



ORIGINAL

Utilidad del análisis inmunohistoquímico de diversos marcadores moleculares en la caracterización del carcinoma papilar de tiroides con metástasis linfáticas iniciales

Carles Zafón^{a,*}, Josep Castellví^b y Gabriel Obiols^a

^aServicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

^bServicio de Anatomía Patológica, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

Recibido el 18 de noviembre de 2009; aceptado el 5 de febrero de 2010

Disponible en Internet el 18 de abril de 2010

PALABRAS CLAVE

Cáncer papilar de tiroides;
Inmunohistoquímica;
Metástasis linfáticas

Resumen

Introducción y objetivo: En el carcinoma papilar de tiroides, la detección de metástasis linfáticas (ML) en la región cervical es frecuente, observándose en cerca de la mitad de los casos en el momento del diagnóstico. El objetivo del estudio es analizar mediante técnica inmunohistoquímica la expresión combinada de diversas moléculas con el fin de establecer las características de aquellos casos con mayor tendencia a desarrollar ML.

Pacientes y métodos: Treinta y cinco pacientes con carcinoma papilar de tiroides fueron distribuidos en 2 grupos. El *grupo I* incluyó 19 pacientes que no presentaron ML al diagnóstico. En el *grupo II* se incluyeron 16 pacientes en los cuales se había demostrado la presencia de ML. En todos los casos se practicó tinción inmunohistoquímica para RET/PTC, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), p16^{INK4a}, p21^{cip1}, p27^{kip1}, BCL2 y pAKT.

Resultados: No se apreciaron diferencias en ambos grupos en relación a p21^{cip1}, p27^{kip1}, p16^{INK4a}, Bcl-2 y pAKT. No obstante, se observaron diferencias de expresión para RET/PTC y para EGFR, siendo ambas más frecuentes en los pacientes con ML. Asimismo se vio que la doble positividad de RET/PTC y el EGFR discriminaba de manera significativa los casos con ML. Finalmente, la triple combinación: RET/PTC negativo, EGFR negativo y p16^{INK4a} negativo no se daba en ningún paciente del grupo II y en casi la mitad del grupo I.

Conclusiones: El estudio de la expresión de diversas moléculas de manera combinada puede resultar eficaz en la caracterización fenotípica del carcinoma papilar de tiroides. Con ello se podría mejorar el manejo de los pacientes con cáncer de tiroides.

© 2009 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: 26276czl@comb.cat (C. Zafón).

KEYWORDS

Papillary thyroid carcinoma; Immunohistochemistry; Lymph node metastasis

Usefulness of the immunohistochemical analysis of several molecular markers in the characterization of papillary thyroid carcinoma with initial lymph node metastasis

Abstract

Introduction and objective: Regional lymph node metastases (LNM) are a common finding in papillary thyroid cancer (PTC). Approximately half of patients have LNM at diagnosis. The aim of this study was to analyze immunohistochemically the combined expression of different PTC-related molecules in order to identify cases with a tendency to show LNM.

Patients and methods: Thirty-five patients were included in the study. The patients were distributed in two groups. Group I included 19 patients with no histological evidence of LNM at diagnosis. Group II included 16 patients with histological evidence of cervical LNM. Samples were stained for RET/PTC, EGFR, p16^{INK4a}, p21^{cip1}, p27^{kip1}, BCL2, and pAKT.

Results: Expression of p21^{cip1}, p27^{kip1}, p16^{INK4a}, Bcl-2, and pAKT showed no differences between the two groups. However, RET/PTC and EGFR expression showed significant differences: in both cases, staining was more frequent in patients with LNM. Simultaneous positivity of RET/PTC and EGFR was a discriminative marker in patients with LNM. Finally, the combination of RET/PTC negative, EGFR negative and p16^{INK4a} negative was found in none of the patients with LNM but in nearly half of those in group I.

Conclusions: Immunohistochemical analysis of several molecular markers could be useful in the phenotypic characterization of PTC. Application of these markers could enhance diagnosis and improve the management of patients with thyroid cancer.

