

Detección de marcadores de malignidad en nódulos tiroideos por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Pedro Pineda B¹, Paula Rojas G¹, Claudio Liberman G¹, Leonor Moyano S², Irmgardt Goecke S³.

Detection of malignancy markers in thyroid nodules by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Background: Nodular thyroid disease is a very common disorder with a low frequency of malignancy. The most accurate diagnostic test is fine needle aspiration biopsy (FNAB) of nodules with cytological analysis of the sample. However, this procedure has some limitations in the diagnosis of follicular and papillary thyroid carcinoma. **Aim:** To detect mRNA from specific malignancy markers in thyroid nodules and to evaluate their potential correlation with cytological and pathological diagnosis. **Patients and methods:** In 20 patients with thyroid nodules FNAB was performed prior to surgery. The main part of the FNAB sample was used to perform classical cytology. In the remaining of the sample were detected MUC-1, CD26, galectin-3 and TSH receptor mRNAs by RT-PCR technique. **Results:** Eight patients had positive cytology for papillary cancer; which was confirmed by pathology. Nine had suspicious or non conclusive cytological findings and 3 were negative for neoplastic cells; all 12 were pathologically benign. We detected TSH receptor and galectin-3 mRNA in almost all benign and malignant nodules. MUC-1 was present in 5/8 papillary carcinoma (62.5%), and 1/12 benign nodules (8.3%). CD26 was detected in 7/8 papillary carcinomas but also in 8/12 benign nodules. **Conclusions:** RT-PCR can be performed in very small samples of thyroid tissue to detect several mRNA markers. MUC-1 can be a potentially useful marker of malignancy in thyroid nodules. It can be detected by RT-PCR as a complementary technique in the diagnostic evaluation of thyroid nodules (Rev Méd Chile 2003; 131: 965-72).

(Key Words: Biopsy, needle; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Thyroid neoplasms; Thyroid nodule)

Recibido el 31 de enero, 2003. Aceptado en versión corregida el 30 de junio, 2003.

Sección Endocrinología, Departamento de Medicina¹, Servicio Anatomía Patológica², Hospital Clínico Universidad de Chile y Programa de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas³, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Trabajo financiado por Fondo de Investigación Médica APERTUS, Laboratorio Andrómaco y Sociedad Chilena de Endocrinología y Metabolismo N° 2000 5 01.

Correspondencia a: Dr. Pedro Pineda B. Sección Endocrinología, Hospital Clínico Universidad de Chile. Santos Dumont 999, Independencia. Teléfono: 56-2-6788430. Fax: 56-2-7776891. E mail: ppineda@ns.hospital.uchile.cl

Los nódulos tiroideos son una patología frecuente en la población general; en series extranjeras se estima su presencia entre 3,2 a 4,2% si se pesquisan por palpación^{1,2}, y 27 a 67% si se considera el diagnóstico realizado a través de técnicas de imagen como la ecotomografía^{3,4}.

Es importante señalar que la mayoría de los nódulos tiroideos son de naturaleza benigna y sólo un pequeño porcentaje de ellos (5 a 15%) corresponde a tumores malignos (carcinomas); en estos últimos, el tratamiento inicial de elección es la resección del tumor^{5,6}. Debe considerarse sin embargo, que la tiroidectomía puede presentar complicaciones en 0,2 a 6,9% de los casos, dependiendo de la extensión de la resección y de la experiencia del equipo quirúrgico⁷. Dada la alta prevalencia de los nódulos tiroideos, su baja frecuencia de malignidad, y considerando la morbilidad y costos asociados a la tiroidectomía, es indispensable contar con técnicas de diagnóstico diferencial que posean altos valores de sensibilidad y especificidad para detectar lesiones benignas y malignas, y así realizar un tratamiento adecuado en cada caso.

En la actualidad, la herramienta diagnóstica fundamental en el diagnóstico diferencial del nódulo tiroideo es la punción aspirativa con aguja fina (PAAF), que permite establecer un diagnóstico a través del análisis citológico de la muestra. En centros con experiencia, se han alcanzado cifras de sensibilidad de 65-98% y especificidad de 72-100% para el diagnóstico de malignidad⁸⁻¹⁰.

