadores como receptores del factor de crecimiento epidérmico, oncoproteínas con capacidad de crecimiento y actividad tirosincinasa, con resultados difíciles de interpretar y controvertidos³⁸.

Numerosos genes son candidatos a la tumorogénesis del cáncer de tiroides y también se los ha analizado, especialmente desde el desarrollo de microsondas que permiten el análisis de múltiples genes y la selección de patrones generales que diluciden los que aparecen en las células tumorales; este campo es uno de los que más expectativas despierta en la actualidad⁴⁴⁻⁴⁷.

La proteómica se ha introducido recientemente no para el estudio sistemático de las muestras extraídas por PAAF, sino para validar los diferentes marcadores potenciales; los estudios actuales confirman que las más apropiadas serían la galectina 3, la galectina 1 y la proteína S100C⁴⁸.

Las conclusiones de la información de que disponemos en la actualidad son que se han utilizado numerosos marcadores para mejorar la precisión diagnóstica

en los casos de citología indeterminada o sospechosa. De ellos, los más prometedores y asequibles son la peroxidasa, la tiroglobulina y la galectina 3 como marcadores de diferenciación, tanto por los resultados obtenidos como por su practicabilidad, ya que se dispone de ensayos comerciales para su determinación. Su estudio y los resultados han sido una fuente importante de conocimiento de diversos aspectos de la carcinogénesis en el cáncer de tiroides. Con la información y la experiencia reunidas hasta la actualidad, tanto la guía estadounidense² como el consenso europeo³ sobre cáncer de tiroides no recomiendan su empleo debido a sus limitaciones y a que las evidencias que presentan son insuficientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gómez JM. Cáncer de tiroides. Tiroides. En: Diéguez González C, Yturriaga Matarranz R, editores. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana; 2007. p. 253-65.
2. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SL, et al. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2006; 16:1-33.
3. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Wiersinga W, and the European Thyroid Cancer Taskforce. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid cancer of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol*. 2006; 154:787-903.
4. Haugen BR, Woodmansee WW, McDermott MT. Towards improving the utility of fine-needle aspiration biopsy for the diagnosis of thyroid tumors. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;56:281-90.
5. Sahin M, Gursoy A, Tutuncu NB, Guvener DN. Prevalence and prediction of malignancy in cytologically indeterminate thyroid nodules. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;65:514-8.
6. Letsas KP, Andrikoula M, Tsatsoulis A. Fine needle aspiration biopsy-RT-PCR molecular analysis of thyroid nodules: a useful preoperative diagnostic tool. *Minerva Endocrinol*. 2006;31: 179-82.
7. Murakawa T, Tsuda H, Tanimoto T, Tanabe T, Kitahara S, Matsubara O. Expression of KIT, EGFR, HER-2 and tyrosine phosphorylation in undifferentiated thyroid carcinoma: implication for a new therapeutic approach. *Pathol Intern*. 2005; 55:757-65.
8. Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh Q-Y, Clark OH, McMillan A. ECM1 and TMPRSS4 are diagnostic markers of malignant thyroid neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy. *Ann Surg*. 2005;242:353-63.
9. Fryknäs M, Wickenberg-Bolin U, Göransson H, Gustafsson MG, Foukakis T, Lee J-J, et al. Molecular markers for discrimination of benign and malignant follicular thyroid tumors. *Tumor Biol*. 2006;27:211-20.
10. Asa SL. The role of immunohistochemical markers in the diagnosis of follicular-patterned lesions of the thyroid. *Endocr Pathol*. 2005;16:295-309.
11. Segev DL, Clark DP, Zeiger MA, Umbricht C. Beyond the suspicious thyroid fine needle aspirate. A review. *Acta Cytol*. 2003;47:709-22.