© 2009 SEEN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El carcinoma papilar de tiroides (CPT) es la neoplasia endocrina más frecuente. Se caracteriza por su excelente pronóstico con supervivencias que superan el 90% a los 10 años de seguimiento¹. No obstante, las recidivas de la enfermedad no son infrecuentes llegando a alcanzar en algunas series hasta el 20% de los casos². Una de las formas de presentación más frecuente de la recurrencia es la invasión de los ganglios regionales. De hecho, el CPT se caracteriza por la elevada facilidad con que se propaga por vía linfática, de modo que más del 30% de los pacientes suelen presentarse con afectación ganglionar en el momento del diagnóstico³. A pesar de ello, algunos autores han descrito que la presencia de metástasis linfáticas (ML) en la región cervical, ya sea al inicio o con posterioridad, no implica obligatoriamente un empeoramiento del pronóstico⁴.

Por otro lado, en los últimos años se han empezado a dilucidar las bases genéticas que determinan la transformación tumoral de las células tiroideas normales hasta el CPT. Así, se han descrito diversas mutaciones algunas de las cuales son altamente específicas en este tipo de neoplasia. Entre ellas cabe destacar *rearranged in transformation/papillary thyroid carcinomas* (RET/PTC) que es el resultado del reordenamiento cromosómico del gen *RET* y que se considera como una alteración inicial en el desarrollo del CPT⁵. Asimismo, diversos autores han demostrado la importancia de ciertas familias de oncogenes, cuya implicación se había puesto de manifiesto en tumores de otras localizaciones y que pueden tener su papel en el carcinoma diferenciado de tiroides. De este modo, se han podido analizar diferentes moléculas reguladoras del ciclo celular, factores relacionados con la apoptosis o receptores con actividad tirosina cinasa.

El objetivo del presente estudio es analizar la expresión inmunohistoquímica de diferentes moléculas en pacientes con CPT en relación a la presencia de metástasis ganglionares iniciales. Para ello, comparamos la expresión de RET/PTC, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), p16^{INK4a}, p21^{cip1}, p27^{kip1}, BCL-2 y pAKT en muestras tumorales de pacientes afectos de CPT con y sin metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico.

Material y método

Pacientes

Se realizó una revisión sistemática de los pacientes tratados de CPT en nuestro centro. Se seleccionaron aquellos casos de los cuales se dispusiera de toda la información clínica e histológica, que tuvieran un seguimiento posterior al tratamiento superior a los 5 años y que no presentaran metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. En todos los casos el tratamiento inicial consistió en tiroidectomía total con vaciamiento linfático central, seguida de ablación de restos con yodo 131. Así se incluyeron 35 pacientes que fueron distribuidos en 2 grupos:

Grupo I: incluyó 19 pacientes (15 mujeres y 4 varones) con una media \pm desviación típica de edad al diagnóstico del tumor de $38,6 \pm 10$ años. El tiempo de seguimiento desde el tratamiento fue de $13,2 \pm 4,3$ años. En ningún caso se demostró afectación ganglionar en el momento de la cirugía inicial.

Grupo II: incluyó 16 pacientes (11 mujeres y 5 varones) con una edad inicial de $30,6 \pm 18$ años. El tiempo de seguimiento fue de $12,9 \pm 5,3$ años. Todos los pacientes presentaban ML cervicales, demostradas histológicamente, en el momento del diagnóstico.

Tabla 1 Anticuerpos utilizados para las tinciones immunohistoquímicas con la dilución empleada en cada caso

Anticuerpo	Clon	Fabricante	Dilución
RET/PTC	Policlonal	Santa Cruz	1:50
p16 ^{INK4a}	6H12	Novocastra	1:25
p21 ^{Cip1}	SX118	Dako	1:50
p27 ^{Kip1}	SX53G8	Dako	1:100
Bcl2	100	Biogenex	1:100
EGFR	K1494	Dako	1:100
pAKT ser 473	Policlonal	Cell Signaling	1:50

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Metodología

De los casos seleccionados, se revisó la histología para confirmar el diagnóstico y se seleccionaron 3 zonas representativas del tumor. De los bloques de matrices de tejidos se realizaron cortes de 3 µ que fueron desparafinados y rehidratados con pases sucesivos en xíol y alcoholes. Posteriormente, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena mediante peróxido de hidrógeno. El desenmascaramiento antigenico se realizó mediante calor con tampón citrato a pH 6. El anticuerpo primario utilizado así como la dilución empleada en cada caso están indicados en la **tabla 1**. Para visualizar la reacción se usó el sistema Envision (Dako, Glostrup, Dinamarca). Para todos los anticuerpos se utilizaron casos controles positivos conocidos y se realizaron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario.