Sin embargo, la PAAF tiene algunas limitaciones, entre ellas la necesidad de contar con una muestra con celularidad adecuada, y requerir un citólogo de experiencia para el análisis de la muestra. En algunos casos (3-17%), pese a una adecuada técnica, la muestra obtenida es insuficiente o no concluyente para el diagnóstico^{9,10}.

Los hallazgos citológicos pueden ser inespecíficos, especialmente en el caso de las neoplasias foliculares tiroideas, en que la PAAF no permite diferenciar el adenoma del carcinoma folicular, ya que el diagnóstico diferencial entre ambas patologías se basa principalmente en la detección de invasión capsular o vascular por el tumor, lo que requiere un análisis histológico riguroso de la totalidad de la neoplasia. En estas situaciones la citología sólo puede informar una lesión "sospecho-

sa de neoplasia", alcanzando 10-17% de las PAAF. La frecuencia de malignidad de estos nódulos informados como "sospechosos" es de sólo 12 a 24% en las distintas series¹⁰⁻¹². En general, en estos casos el tratamiento recomendado es el quirúrgico, ante la imposibilidad de establecer un diagnóstico de certeza, lo que lleva a realizar un gran número de tiroidectomías innecesarias.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de diagnóstico de patología tumoral que han intentado optimizar las clásicas técnicas citohistológicas. Con este fin, se han logrado detectar proteínas de expresión selectiva en tumores malignos mediante técnicas de inmunocitoquímica^{13,14}, y también los ARN mensajeros (mRNA) de dichas proteínas mediante transcripción reversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)¹⁵⁻¹⁷. Esta última herramienta tiene la ventaja de requerir una escasa cantidad de muestra, por lo que pudiera ser suficiente el material remanente en la jeringa de PAAF luego de ser enviado a citología, para estudiar diversos marcadores tumorales en la misma muestra. En general, su rol actual es complementario a las técnicas clásicas de diagnóstico y seguimiento, ya que también tienen algunas limitaciones, especialmente en términos de especificidad y reproducibilidad^{18,19}.

En el caso de las neoplasias tiroideas, la experiencia en el uso de estos marcadores es aún limitada, pero en los últimos años se han detectado distintos marcadores que pueden ser útiles en el diagnóstico de esta patología, como MUC-1, CD26, galectina-3, CD44 v6, fibronectina oncofetal, RET/PTC, p53, telomerasa y BRAF²⁰⁻²⁷.

Si bien estas técnicas parecen prometedoras, hasta el momento los reportes de la literatura corresponden a estudios realizados en tejido tiroideo obtenido en el acto quirúrgico o en aspirado con aguja, y en estos casos, los estudios han sido en un número variable, analizando marcadores tumorales de tiroides en forma individual, y con resultados, en ocasiones, contradictorios^{28,29}.

El propósito del presente trabajo fue analizar mediante RT-PCR la expresión de diversos marcadores tumorales de posible utilidad diagnóstica en neoplasias tiroideas, en la práctica clínica habitual. Para ello se almacenó RNA extraído del remanente de la muestra obtenida por PAAF que era

enviada a citología de rutina. En aquellos pacientes que fueron sometidos a tratamiento quirúrgico se realizó la RT-PCR, evaluándose la expresión de MUC-1, CD26 y galectina-3. En estudios previos, estos marcadores se han asociado a diversas patologías tumorales malignas, incluyendo carcinomas tiroideos. Los resultados de este estudio se compararon con los hallazgos de la citología preoperatoria y con el diagnóstico histológico de la pieza quirúrgica.

MATERIAL Y MÉTODO

Pacientes y muestras. Se estudiaron 46 pacientes seleccionados en forma prospectiva, portadores de nódulos tiroideos que debían ser estudiados mediante PAAF. Después de obtener el consentimiento informado se les realizó una PAAF con la técnica habitual³⁰, confirmando en forma contemporánea la suficiencia de la muestra. Del remanente de la muestra se extrajo inmediatamente RNA total usando Trizol Ls (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante, almacenándose las muestras a -80°C hasta el momento del estudio.