12. Hewnry JF, Denizot A, Porcelli A, Villafane M, Zoro P, Garcia S, et al. Thyroperoxidase immunodetection for the diagnosis of malignancy on fine-needle aspiration of thyroid nodules. *World J Surg*. 1994;18:529-34.
13. De Micco C, Vassko V, Henry JF. The value of thyroid peroxidase immunochemistry for preoperative fine-needle aspiration diagnosis of the follicular variant of papillary thyroid cancer. *Surgery*. 1999;12:1200-4.
14. Savin S, Cvejic D, Isic T, Paunovic I, Tatic S, Havelka M. The efficacy of the thyroid peroxidase marker for distinguishing follicular thyroid carcinoma from follicular adenoma. *Exp Oncol*. 2006;28:70-4.
15. Fuhrer D, Eszlinger M, Karger S, Krause K, Engelhardt C, Hasenclever D, et al. Evaluation of insulin-like growth factor II, cycloxygenase-2, ets-1 and thyroid-specific thyroglobulin mRNA expression in benign and malignant thyroid tumors. *Eur J Endocrinol*. 2005;152:785-90.
16. Kogan EA, Rozhková EB, Seredin VP, Paltsev MA. Prognostic value of the expression of thyroglobulin and oncomarkers (p53, EGFR, ret-oncogene) in different types of papillary carcinoma of the thyroid: clinicopathological and immunohistochemical studies. *Arkh Patol*. 2006;68:8-11.
17. Boi F, Baghino G, Atzeni F, Lai ML, Faa G, Mariotti S. The diagnostic value for differentiated thyroid carcinoma metastases of thyroglobulin (Tg) measurement in washout fluid from fine-needle aspiration biopsy of neck lymph nodes is maintained in the presence of circulating anti-Tg antibodies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1364-9.
18. Cunha N, Rodrigues F, Curadeo F, Ilhéu O, Cruz C, Naidenov P, et al. Thyroglobulin detection in fine-needle aspirates of cervical lymph nodes: a technique for the diagnosis of metastatic differentiated thyroid cancer. *Eur J Endocrinol*. 2007; 157:101-7.
19. Wagner K, Arciaga R, Siperstein A, Milas M, Warshawsky I, Sethu S, et al. Thyrotropin receptor/thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood and fine-needle aspiration cytology: diagnosis synergy for detecting thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:1921-4.
20. Wang SL, Chen WT, Wu MT, Chan HM, Yang SF, Chai CY. Expression of human telomerase reverse transcriptase in thyroid follicular neoplasms: an immunohistochemical study. *Endocr Pathol*. 2005;16:211-8.
21. Lerma E, Mora J, and the Thyroid Study Group. Telomerase activity in "suspicious" thyroid cancer. *Cancer Cytopathol*. 2005; 105:492-7.
22. Fernández PL, Merino MJ, Gómez M, Campo E, Medina T, Castronovo V, et al. Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue. *J Pathol*. 1997;181: 80-6.
23. Collet JF, Hurbain I, Prengel C, Utzmann O, Scetbon F, Beraudin JF, et al. Galectin-3 immunodetection in follicular thyroid neoplasms: a prospective study on fine-needle aspiration samples. *Br J Cancer*. 2005;93:1175-81.
24. Ito Y, Yoshida H, Tomoda C, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, et al. Galectin-3 expression in follicular tumors: an immunohistochemical study of its use as a marker of follicular carcinoma. *Pathology*. 2005;37:296-8.
25. De Matos P, Ferreira AP, De Oliveira Facuri F, Saaumpçao LVM, Metze K, Ward LS. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology*. 2005;47:391-401.
26. Cvejic D, Savin S, Petrovic I, Selemetjev S, Paunovic I, Tatic S, et al. Galectin-3, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in papillary thyroid carcinoma. *Exp Oncol*. 2005; 27:210-4.
27. Aron M, Kapila K, Verma K. Utility of galectin 3 expression in thyroid aspirates as a diagnostic marker in differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Indian J Pathol Microbiol*. 2006;49:376-80.
28. Rossi ED, Rafaelli M, Mule A, Miraglia A, Lombardi CP, Vecchio FM, et al. Simultaneous immunohistochemical expression of HBME-1 and galectin-3 differentiates papillary carcinomas from hyperfunctioning lesions of the thyroid. *Histopathology*. 2006;48:795-800.

