

Original

Expresión del oncogén *c-erb-B2* en carcinomas tiroideos de origen folicular y parafolicular

H. Galera-Davidson, R. González-Cámpora, M.V. San Martín-Díez, I. Martín-Lacave, P. Panea-Flores, J. Fernández-Sanz, J.C. Utrilla-Alcolea, M.A. Novales-Huerta, M.C. Fernández-Novoa, F. Rivera-Hueto, I. Ortega-Medina, J.R. Armas-Padrón, M. de Miguel-Rodríguez, J.M. Fernández-Santos y O.E. Argueta-Manzano

Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla;
Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla.

SUMMARY

c-erb-B2 oncogene expression is a potential marker of aggressiveness for different tumors, but the role of this oncoprotein in the development and progression of thyroid tumors is unknown. Material and methods: We studied 67 thyroid tumors (10 follicular adenomas, 11 follicular carcinomas, 3 anaplastic carcinomas, 25 papillary carcinomas, 18 medullary carcinomas) and 16 metastasis by polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry, using paraffin-embedded material and polyclonal antibodies against the intracytoplasmic portion of the c-erb-B2 oncoprotein. Results: Important differences have been found in the immunoreactive pattern for c-erb-B2 depending on the type of thyroid tumor. No oncoprotein expression was found in any of the follicular adenomas, follicular carcinomas and anaplastic carcinomas. However, 52% of papillary carcinomas (membranous and diffuse cytoplasmic immunostaining pattern) and all medullary carcinomas (granular cytoplasmic immunostaining pattern) were positive. Conclusions: We suggest that c-erb-B2 oncogene may play a role in the progression of the cancer in papillary and medullary thyroid carcinomas, but its role as a putative prognostic factor needs additional studies. Rev Esp Patol 1998; 31(4): 373-379.

Key words: c-erb-B2 - Thyroid - Carcinoma - Immunohistochemistry

RESUMEN

La expresión del oncogén c-erb-B2 es un marcador potencial de agresividad en distintos tumores, pero se desconoce el papel desempeñado por esta oncoproteína en el desarrollo y progresión de los tumores tiroideos. Material y métodos: Hemos estudiado 67 tumores tiroideos (10 adenomas foliculares, 11 carcinomas foliculares, 25 carcinomas papilares, 18 carcinomas medulares, 3 carcinomas anaplásicos) y 16 metástasis mediante PCR e inmunohistoquímica, usando un método de recuperación de antígenos para material incluido en parafina y el anticuerpo policlonal producido contra el dominio intracitoplásmico de la oncoproteína c-erb-B2. Resultados: Se han hallado diferencias notables en el patrón de inmunorreactividad para c-erb-B2 dependiendo del tipo de tumor tiroideo. Hubo ausencia de expresión de la oncoproteína en los adenomas foliculares, los carcinomas foliculares y los carcinomas anaplásicos. En cambio, el 52% de los carcinomas papilares (patrones de inmunotinción membranoso y citoplásmico difuso) y el total de los carcinomas medulares (patrón de inmunotinción citoplásmico granular) fueron inmunopositivos. Conclusiones: Sugerimos que el oncogén c-erb-B2 puede tener algún papel en la progresión de los carcinomas papilares y medulares de tiroides, pero su consideración como posible factor pronóstico merece posteriores estudios. Rev Esp Patol 1998; 31(4): 373-379.

Palabras clave: c-erb-B2 - Tiroides - Carcinoma - Inmunohistoquímica

INTRODUCCIÓN

El protooncogén *c-erb-B2* (también llamado HER-2 o *neu*) codifica una glicoproteína de 185 kd (p185) con actividad tirosincinasa (1). Esta proteína está estrechamente relacionada, aunque es diferente, a la del receptor del factor de crecimiento epidérmico, y posee dominios externo e interno (2). Se ha demostrado sobreexpresión de la oncoproteína, normalmente asociada a amplificación génica, en un amplio rango de adenocarcinomas humanos con origen en diferentes órganos (mama, ovario, estómago, colon, pulmón y páncreas) (3-8). En cuanto a los carcinomas de mama y ovario, se ha detectado correlación entre la amplificación del oncogén *c-erb-B2* y un pronóstico desfavorable de la enfermedad (4, 7, 8).