De este total, 20 pacientes fueron sometidos a un tratamiento quirúrgico de su patología nodular tiroidea, según indicación de su médico tratante, tomando en cuenta elementos clínicos y citológicos. En todos ellos se realizó el estudio histológico convencional de la pieza operatoria, a cargo de patólogos de experiencia. Las muestras de RNA de estos 20 pacientes, almacenadas al momento de realizar la PAAF, fueron posteriormente procesadas para el estudio de marcadores tumorales mediante RT-PCR. Los 26 pacientes restantes no fueron sometidos a cirugía y, por tanto, no se incluyeron en el estudio.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

RT-PCR. El RNA de las muestras seleccionadas para estudio fue sometido a transcripción reversa en un volumen final de 20 µL utilizando *random* hexámeros como partidores. Posteriormente, 2 µL del cDNA obtenido fueron utilizados para llevar a cabo una reacción de PCR con partidores específicos para los marcadores estudiados (MUC-1, CD26 y galectina-3) y para receptor de TSH (R-TSH), el

que fue usado como control de amplificación y marcador específico de tejido tiroideo. Se utilizaron los *kits Superscript Preamplification System y PCR Reagent System* (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Los partidores usados para amplificar los marcadores estudiados fueron los siguientes:

MUC-1:

sentido 5'-ACCACCACCATGACACCGGGCACCCAGTCTCC-3'

antisentido 5'-CGAGGTGACATCCTGTCCCGAGGTGGCAGCTGAACCTG-3'

CD26:

sentido 5'-GTCACCAATGCAACTTTCC-3'

antisentido 5'-ATGTGTTGCCGTGCCACTAA-3'

Galectina-3:

sentido 5'-CCAAACCCTCAAGGATG-3'

antisentido 5'-GCAACCTTGAAGTGGTC-3'

Receptor de TSH:

sentido 5'-AATCCCTGTGAATGCTTTTC-3'

antisentido 5'-ACTCAAGGAAAAGTGAAGTT-3'

Los cDNA fueron sometidos a 45 ciclos sucesivos de 95°C x 45 s, 55°C x 60 s y 72°C x 63 s, realizándose una denaturación inicial de 5 min y una extensión final de 10 min. Los productos del PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en el caso de CD26, galectina-3 y R-TSH y al 2% para el caso de MUC-1, y teñidos con bromuro de etidio.

Estudios previos han mostrado que existe una sobreexpresión de MUC-1 en el carcinoma tiroideo y, además, debido a procesamiento alternativo del RNA se expresan dos subtipos de mRNA²⁰. Con los partidores aquí utilizados se obtienen dos productos de PCR: uno de 309 pb de expresión común al tejido tiroideo normal o neoplasias benignas y otro que sería indicativo de neoplasia maligna, con peso ligeramente superior (336 pb). De esta forma, se consideró como resultado positivo la obtención de la banda de mayor peso molecular en el caso de MUC-1, mientras que la sola expresión fue considerada positiva en el caso de los marcadores CD26, galectina-3 y R-TSH.

RESULTADOS

Del total de 46 pacientes en los que se obtuvo RNA del remanente de la muestra obtenida por PAAF, 20 fueron sometidos a tratamiento quirúrgico-

co, en los que se evaluó la expresión de marcadores tumorales mediante RT-PCR. El análisis citológico de las muestras estudiadas permitió clasificar a los pacientes en 5 grupos:

Citología positiva para células neoplásicas (8 casos). Citología sospechosa de neoplasia papilar (3 casos). Citología sospechosa de neoplasia folicular (4 casos). Citología no concluyente (2 casos). Citología negativa para células neoplásicas (3 casos).

No hubo casos de citología insuficiente. En consecuencia, el estudio citológico convencional permitió hacer diagnóstico sólo en 11 casos (55%).

El estudio histológico final de dichos nódulos confirmó la presencia de carcinoma papilar tiroideo en los 8 casos de citología positiva. En todos los casos restantes, con citología sospechosa, no concluyente o negativa para células neoplásicas, la histología reveló la presencia de una neoplasia benigna (12 casos, ver Tabla 1).