29. Scognamiglio T, Hyrek E, Kao J, Chen YT. Diagnostic usefulness of HBME1, galectin-3, CK19 and CITED1 and evaluation of their expression in encapsulated lesions with questionable features of papillary thyroid carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2006;126:700-8.
30. Kim MJ, Kim HJ, Hong SJ, Shong YK, Gong G. Diagnostic utility of galectin-3 in aspirates of thyroid follicular lesions. *Acta Cytol.* 2006;50:28-34.
31. Mehrotra P, Okpokam A, Bouhaider R, Johnson SJ, Wilson JA, Davis BR, et al. Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. *Histopathology.* 2004; 45:493-500.
32. Cheung CC, Carydis B, Ezzat S, Bedard YC, Asa SL. Analysis of ret/PTC gene rearrangements refines the fine needle aspiration diagnosis of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2187-90.
33. McIver B, Grebe SK, Eberhardt NL. The PAX-8/PPAR gamma fusion oncogene as a potential therapeutic target in follicular thyroid carcinoma. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2004;4:221-34.
34. Dwight T, Thopp SR, Foukakis TT, Lui WO, Wallin G, Höög A, et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor γ rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4440-5.
35. Lacroix L, Mian C, Barrier T, Talbot M, Caillou B, Schlumberger M, et al. PAX8 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 gene expression status in benign and malignant thyroid tissues. *Eur J Endocrinol.* 2004;151:367-74.
36. Lui W-O, Foukakis T, Lidén J, Thoppe SR, Dwight T, Höög A, et al. Expression profiling reveals a distinct transcription signature in follicular thyroid carcinomas with a PAX8-PPAR γ fusion oncogene. *Oncogene.* 2005;24:1467-76.
37. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, Tallini G, et al. RAS point mutation and PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:2318-26.
38. Di Cristofaro J, Silvy M, Lanteaume A, Marcy M, Carayon P, De Micco C. Expression of tpo mRNA in thyroid tumors: quantitative PCR analysis and correlation with alterations of ret, Braf, ras and pax8 genes. *Endocr Rel Cancer.* 2006;13: 485-95.
39. Ito Y, Yoshida H, Tomoda C, Urano T, Takamura Y, Miya A, et al. Caveolin-1 and 14-3-3 sigma expression in follicular variant of thyroid papillary carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2005;201:545-9.
40. Pickett CA, Agoff SN, Widman TJ, Bronner MP. Altered expression of cyclines and cell cycle inhibitors i papillary thyrod cancer: prognostic implications. *Thyroid.* 2005;15:461-73.
41. Ito Y, Arai K, Ryushi Y, Yoshida H, Urano T, Tomoda C, et al. S100A9 expression is significantly linked to dedifferentiation of thyroid carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2005;201:545-9.
42. Ensinger C, Kresmer R, Prommegger R, Spizzo G, Schmid KW. EpCAM overexpression in thyroid carcinomas: a histopathological study of 121 cases. *Immunother.* 2006;29:569-73.
43. Chandan VS, Faquin WC, Wilbur DC, Khurana KK. The role of immunolocalization of CD57 and GLUT-1 in cell blocks in fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cytopathol.* 2006;108:331-6.
44. Mehrotra P, González MA, Johnson SJ, Coleman N, Wilson JA, Davis BR, et al. Mcm-2 and Ki-67 have limited potential in preoperative diagnosis of thyroid malignancy. *Laryngoscope.* 2006;116:1434-8.
45. Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A. ECM1 and TMPRSS4 are diagnostic markers of malignant thyrod neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy. *Ann Surg.* 2005;242:353-63.
46. Cerutti JM, Latini FRM, Nakabashi C, Delcelo R, Andrade VP, Amadei MJ, et al. Diagnosis of suspicious thyroid nodules using four protein biomarkers. *Clin Cancer Res.* 2006;12: 3311-8.
47. Finley DJ, Lubitz CC, Wei C, Zhu B, Fahey III TJ. Advancing the molecular diagnosis of thyroid nodules: defining benign lesions by molecular profiling. *Thyroid.* 2005;15:562-8.
48. Torres-Cabala C, Bibbo M, Panizo-Santos A, Barazi H, Krutzsch H, Roberts DD, et al. Proteomic identification of new biomarkers and application in thyroid cytology. *Acta Cytol.* 2006;50:518-28.