El papel del oncogén *c-erb-B2* y otros oncogenes en el desarrollo y mantenimiento de los tumores tiroideos aún es tema de controversia. Se ha demostrado que la expresión del RNAm de los oncogenes *c-erb-B2* y *c-erb-B* es mayor en los carcinomas papilares de tiroides que en cualquier otra lesión tiroidea, pero los niveles detectados son inferiores a los que se asocian con amplificación génica (9). De hecho, mediante análisis de *Southern* no se han detectado amplificación ni reordenamientos del oncogén *c-erb-B2* en amplias series de tumores tiroideos, tanto benignos como malignos, incluyendo numerosos carcinomas papilares (10-12). Sin embargo, mediante inmunohistoquímica se ha detectado la presencia de la oncoproteína *c-erb-B2* siguiendo un patrón membranoso en el 50% de los carcinomas papilares, usando muestras congeladas (12), pero no en material incluido en parafina (10). En cuanto a la presencia del producto del gen *c-erb-B2* en el resto de las neoplasias tiroideas (adenomas foliculares, carcinomas foliculares, carcinomas anaplásicos y carcinomas medulares) no se ha hallado positividad ni en material congelado (12) ni incluido en parafina (10, 13, 14). Solamente Soares y cols. (11) describieron inmunotinción para *c-erb-B2*, usando material incluido en parafina, en 29 de 34 lesiones neoplásicas de tiroides, así como en los tiroides normales adyacentes al tumor, pero nunca se observó un patrón de inmunotinción de membrana.

Estos hallazgos contradictorios nos llevaron a estudiar la existencia de sobreexpresión del oncogén *c-erb-B2* en una amplia serie retrospectiva de diferentes tumores tiroideos, tanto de origen folicular como parafolicular, usando un método de recuperación del antígeno antes de

aplicar la técnica inmunohistoquímica, así como controles específicos de absorción con el péptido usado como inmunógeno. Nuestros datos demuestran que el oncogén *c-erb-B2* se expresa en el 52% de los carcinomas papilares de tiroides (patrones citoplásmico difuso y de membrana), así como en la totalidad de los carcinomas medulares (exclusivamente patrón citoplásmico granular), pero no en los adenomas foliculares, carcinomas foliculares ni carcinomas anaplásicos.

Asimismo, nos propusimos analizar la fiabilidad del estudio de amplificación del *c-erb-B2/neu* por PCR realizadas a partir de DNA obtenido de muestras incluidas en parafina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron muestras de piezas quirúrgicas de 67 pacientes, sujetos a tiroidectomía parcial o total, entre los años 1990 y 1994 en el Hospital Virgen Macarena de Sevilla. El diagnóstico histopatológico fue realizado en el Departamento de Anatomía Patológica del mismo Hospital, y las lesiones incluidas en este estudio se relacionan en la Tabla 1. En 16 pacientes fue posible estudiar, además del tumor primario, la metástasis ganglionar. Además, en varias muestras también se estudió el tejido no tumoral adyacente al tumor. Todas las muestras se fijaron en formalina y se incluyeron en parafina siguiendo la rutina del laboratorio.

La oncoproteína *c-erb-B2* se demostró mediante un método inmunoperoxidásico en tres fases (estreptavidina-biotina-peroxidasa) y aplicando un antisuero policlonal creado contra un péptido sintético procedente de la

Tabla 1. Diagnósticos histopatológicos de los pacientes incluidos en el estudio inmunohistoquímico para *c-erb-B2*.

Diagnóstico histopatológico	Nº de pacientes
Adenoma folicular	10
Carcinoma folicular	11
Carcinoma anaplásico	3
Carcinoma papilar (n=25)	
Tumor primario	25
Metástasis	12
Carcinoma medular (n=18)	
Tumor primario	18
Metástasis	4