Se logró aislar RNA en la totalidad de las muestras obtenidas por PAAF, en concentraciones que permitieron realizar la técnica de RT-PCR específica para todos los marcadores utilizados.

El estudio molecular de las muestras estudiadas permitió detectar la presencia del receptor de TSH en todos los casos estudiados, lo que permite inferir el origen tiroideo de la muestra obtenida.

Respecto a los marcadores estudiados, MUC-1 estaba presente en 5 de los 8 carcinomas papilares (62,5%) y sólo en 1 de los 12 casos con histología benigna (8,3%). CD26 fue positivo en 7 de los 8 casos informados como carcinoma papilar, pero también en 8 de 12 pacientes con histología benigna. Galectina-3 estaba presente prácticamente en la totalidad de las muestras benignas y malignas (Figuras 1, 2 y Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de los hallazgos citológicos y la detección de mRNA de marcadores de malignidad en muestras obtenidas por PAAF con la histología definitiva

N°	Citología	R-TSH	MUC-1	CD26	Gal-3	Histología
1	Pos Ca papilar	(+)	(+)	(+)	(+)	Carcinoma papilar
2	Pos Ca papilar	(+)	(+)	(+)	(+)	Carcinoma papilar
3	Pos Ca papilar	(+)	(+)	(+)	(+)	Carcinoma papilar
4	Pos Ca papilar	(+)	(+)	(+)	(+)	Carcinoma papilar
5	Pos Ca papilar	(+)	(+)	(+)	(+)	Carcinoma papilar
6	Pos Ca papilar	(+)	(-)	(+)	(+)	Carcinoma papilar
7	Pos Ca papilar	(+)	(-)	(+)	(+)	Carcinoma papilar
8	Pos Ca papilar	(+)	(-)	(-)	(+)	Carcinoma papilar
9	Sosp Neo Pap	(+)	(+)	(+)	(+)	Hiperplasia nodular
10	Sosp Neo Pap	(+)	(-)	(+)	(-)	Hiperplasia nodular
11	Sosp Neo Pap	(+)	(-)	(-)	(+)	Adenoma Hürtle
12	Sosp Neo Fol	(+)	(-)	(+)	(+)	Hiperplasia nodular
13	Sosp Neo Fol	(+)	(-)	(-)	(-)	Hiperplasia nodular
14	Sosp Neo Fol	(+)	(-)	(+)	(+)	Adenoma folicular
15	Sosp Neo Fol	(+)	(-)	(+)	(+)	Adenoma Hürtle
16	No concluyente	(+)	(-)	(+)	(+)	Adenoma folicular
17	No concluyente	(+)	(-)	(-)	(+)	Tiroiditis crónica
18	Neg cels Neo	(+)	(-)	(+)	(+)	Hiperplasia nodular
19	Neg cels Neo	(+)	(-)	(+)	(+)	Hiperplasia nodular
20	Neg cels Neo	(+)	(-)	(-)	(+)	Hiperplasia nodular

R-TSH: Receptor de TSH; Gal-3: Galectina-3; Pos Ca papilar: positiva para carcinoma papilar; Sosp Neo Pap: sospechosa de neoplasia papilar; Sosp Neo Fol: sospechosa neoplasia folicular; Neg cels Neo: negativa para células neoplásicas.