Interpretación de resultados

Para todos los anticuerpos se evaluó la localización de la tinción, la intensidad de la misma así como el porcentaje de células positivas. Los anticuerpos con tinción nuclear (p16^{INK4a}, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, pAKTn) se evaluaron utilizando el *histoscore* calculado de la siguiente manera: porcentaje de células con intensidad fuerte × 3+porcentaje de células moderadas × 2+porcentaje de células débiles × 1. Los resultados posibles van de 0–300 y se consideró una muestra positiva cuando el *histoscore* era superior a 10. Los marcadores con positividad citoplasmática (p16^{INK4a}, bcl2, pAKTc, y RET/PTC) se evaluaron en 4 posibles valores: negativo, 1+ (débil), 2+ (moderado) y 3+ (fuerte). El marcador de expresión de membrana EGFR se evaluó como negativo (ausencia de expresión), 1+ (expresión focal de parte de la membrana), 2+ (expresión de toda la membrana pero débil) y 3+ (expresión intensa en toda la membrana). Para el estudio estadístico se consideró una muestra positiva cuando el valor fue de 2+ – 3+.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba exacta de Fisher en el estudio univariante, y mediante el test de la t de Student para comparar variables continuas entre los grupos. Se consideró con significación estadística una p inferior o igual a 0,05.

Resultados

No hubo diferencias significativas en las características de los 2 grupos en cuanto a edad al diagnóstico, sexo o tiempo de evolución de la enfermedad.

La **tabla 2** resume los hallazgos de las tinciones immunohistoquímicas. No se apreciaron diferencias en ambos grupos en relación a los marcadores de ciclo celular (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p16^{INK4a}). Aunque no alcanzó significación estadística, la positividad para p16^{INK4a} fue superior en el grupo II (44% frente a 16%; p=0,06). Tampoco se apreciaron diferencias en la actividad de AKTn, AKTc y en Bcl-2. No obstante, el estudio immunohistoquímico puso de manifiesto diferencias de expresión para RET/PTC y para EGFR. En el caso de RET/PTC, 9 de los 19 pacientes del grupo I (47,3%) fueron portadores de la alteración genética, mientras que en los pacientes del grupo II la positividad se elevó a 13 de las 16 muestras (81,3%) (p=0,038). Por otro lado, tan solo en 5 casos (26%) del grupo I se observó tinción para EGFR y, en cambio, 11 casos resultaron positivos en el grupo II (68,7%) (p=0,01).

Tabla 2 Positividad de las tinciones immunohistoquímicas de las diferentes moléculas estudiadas para cada uno de los dos grupos

	Grupo I	Grupo II	p
RET/PTC	9 (47,4 %)	13 (81,3 %)	0,038
p21 ^{Cip1}	5 (26 %)	6 (37,5 %)	ns
p27 ^{Kip1}	11 (58 %)	8 (50 %)	ns
PAKTn	10 (52,6 %)	10 (62,5 %)	ns
PAKTc	6 (31,5 %)	3 (18,7 %)	ns
p16 ^{INK4a}	3 (16 %)	7 (44 %)	ns
BCL2	5 (26 %)	8 (50 %)	ns
EGFR	5 (26 %)	11 (68,7 %)	0,012

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; ns: no significativo.

Tabla 3 Análisis combinado. Fenotipos con expresión significativamente diferente en función del grupo estudiado

	Grupo I (n=19)	Grupo II (n=16)	p	Riesgo de ML
RET/PTC–	8 (42 %)	0	0,003	bajo
EGFR–				
RET/PTC– p16 ^{INK4a} –	10 (53 %)	1 (6,2 %)	0,004	bajo
RET/PTC– p16 ^{INK4a} +	8 (42 %)	0	0,003	bajo
EGFR– p16 ^{INK4a} +				
RET/PTC+ EGFR–	3 (16 %)	8 (50 %)	0,03	alto
RET/PTC+ EGFR+	2 (11 %)	7 (44 %)	0,02	alto
P27 ^{Kip1} –				

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; ML: metástasis linfática.