porción terminal del dominio interno de la proteína humana (A-485, Dako, Dinamarca). Se cortaron secciones de 5 µm que se recogieron en portaobjetos silanizados (Sigma, EE.UU.), los cuales se secaron durante 1 hora en estufa de 60 °C para facilitar la adhesión de los cortes. Seguidamente, éstos se desparafinaron e hidrataron y se sometieron a un método de recuperación de antígenos antes de realizar la técnica inmunohistoquímica (15). Los portas se transfirieron a un Coplin lleno de tampón citrato 0,1 M, pH 6, que se cubrió para reducir la evaporación al mínimo. Se colocaron 4 Coplin, de forma regular, en un microondas doméstico (Toshiba, ER 68608W) y se irradió 4 minutos a una potencia de 750 W (este ciclo se repitió hasta tres veces). Seguidamente, se dejaron los cortes a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de un corto lavado en PBS (tampón fosfato 0,01 M salino, pH 7,2), se trataron las secciones con peróxido de hidrógeno al 3% para la inhibición de la actividad peroxidásica endógena, se lavaron en PBS y se incubaron secuencialmente con suero no inmunológico (Operón) diluido a 1:10 en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, antisuero policlonal específico a dilución 1:100 (18-24 horas a 4 °C), antisuero biotinado contra inmunoglobulinas de conejo/ratón (Dako, LSAB 2, EE.UU.) durante 30 minutos, y el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (Dako LSAB 2, EE.UU.) durante 30 minutos. Tras cada incubación se procedió a lavar con PBS (tres cambios de 3 minutos cada uno). La actividad peroxidásica se reveló con diaminobencidina tetrahidroclorhídrica (Sigma, EE.UU.). Seguidamente, las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron, se aclararon en xilol y se montaron en resina. Como control positivo se utilizaron secciones de cáncer de mama en cada una de las tandas de tinción. Como controles de especificidad se sustituyó el suero específico por suero no inmunológico o se preincubó el antisuero específico con el péptido usado como inmunógeno (cortesía de Dako, Dinamarca) a temperatura ambiente durante 2 horas.

Se realizaron estimaciones semicuantitativas en cuanto a intensidad (I) de inmunotinción para *c-erb-B2*, que se evaluó de 1 a 4, y el porcentaje de células positivas (P). El *histocore* (HS) se calculó como sigue: $HS = \Sigma(P \times I) / 4$ (rango 0-100). Las secciones teñidas fueron evaluadas por dos observadores independientemente, que calcularon el correspondiente HS. Las diferencias entre ambos fueron resueltas por consenso. Se con-

sideró positiva tanto la inmunotinción con patrón membranoso como con patrón citoplásmico.

Para la realización de la PCR se extrajo el DNA del mismo material incluido en parafina. Para ello se utilizaron dos secciones de tejido de 5 µ de grosor en cada caso, las cuales fueron introducidas en un tubo Eppendorf y conservadas a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µl de Chelex-100 al 5% y se mantuvieron 10 minutos a 100 °C, transfiriéndose a hielo después para su rápido enfriamiento. Los tubos fueron centrifugados durante 1 minuto a 7000 rpm, y una vez recogido el sobrenadante se determinaron las concentraciones de DNA y las proteínas por espectrofotometría con el Pack Program Shimadzu, Japón.

La determinación de la amplificación del *c-erb-B2/neu* se realizó mediante la PCR simultánea de un fragmento del protooncogén y de un gen referencia, programándose 35 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 92 °C), alineación (30 segundos a 50 °C) y extensión (60 segundos a 72 °C). Los productos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa (2% NuSieve/1% Seakem GTG) y cuantificados por el Analysis System CDS-5000.

RESULTADOS

La aplicación del anticuerpo ante la oncoproteína *c-erb-B2* (Dako, A-485), a diferentes muestras de tumores tiroideos, reveló una inmunotinción específica y reproducible localizada tanto en la membrana celular (patrón membranoso) como en el citoplasma (patrón citoplásmico), y confinada exclusivamente en las células tumorales. Ambas inmunotinciones fueron bloqueadas de forma específica tras la absorción con el péptido usado como inmunógeno.

No se observó inmunotinción específica para *c-erb-B2* en ningún adenoma folicular, carcinoma folicular o carcinoma anaplásico, así como tampoco en el tejido normal adyacente al tumor.

En cuanto a los carcinomas papilares de tiroides, 13/25 mostraron inmunorreactividad específica para *c-erb-B2* ya sea siguiendo un patrón de tinción membranoso, citoplásmico o ambos (Tabla 2). La inmunotinción de la membrana celular fue discreta y más bien heterogénea dentro de la masa tumoral en los casos positivos (Figs. 1a y b). Sin embargo, la inmunotinción cito-

Tabla 2. Expresión de la oncoproteína *c-erb-B2* en tumores tiroideos mediante inmunohistoquímica.