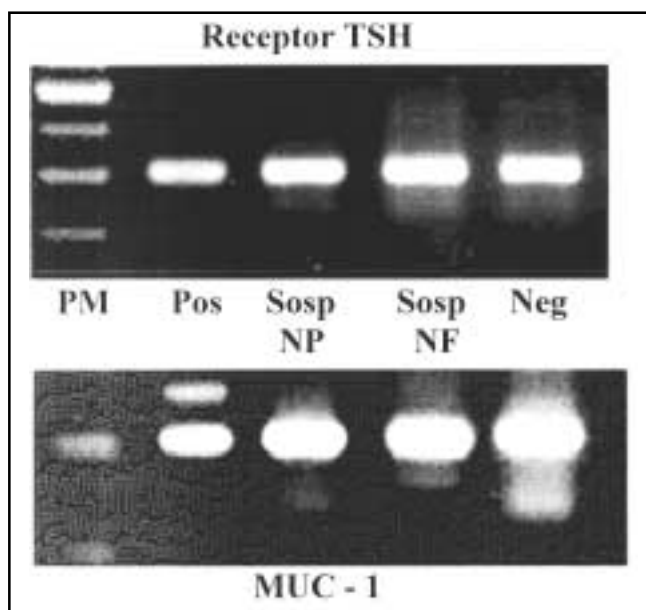
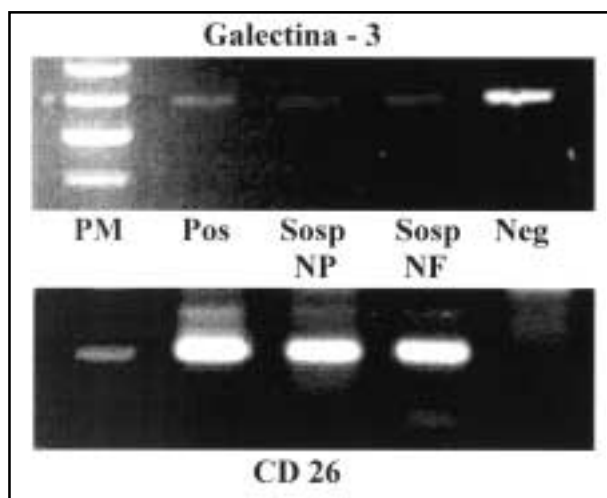


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del receptor de TSH (310 pb) y MUC-1 (normal: 309 pb, tumoral: 336 pb). PM: Marcador de peso molecular. Pos: Muestra positiva para células neoplásicas. Sosp NP: Sospechosa neoplasia papilar. Sosp NF: Sospechosa neoplasia folicular. Neg: Negativa para células neoplásicas.

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de Galectina-3 (590 pb) y CD26 (203 pb). PM: Marcador de peso molecular. Pos: Muestra positiva para células neoplásicas. Sosp NP: Sospechosa neoplasia papilar. Sosp NF: Sospechosa neoplasia folicular. Neg: Negativa para células neoplásicas.



DISCUSIÓN

En el momento actual, el estudio citológico de la PAAF permite hacer un diagnóstico certero en un porcentaje importante de los nódulos tiroideos, pero el hallazgo de citología sospechosa de neoplasia habitualmente obliga a descartarla a través de la resección del nódulo, y eventualmente de la totalidad del tiroides. En nuestra serie, 45% de los casos correspondió a citología sospechosa o no concluyente y fueron sometidos

a tiroidectomías cuyo estudio histológico permitió establecer benignidad en todas ellas. Esto evidencia las limitaciones de la citología y hace necesario optimizar la técnica para evitar tiroidectomías innecesarias. El mayor porcentaje de citologías sospechosas encontradas en nuestro estudio, pudiera deberse al pequeño tamaño de la muestra y a la aplicación de criterios estrictos para el diagnóstico citológico de benignidad³¹. Es de destacar un caso de tiroiditis crónica en una lesión que fue citológicamente no

concluyente; en este caso la citología evidenció moderado pleomorfismo nuclear de las células foliculares, sin estructuras papilares.

El método utilizado para el estudio molecular del remanente de la muestra utilizada para el estudio citológico fue exitoso en poder detectar diferentes mRNA de marcadores de malignidad, pese a lo exiguo del material obtenido, lo que puede permitir en el futuro ampliar esta técnica a otros marcadores de malignidad, sin realizar grandes modificaciones a la PAAF habitual.

CD26 (dipeptidil aminopeptidasa IV) es una glicoproteína de membrana multifuncional cuya expresión ha sido detectada por inmunohistoquímica en neoplasias hematológicas y otros tumores^{32,33} y también en tumores derivados del epitelio folicular tiroideo^{21,34}. La expresión de su mRNA se detectó en 87,5% de los carcinomas papilares, pero también en 66,7% de las neoplasias benignas, lo que no permite diferenciar ambas lesiones.