En el estudio combinado se observó que la doble positividad de RET/PTC y EGFR tan solo estaba presente en 3 (16%) pacientes sin metástasis ganglionares iniciales, mientras que se encontraba en 8 (50%) de los pacientes con afectación ganglionar ($p=0,03$). Paralelamente, la doble negatividad de ambos marcadores se encontró en 8 casos del grupo I (42%), no habiendo ningún caso en el grupo II con este fenotipo ($p=0,003$). Finalmente, la triple combinación más discriminatoria fue RET/PTC negativo, EGFR negativo y p16^{INK4a} negativo, que no se da en ningún paciente del grupo II y en casi la mitad, 8 de 19 (42%), del grupo I ($p=0,003$). En la tabla 3 se resumen los fenotipos más característicos para cada uno de los 2 grupos.

Discusión

El CPT suele tener un buen pronóstico aunque en alrededor de 1 de cada 5 pacientes se detecta una recurrencia de la enfermedad². En muchos casos se halla la afectación de ganglios linfáticos. Las metástasis ganglionares están presentes en el momento del diagnóstico en un porcentaje que supera el 30% de los casos³. Existe una cierta controversia si la extensión linfática regional empeora el pronóstico a medio o largo plazo⁴. Por otro lado, en los últimos 10 años hemos asistido a un avance muy importante en el conocimiento de las bases moleculares que subyacen a la tumorogénesis del CPT. En este estudio hemos analizado, mediante tinciones inmunohistoquímicas, las posibles diferencias de expresión de algunas de estas moléculas en muestras de CPT según tuvieran afectación linfática inicial.

RET/PTC fue una de las primeras alteraciones descritas en el CPT⁵. Se trata de una inversión pericentromérica en el cromosoma 10 cuyo resultado es la activación no constitutiva del dominio enzimático del receptor tirosincinasa RET. Su presencia es extraordinariamente variable según las series (5–80%)⁷. Algunos trabajos apuntan que es más frecuente en aquellos casos con metástasis ganglionares^{8–10}, aunque los resultados no son concluyentes¹¹. En nuestro estudio existe una diferencia claramente significativa entre ambos grupos, de tal forma que la positividad se asocia a casos con afectación ganglionar al diagnóstico.

El EGFR es otro receptor transmembrana con actividad tirosinacina. Diversos estudios publicados en la década de los 90 del siglo pasado apuntaban que EGFR se encuentra sobreexpresado en un porcentaje elevado de carcinomas de tiroides, especialmente en las variantes más agresivas como el carcinoma indiferenciado^{12–14}. Por otro lado, se ha visto que su localización celular es diferente según se trate de CPT o de carcinoma folicular de tiroides^{15,16}. Chen et al¹² han observado que la coexpresión de EGFR y de la proteína p53 en el CPT se asocia a un mayor riesgo de afectación linfática y a un mayor tamaño del tumor. Nuestro estudio corrobora esta primera afirmación. Algunos artículos recientes indican que RET/PTC podría inducir la proliferación celular a través de la activación de EGFR¹⁷. En el presente trabajo, la doble positividad de RET/PTC y EGFR es una de las combinaciones más discriminatorias para la presencia de metástasis ganglionares. La aparición de fármacos específicos que bloquean la actividad de receptores tirosincinasa refuerza la importancia del estudio de estas moléculas^{18–20}.

En los últimos años se ha podido comprobar como diferentes proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular están implicadas en la tumorogénesis de diversas neoplasias²¹. De las numerosas sustancias que participan en él, cabe destacar los inhibidores de las ciclina cinasas y particularmente los miembros de la familia CIP/KIP, p21^{Cip1} y p27^{Kip1} y el miembro de la familia INK4, p16^{INK4a}. Las 3 moléculas son consideradas como genes supresores tumorales debido a que inhiben la progresión del ciclo celular de las células neoplásicas. Han sido estudiadas en numerosos cánceres humanos y los resultados han sido poco concluyentes. Los pocos estudios publicados en cáncer de tiroides no permiten establecer su posible utilidad en esta neoplasia²². En nuestro trabajo no observamos ninguna relación con las ML cuando se analizan de forma individual, aunque la positividad para p16^{INK4a} fue superior en el grupo II sin que alcanzara la significación estadística, probablemente debido al tamaño de la muestra. No obstante, el estudio de reguladores de ciclo celular en combinación con otras moléculas ayuda a definir aquellos pacientes con mayores probabilidades de extensión inicial de la enfermedad.

El balance entre proliferación y apoptosis desempeña un papel fundamental en la capacidad de crecimiento tumoral. Bcl-2 es considerada una molécula inhibidora de apoptosis a través de preservar la integridad de la membrana mitocondrial. Para la mayoría de autores que han analizado la molécula, su baja expresión se correlaciona con un mayor grado de indiferenciación celular y por ello, con un peor pronóstico^{23,24}. En el trabajo actual no encontramos ninguna utilidad de Bcl-2 como marcador de afectación ganglionar, en concordancia con otros autores^{25,26}.