Diagnóstico	Nº de casos	Patrón de inmunotinción			
		Negativo	Citoplásmico	Membranoso	Ambos
Carcinoma papilar de tiroides (n=25)					
Primario	25	12	12	9	8
Metástasis	12	5	7	6	6
Carcinoma medular de tiroides (n=18)					
Primario	18	0	18	0	0
Metástasis	4	0	4	0	0

plásmica siguió un patrón difuso con escasa intensidad y una distribución homogénea dentro del tumor.

También se analizaron 12 metástasis de pacientes con carcinomas papilares de tiroides (Tabla 3). Casi todas las metástasis inmunopositivas presentaron ambos patrones de inmunotinción, al igual que las lesiones primarias (excepto un caso en que predominó el patrón citoplásmico difuso), mientras que la lesión primaria fue negativa. En otros 2 casos con metástasis positivas, los tumores primarios fueron positivos con un solo patrón de inmunotinción (en un caso citoplásmico y en otro membranoso). Finalmente, hubo un carcinoma papilar cuya lesión primaria mostró un patrón citoplásmico difuso y la metástasis fue negativa. No se halló correlación entre la expresión de *c-erb-B2* y el estado de las metástasis en los ganglios linfáticos.

En cuanto a los carcinomas medulares de tiroides, todos los tumores primarios mostraron positividad para *c-erb-B2* (Tabla 2). De éstos, en 4 casos también se pudo estudiar sus metástasis en ganglio linfático, que fueron igualmente positivas (Tabla 3). Todas las muestras exhibieron exclusivamente un patrón de inmunotinción citoplásmico granular (Figs. 2 y 3). En la mayoría de los tumores la tinción intracitoplásmica fue intensa y homogénea, pero mostró una distribución heterogénea dentro de la masa tumoral. Sin embargo, en 3 casos la inmunorreactividad se localizó preferentemente en la periferia de las células tumorales. Hubo una concordancia absoluta entre el patrón de inmunotinción hallado en las lesiones primarias y el existente en las metástasis (Tabla 3).

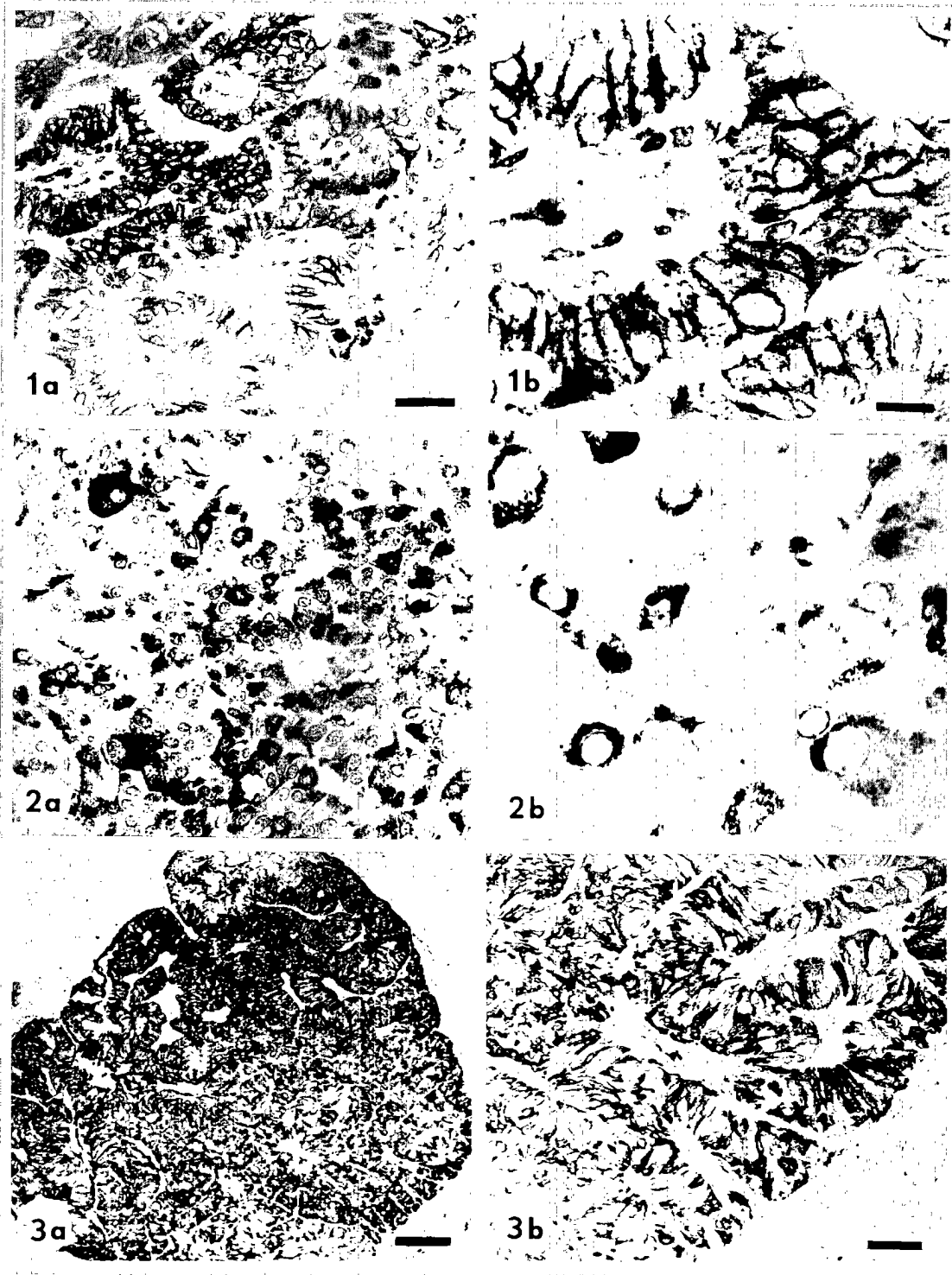
Los resultados de la amplificación del *c-erb-B2*/neu por PCR mostraron 1 caso positivo entre los 10 adenomas foliculares, 1 de los 11 carcinomas foliculares, 3 de los 25 carcinomas papilares, 2 de los 18 carcinomas