Galectina-3 es miembro de una familia de proteínas con alta afinidad por beta galactósidos, que estaría involucrada en la regulación de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, y aparecía como un marcador muy promisorio en estudios de nódulos tiroideos por inmunohistoquímica y RT-PCR que consideraban un número muy importante de casos^{35,36}. Sin embargo, comunicaciones más recientes han puesto una nota de cautela en este optimismo inicial^{28,29}.

En nuestro estudio el mRNA de galectina-3 estaba presente en 100% de los carcinomas papilares, pero también en un alto porcentaje de lesiones histológicamente benignas (83,3%). Una explicación a este hallazgo podría encontrarse en la alta sensibilidad de esta técnica para detectar muy bajas concentraciones de mRNA y la posibilidad de amplificación de cDNA de células no tiroideas (eritrocitos y fibroblastos).

MUC-1 es el gen que codifica para mucina 1, una glicoproteína transmembrana de la superficie celular, que es sintetizada por las células epitelia-

les, cuya función sería la protección y lubricación de los tejidos³⁷. La sobreexpresión de este marcador ha sido detectada en tumores epiteliales malignos de diferente origen (mama, cabeza y cuello, páncreas)^{38,39} y en carcinomas tiroideos^{20,40}. En nuestra serie, su mRNA se encontraba presente en un número relevante de carcinomas papilares (62,5%) y ausente en la gran mayoría de los casos benignos (91,7%), lo que podría permitir su uso en forma complementaria a la citología para optimizar el diagnóstico de las lesiones citológicamente sospechosas.

Una de las limitaciones de este estudio es la ausencia de casos de carcinoma folicular de tiroides, lo que dificulta el análisis de los resultados del estudio molecular en este tipo de neoplasias. Este hecho se debe probablemente a la importante disminución de su frecuencia relativa observada en los últimos años, hecho señalado previamente en estudios extranjeros⁴¹. Recientemente se ha descrito un marcador con mayor especificidad para el carcinoma folicular de tiroides, la proteína de fusión PAX8/PPAR γ ⁴², pero también ha sido detectado en lesiones foliculares benignas⁴³.

En suma el presente trabajo muestra, por primera vez en nuestro medio, que en la práctica clínica habitual es posible evaluar la expresión de distintos marcadores tumorales por RT-PCR, como método complementario al diagnóstico citológico del nódulo tiroideo, utilizando el remanente de la muestra obtenida para citología. Si bien nuestro estudio incorporó una casuística limitada, nuestros resultados sugieren que MUC-1 pudiera ser un marcador de utilidad en el diagnóstico diferencial del nódulo tiroideo. Es necesario, sin embargo, aumentar el número de casos a estudiar para resolver esta interrogante y además poder establecer cifras de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para cada uno de los marcadores estudiados o para sus asociaciones, tema al cual nuestro grupo se encuentra actualmente abocado, siendo muy probable que esta técnica pueda constituirse en una alternativa útil en el estudio de los nódulos tiroideos.