Otra de las vías moleculares que interviene en la regulación del balance entre la apoptosis y la supervivencia celular es la conocida como PI3K-AKT. Se ha descrito un aumento de su actividad en numerosas neoplasias. Larson et al²⁷ han encontrado un incremento de expresión en los componentes de la vía en las zonas de tiroides con cáncer en comparación al tejido tiroideo peritumoral. Por su lado, Vasko et al²⁸ han confirmado una alta expresión de la actividad de AKT (determinada como fosforilación de AKT o pAKT) en muestras tumorales de CDT. Asimismo, han observado que la positividad se localizaba en el núcleo celular (pAKTn) en el caso de los carcinomas foliculares mientras que era citoplasmática (pAKTc) en los CPT. Finalmente, los autores comprobaban como la presencia de pAKT nuclear se asociaba a la expresión citoplasmática de p27^{Kip1}. En el presente estudio, la actividad de AKT, tanto nuclear como citoplasmática, no se correlaciona con el estadio inicial del CPT.

En el momento actual, no existe ningún marcador molecular que sea utilizado de manera sistemática en el estudio clínico del CPT. El motivo es que ninguno de ellos ha demostrado que pueda mejorar los criterios clásicamente establecidos en el manejo del carcinoma. Es por ello que muchos autores opinan que la utilidad de los marcadores inmunohistoquímicos pasa por la combinación de varios de ellos, para establecer paneles de múltiples moléculas que definen de manera más precisa las características fenotípicas de cada caso^{29,30}. En el presente estudio la combinación de diversos marcadores como RET/PTC, EGFR y p16^{INK4a} ha mostrado un valor discriminatorio en los casos con CPT y ML iniciales.