medulares, ninguno entre los 3 carcinomas anaplásicos y, finalmente, 2 en las 16 metástasis.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos investigado mediante inmunohistoquímica la expresión del oncogén *c-erb-B2* en muestras de parafina procedentes de 67 pacientes con diferentes tumores tiroideos y usando un anticuerpo policlonal dirigido contra la parte terminal del dominio intracitoplásmico de la oncoproteína humana. Nuestros datos muestran marcadas diferencias en el patrón de inmunotinción para *c-erb-B2* dependiendo del tipo de tumor analizado. Así, no hemos detectado positividad en ninguno de los adenomas foliculares, carcinomas foliculares y carcinomas anaplásicos estudiados. No obstante, el 52% de los carcinomas papilares (patrones membranoso y citoplásmico difuso) y la totalidad de los carcinomas medulares (patrón citoplásmico granular) mostraron inmunorreactividad.

Haugen y cols. (12) describieron que la expresión de *c-erb-B2* es una característica de los carcinomas papilares, en contraste con los restantes tumores de origen folicular y del tejido tiroideo no neoplásico. Dichos autores detectaron positividad en 12/17 casos usando un anticuerpo policlonal ante p185 y muestras congeladas. Lemoine y cols. (10) fueron incapaces de detectar sobreexpresión de *c-erb-B2* en 24 carcinomas papilares incluidos en parafina, aunque estos autores no usaron ningún método de recuperación de antígenos, como hemos hecho nosotros, y los anticuerpos que ellos emplearon eran monoclonales. Por el contrario, Soares y cols. (11) describieron inmunopositividad para *c-erb-B2* en todos



Figuras 1-3. 1 a y b. Demostración inmunohistoquímica de la proteína *c-erb-B2* en un carcinoma papilar de tiroides incluido en parafina. Adviértase la presencia de patrones de inmunotinción tanto citoplásmico difuso como membranoso. Todas las células tumorales contienen material inmunorreactivo, pero hay heterogeneidad en cuanto a la cantidad de producto detectado. a) Original, $\times 400$; barra: 25 μm . b) Original, $\times 1000$; barra: 10 μm . **2 a y b)** Demostración inmunohistoquímica de *c-erb-B2* en un carcinoma medular de tiroides incluido en parafina. Las células neoplásicas muestran una positividad con patrón citoplásmico granular. a) Original, $\times 400$. b) Original, $\times 1000$. **3 a y b)** Demostración inmunohistoquímica de *c-erb-B2* en una metástasis de carcinoma medular de tiroides en ganglio linfático incluida en parafina. Las células tumorales muestran una positividad citoplásmica granular, que en algunas de ellas se acumula preferentemente en la periferia. a) barra: 250 μm . b) Original, $\times 200$; barra 50 μm .