REFERENCIAS

1. TUNBRIDGE WM, EVERED DC, HALL R, APPLETON D, BREWIS M, CLARK F ET AL. The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1977; 7: 481-93.
2. VANDER JB, GASTON EA, DAWBER TR. The significance of nontoxic thyroid nodules. Final report of a 15 years study of the incidence of thyroid malignancy. *Ann Intern Med* 1968; 69: 537-40.
3. BRANDER A, VIKINKOSKI P, NICKELS J, KIVISAARI L. Thyroid gland: US screening in a random adult population. *Radiology* 1991; 181: 683-7.
4. EZZAT S, SARTI DA, CAIN DR, BRAUNSTEIN GD. Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med* 1994; 154: 1838-40.
5. RIDGWAY C. Clinical evaluation of solitary thyroid nodules. En: Braverman L and Utiger R, ed. *The Thyroid: a fundamental and clinical text*. Philadelphia: Editorial Lippincott Williams & Wilkins, 2000; 949-56.
6. MAZZAFERRI EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med* 1993; 328: 553-9.
7. BHATTACHARYYA N, FRIED MP. Assessment of the morbidity and complications of total thyroidectomy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128: 389-92.
8. PIRAINO P, IBARRA A, ARROYO A, PUMARINO H, BARSBY F. Punción tiroidea y citología tiroidea; correlación citohistológica en 136 pacientes operados de bocio nodular. *Rev Méd Chile* 1992; 120: 886-92.
9. LA ROSA GL, BELFIORE A, GIUFFRIDA D, SICURELLA C, IPPOLITO O, RUSSO G ET AL. Evaluation of the fine needle aspiration biopsy in the preoperative selection of cold thyroid nodules. *Cancer* 1991; 67: 2137-41.
10. GHARIB H, GOELLNER JR. Fine needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med* 1993; 118: 282-9.
11. GHARIB H, GOELLNER JR, ZINSMEISTER AR, GRANT CS, VAN HEERDEN JA. Fine needle biopsy of the thyroid. The problem of suspicious findings. *Ann Intern Med* 1984; 101: 25-8.
12. SCHLINKERT RT, VAN HEERDEN JA, GOELLNER JR, GHARIB H, SMITH SL, ROSALES RF ET AL. Factors that predict malignant thyroid lesions when fine needle aspiration is "suspicious for follicular neoplasm". *Mayo Clin Proc* 1997; 72: 913-6.
13. TANAKA K, INOUE H, MIKI H, MASUDA E, KITAICHI M, KOMAKI K ET AL. Relationship between prognostic score and thyrotropin receptor (TSH-R) in papillary thyroid carcinoma: immunohistochemical detection of TSH-R. *Br J Cancer* 1997; 76: 594-9.
14. ORLANDI F, SAGGIORATO E, PIVANO G, PULIGHEDDU B, TERMINE A, CAPPIA S ET AL. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 3015-20.
15. TAKANO T, MATSUZUKA F, SUMIZAKI H, KUMA K, AMINO N. Rapid detection of specific messenger RNAs in thyroid carcinomas by reverse transcription-PCR with degenerate primers: specific expression of oncofetal fibronectin messenger RNA in papillary carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 3792-7.
16. WINZER R, SCHMUTZLER C, JAKOBS TC, EBERT R, RENDL J, REINERS C ET AL. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of thyrocyte relevant genes in fine needle aspiration biopsies of the human thyroid. *Thyroid* 1998; 8: 981-7.
17. TAKANO T, MIYAUCHI A, MATSUZUKA F, LIU G, HIGASHIYAMA T, YOKOZAWA T ET AL. Preoperative diagnosis of medullary thyroid carcinoma by RT-PCR using RNA extracted from leftover cells within a needle used for fine needle aspiration biopsy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 951-5.
18. TAKANO T, MIYAUCHI A, MATSUZUKA F, KUMA K, AMINO N. Expression of oncofetal fibronectin messenger ribonucleic acid in fibroblasts in the thyroid: A possible cause of false positive results in molecular based diagnosis of thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 765-8.
19. MASSON D, DENIS MG, LUSTENBERGER P. Limitations of CD44v6 amplification for the detection of tumour cells in the blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2000; 82: 1283-9.
20. WEISS M, BARUCH A, KEYDAR I, WRESCHNER DH. Preoperative diagnosis of thyroid papillary carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction of the MUC 1 gene. *Int J Cancer* 1996; 66: 55-9.
21. TANAKA T, UMEKI K, YAMAMOTO I, SAKAMOTO F, NOGUCHI S, OHTAKI S. CD26 (dipeptidyl peptidase IV/DPP IV) as a novel molecular marker for differentiated thyroid carcinoma. *Int J Cancer* 1995; 64: 326-31.
22. GASBARRI A, MARTEGANI MP, DEL PRETE F, LUCANTE T, NATALI PG, BARTOLAZZI A. Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3494-502.