En resumen, nuestro trabajo establece la utilidad de la tinción inmunohistoquímica de ciertas moléculas en relación al riesgo de ML iniciales en el CPT. Asimismo, proponemos la mayor efectividad de la técnica cuando se combinan diferentes proteínas con la finalidad de caracterizar de manera más correcta el tumor y con ello, poder establecer pautas de tratamiento y seguimiento mucho más específicas.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Pelizzo MR, Merante Boschin I, Toniato A, Pagetta C, Casal Ide E, Mian C, et al. Diagnosis, treatment, prognostic factors and long-term outcome in papillary thyroid carcinoma. *Minerva Endocrinol.* 2008;33:359–79.
- Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2006;16:109–42.
- Mazzaferrri EL, Doherty G, Steward DL. The pros and cons of prophylactic central compartment lymph node dissection for papillary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2009;19:683–9.
- Lin JD, Liou MJ, Chao TC, Weng HF, Ho YS. Prognostic variables of papillary and follicular thyroid carcinoma patients with lymph node metastases and without distant metastases. *Endocr Relat Cancer.* 1999;6:109–15.
- Viglietto G, Chiappetta G, Martinez-Tello FJ, Fukunaga FH, Tallini G, Rigopoulou D, et al. RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis. *Oncogene.* 1995;11: 1207–10.
- Fusco A, Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Pilotti S, Pierotti MA, et al. A new oncogen in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature.* 1987;328:170–2.
- Zafon C, Obiols G. Vía de señalización dependiente de la proteíncinasa de activación mitogénica en el carcinoma papilar de tiroides. De las bases moleculares a la práctica clínica. *Endocrinol Nutr.* 2009;56:176–86.
- Mai KT, Vaccani JP, Thomas J, Odell PF. Immunostaining for ret oncogene proteins in papillary thyroid carcinoma: a correlation of ret immunoreactivity and potential of lymph node metastasis. *Thyroid.* 2001;11:859–63.
- Miki H, Kitaichi M, Masuda E, Komaki K, Yamamoto Y, Monden Y. ret/PTC expression may be associated with local invasion of thyroid papillary carcinoma. *J Surg Oncol.* 1999;71:76–81.
- Zafon C, Obiols G, Castellvi J, Tallada N, Baena JA, Simó R, et al. Clinical significance of RET/PTC and p53 protein expression in sporadic papillary thyroid carcinoma. *Histopathology.* 2007;50: 225–31.
- Basolo F, Molinaro E, Agate L, Pinchera A, Pollina L, Chiappetta G, et al. RET protein expression has no prognostic impact on the long-term outcome of papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2001;145:599–604.
- Chen BK, Ohtsuki Y, Furiata M, Takeuchi T, Iwata J, Liang SB, et al. Co-overexpression of p53 protein and epidermal growth factor receptor in human papillary thyroid carcinomas correlated with lymph node metastasis, tumor size and clinicopathologic stage. *Int J Oncol.* 1999;15:893–8.
- Gorgoulis V, Aninos D, Priftis C, Evangelopoulou C, Karameris A, Kanavaros P, et al. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in thyroid tumors. *In Vivo.* 1992;6:291–6.
- Schiff BA, McMurphy AB, Jasser SA, Younes MN, Doan D, Yigitbasi OG, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in anaplastic thyroid cancer, and the EGFR inhibitor gefitinib inhibits the growth of anaplastic thyroid cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:8594–602.
- Marti U, Ruchti C, Kämpf J, Thomas GA, Williams ED, Peter HJ, et al. Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. *Thyroid.* 2001;11:137–45.
- Ness GO, Haugen DR, Varhaug JE, Akslen LA, Lillehaug JR. Cytoplasmic localization of EGF receptor in papillary thyroid carcinomas: association with the 150-kDa receptor form. *Int J Cancer.* 1996;17:161–7.
- Croyle M, Akeno N, Knauf JA, Fabbro D, Chen X, Baumgartner JE, et al. RET/PTC-induced cell growth is mediated in part by epidermal growth factor receptor (EGFR) activation: evidence for molecular and functional interactions between RET and EGFR. *Cancer Res.* 2008;68:4183–91.
- Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia.* 2003;17:1263–93.
- Ensinger C, Spizzo G, Moser P, Tschoerner I, Prommegger R, Gabriel M, et al. Epidermal growth factor receptor as a novel therapeutic target in anaplastic thyroid carcinomas. *Ann NY Acad Sci.* 2004;1030:69–77.
- Pinto Couto J, Prazeres H, Castro P, Lima J, Maximo V, Soares P, et al. How molecular pathology is changing and will change the therapeutics of patients with follicular cell-derived thyroid cancer? *J Clin Pathol.* 2009;6:414–21.
- Park M, Lee S. Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol.* 2003;36:60–5.
- Zafon C, Obiols G, Castellvi J, Ramon y Cajal S, Baena JA, Mesa J. Expression of p21^{cip1}, p27^{kip1}, and p16^{INK4a}, cyclin-dependent kinase inhibitors in papillary thyroid carcinoma: correlation with clinicopathological factors. *Endocr Pathol.* 2008;19:184–9.
- Branet F, Brousset P, Krajewski S, Schlaifer D, Selves J, Reed JC, et al. Expression of the cell death-inducing gene bax in carcinomas developed from the follicular cells of the thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:2726–30.
- Pilotti S, Collini P, Rilke F, Cattoretti G, Del Bo R, Pierotti MA. Bcl-2 protein expression in carcinomas originating from the follicular epithelium of the thyroid gland. *J Pathol.* 1994;172:337–42.
- Aksoy M, Giles Y, Kapran Y, Terzioglu T, Tezelman S. Expression of bcl-2 in papillary thyroid cancers and its prognostic value. *Acta Chir Belg.* 2005;105:644–8.
- Siironen P, Nordling S, Louhimo J, Haapiainen R, Haglund C. Immunohistochemical expression of Bcl-2, Ki-67, and p21 in patients with papillary thyroid cancer. *Tumour Biol.* 2005;26: 50–6.
- Larson SD, Jackson LN, Riall TS, Uchida T, Thomas RP, Qiu S, et al. Increased incidence of well-differentiated thyroid cancer associated with Hashimoto's thyroiditis and the role of the PI3K/AKT pathway. *J Am Coll Surg.* 2007;204:764–75.
- Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V, et al. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet.* 2004;41:161–70.
- Liu YY, Morreau H, Kievit J, Romijn JA, Carrasco N, Smit JW. Combined immunostaining with galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, Hector Battifora mesothelial-1, cytokeratin-19, peroxisome proliferator-activated receptor-(gamma), and sodium/iodide symporter antibodies for the differential diagnosis of non-medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2008;158:375–84.
- Rossi ED, Raffaelli 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.