Tabla 3. Comparación de inmunopositividades entre los tumores primarios y sus metástasis.

Primario	Carcinoma papilar		Carcinoma medular	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Metástasis				
Positiva	6	1	4	0
Negativa	3	2	0	0

los tipos de lesiones tiroideas, así como en tiroides normal, con un patrón citoplásmico difuso, a pesar de tratarse de muestras incluidas en parafina y no emplear ningún método de recuperación de antígenos. La discrepancia entre el empleo de material congelado y material incluido en parafina ha sido resaltada por Slamon y cols. (4) en el cáncer de mama, ya que prácticamente en todos los tumores que analizaron hallaron una disminución de la inmunorreactividad tras la fijación y el procesado en parafina. Según nuestros resultados, podemos afirmar que la pérdida de antigenicidad en las secciones de parafina puede superarse aplicando un método adecuado de recuperación de antígenos.

En nuestra serie, todos los carcinomas medulares de tiroides han mostrado inmunopositividad para *c-erb-B2*. Roncalli y cols. (13), sin embargo, no hallaron ningún carcinoma medular positivo en una serie de 28 casos, usando secciones de parafina y un anticuerpo policlonal, pero comentan que la fijación pudiera haber afectado adversamente la inmunorreactividad. Además, no emplearon un tratamiento previo para recuperación de antígenos. En cuanto al patrón de inmunotinción, en nuestra serie todos los casos mostraron un patrón granular citoplásmico. Este mismo patrón ha sido descrito anteriormente en diferentes tumores endocrinos, tales como insulinomas y feocromocitomas, en varios tejidos normales adultos, incluyendo las células C del tiroides humano (16, 17), e incluso en algunos carcinomas de mama, usando anticuerpos dirigidos contra diferentes epitopos, ya sean del dominio interno o externo de la oncoproteína, hallándose una buena correlación entre la amplificación génica para *c-erb-B2* y el grado de inmunorreactividad (18).

De Potter y cols. (17) informaron de la existencia de inmunorreactividad para una proteína de 155 kd que podría representar un producto del procesamiento alternativo del oncogén *c-erb-B2* con un destino diferente en la célula, o, de acuerdo con Akijama y cols. (1), una for-

ma parcialmente glicosilada de la proteína, ya que se ha comprobado que la inhibición de la N-glucosilación mediante tunimicina produce una proteína inmunoprecipitable de 155-160 kd en células humanas que expresan *c-erb-B2*. Más recientemente, Coombs y cols. (19) detectaron en tumores de vejiga que la mayoría de inmunopositividad para *c-erb-B2* se localizó en el citoplasma, siendo particularmente pronunciada en aquellos tumores que tenían un alto número de copias génicas y que mostraban una alta expresión. Así mismo, se ha comprobado que en los carcinomas de colon la oncoproteína *c-erb-B2* aparece principalmente en el citoplasma y se correlaciona bien con la amplificación génica (5). Soares y cols. (11) describieron un patrón de inmunotinción citoplásmica en diversos tumores tiroideos, identificando una banda proteica de 130-140 kd mediante análisis de *Western*. Con la microscopía electrónica se ha comprobado la presencia de inmunorreactividad para *c-erb-B2* en elementos citoplásmicos, tales como el retículo citoplásmico, en distintas células neoplásicas, lo cual podría representar el tránsito de la proteína recién sintetizada (19). Todos estos estudios sugieren que el producto citoplásmico descrito en el presente trabajo representa una forma de la oncoproteína *c-erb-B2*, por lo que consideramos que sería muy interesante examinar estas dos formas proteicas (p185, p155), así como su localización celular, de forma más detallada en los tumores tiroideos.