23. TAKANO T, MIYAUCHI A, YOKOZAWA T, MATSUZUKA F, LIU G, HIGASHIYAMA T ET AL. Accurate and objective preoperative diagnosis of thyroid papillary carcinomas by reverse transcription-PCR detection of oncofetal fibronectin messenger RNA in fine needle aspiration biopsies. *Cancer Res* 1998; 58: 4913-7.
24. 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.
25. 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.
26. LIOU MJ, CHAN EC, LIN JD, LIU FH, CHAO TC. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in FNA samples from thyroid neoplasms. *Cancer Lett* 2003; 191: 223-7.
27. COHEN Y, XING M, MAMBO E, GUO Z, WU G, TRINK B ET AL. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 625-7.
28. MARTINS L, MATSUO SE, EBINA KN, KULCSAR MA, FRIGUGLIETTI CU, KIMURA ET. Galectin-3 messenger ribonucleic acid and protein are expressed in benign thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4806-10.
29. NIEDZIELA M, MACELUCH J, KORMAN E. Galectin-3 is not an universal marker of malignancy in thyroid nodular disease in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4792-6.
30. BELFIORE A, LA ROSA GL. Assessment of thyroid function and disease. Fine needle aspiration biopsy of the thyroid. *Endocrinol Clin North Am* 2001; 30: 361-400.
31. THE PAPANICOLAOU SOCIETY OF CYTOPATHOLOGY TASK FORCE ON STANDARDS OF PRACTICE. Guidelines of the Papanicolaou society of cytopathology for the examination of fine needle aspiration specimens from thyroid nodules. *Mod Pathol* 1996; 9: 710-5.
32. CARBONE A, GLOGHINI A, ZAGONEL V, ALDINUCCI D, GATTEI V, DEGAN M ET AL. The expression of CD26 and CD40 ligand is mutually exclusive in human T-cell non Hodgkin's lymphomas/leukemias. *Blood* 1995; 86: 4617-26.
33. IWATA S, MORIMOTO C. CD26/dipeptyl peptidase IV in context: the different roles of a multifunctional ectoenzyme in malignant transformation. *J Exp Med* 1999; 190: 301-5.
34. ARATAKE Y, UMEKI K, KIYOYAMA K, HINOURA Y, SATO S, OHNO A ET AL. Diagnostic utility of galectin-3 and CD26/DPPIV as preoperative diagnostic markers for thyroid nodules. *Diagn Cytopathol* 2002; 26: 366-72.
35. BARTOLAZZI A, GASBARRI A, PAPOTTI M, BUSSOLATI G, LUCANTE T, KHAN A ET AL. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001; 1644-50.
36. SAGGIORATO E, CAPPIA S, DE GIULI P, MUSSA A, PANCANI G, CARACI P ET AL. Galectin-3 as a presurgical immunocytochemical marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5152-8.
37. GENDLER SJ, LANCASTER CA, TAYLOR-PAPADIMITRIOU J, DUHIG T, PEAT N, BURCHELL J ET AL. Molecular cloning and expression of human tumor associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem* 1990; 265: 15286-93.
38. RUBIN JS, BLOOR BK, HART IR, MORGAN PR. MUC-1 gene expression in head and neck squamous cell carcinomas. *J Laryngol Otol* 2000; 114: 772-6.
39. MONGES GM, MATHOULIN-PORTIER MP, ACRES RB, HOUVENAEGHEL GF, GIOVANNINI MF, SEITZ JF ET AL. Differential MUC 1 expression in normal and neoplastic human pancreatic tissue. An immunohistochemical study of 60 samples. *Am J Clin Pathol* 1999; 112: 635-40.
40. BIECHE I, RUFFET E, ZWEIBAUM A, VILDE F, LIDEREAU R, FRANC B. MUC1 mucin gene, transcripts, and protein in adenomas and papillary carcinomas of the thyroid. *Thyroid* 1999; 7: 725-31.
41. LIND P, LANGSTEGER W, MOLNAR M, GALLOWITSCH HJ, MIKOSCH P, GÓMEZ I. Epidemiology of thyroid diseases in iodine sufficiency. *Thyroid* 1998; 8: 1179-83.
42. NIKIFOROVA MN, BIDDINGER PW, CAUDILL CM, KROLL TG, NIKIFOROV YE. PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors. RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1016-23.
43. CHEUNG L, MESSINA M, GILL A, CLARKSON A, LEAROYD D, DELBRIDGE L ET AL. Detection of the PAX8-PPAR γ fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 354-7.