La detección mediante inmunohistoquímica de la sobreexpresión de *c-erb-B2* en el 52% de los carcinomas papilares de tiroides y en la totalidad de los carcinomas medulares sugiere que la oncoproteína *c-erb-B2* posiblemente podría estar envuelta en las respuestas proliferativas así como en la diferenciación de las células tanto foliculares como parafoliculares. No obstante, no se han detectado reorganizaciones ni amplificaciones génicas para *c-erb-B2* en tumores tiroideos (10, 11, 20). Por ello, la desregulación del oncogén *c-erb-B2* en los tumores tiroideos podría deberse a mecanismos moleculares distintos a alteraciones genéticas. También se ha comprobado que se produce sobreexpresión de dicho oncogén en tumores de mama con una única copia génica (4). Recientemente en carcinomas papilares se ha observado sobreexpresión de las proteínas *c-erb-B3* y *c-erb-B4*. Como en el caso del gen *c-erb-B2*, tampoco se detectó amplificación de dichos genes (20). En los carcinomas papilares de tiroides también se ha descrito

la existencia de otros oncogenes con actividad tirosinasa, tales como el *ret/PTC* y *trk*, en este caso activados mediante reorganización génica (21-251). El oncogén *ras* ha sido detectado en fases tempranas de inducción de tumores a partir de las células foliculares, además de estar relacionado con otros tipos de tumores tiroideos (10, 24). Sin embargo, aún queda mucho por dilucidar en cuanto al comportamiento de diversos oncogenes en la génesis de los diferentes tipos de tumores epiteliales del tiroides.

Finalmente, dado que los resultados obtenidos en el análisis de la amplificación del gen *c-erb-B2/neu* por PCR en las distintas afecciones fueron similares, analizamos el DNA total en los casos negativos, pudiendo comprobar que en la mayor parte se encontraba degenerado. Probablemente ello se debe a los daños sufridos durante el procesamiento de fijación e inclusión de las muestras en parafina, por lo que realmente no se podía afirmar si existía amplificación del gen o no. Ello nos lleva a dudar de la fiabilidad de los resultados obtenidos en muestras conservadas en parafina ya que éste no parece ser el mejor método para mantener el DNA estable.

BIBLIOGRAFÍA

- Akiyama T, Sudo C, Ogawara H y cols. *The product of the human c-erbB-2: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity.* Science 1986; 232: 1644-1646.
- Dougall WC, Qian X, Peterson NC y cols. *The neu-oncogene: Signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies.* Oncogene 1994; 9: 2109-2123.
- Yokota J, Yamamoto T, Toyoshima K y cols. *Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo.* Lancet 1986; i: 765.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA y cols. *Studies of the c-erbB-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer.* Science 1989; 244: 707-712.
- D'Emilia J, Bulovas K, D'Ercole K y cols. *Expression of the c-erbB-2 gene product (p185) at different stages of neoplastic progression in the colon.* Oncogene 1989; 4: 1233-1239.
- Hall PA, Hughes CM, Staddon SL y cols. *The c-erbB-2 proto-oncogene in pancreatic cancer.* J Pathol 1990; 161: 195-200.
- Zoll B, Kynast B, Corell B y cols. *Alterations of the c-erbB-2 gene in human breast cancer.* J Cancer Res Clin Oncol 1992; 118: 468-473.
- Sirvent JJ, Santafé M, Salvadó MT y cols. *Hormonal receptors, cell proliferation fraction (ki-67) and c-erbB-2 amplification in breast cancer: Relationship between differentiation degree and axillary lymph node metastasis.* Histol Histopathol 1994; 9: 563-570.
- Aasland R, Lillehaug JR, Male R y cols. *Expression of oncogenes in thyroid tumours: Coexpression of c-erbB-2/neu and c-erbB.* Br J Cancer 1988; 57: 358-363.
- Lemoine NK, Wyllie FS, Lillehaug JR y cols. *Absence of abnormalities of the c-erbB-1 and c-erbB-2 proto-oncogenes in human thyroid neoplasia.* Eur J Cancer 1990; 26: 777-779.
- Soares P, Sambade C, Sobrinho-Simoes MA. *Expression of c-erbB-2 in tumours and tumour-like lesions of the thyroid.* Int J Cancer 1994; 56: 459-461.
- Haugen DRF, Akslen LA, Varhaug JE y cols. *Expression of c-erbB-2 protein in papillary thyroid carcinomas.* Br J Cancer 1992; 65: 832-837.
- Roncagli M, Springall DR, Varndell IM y cols. *Oncoprotein immunoreactivity in human endocrine tumours.* J Pathol 1991; 163: 117-127.
- Auguste LJ, Masood S, Westerband A y cols. *Oncoprotein expression in follicular neoplasms of the thyroid.* Am J Surg 1992; 164: 592-593.
- Shi SR, Key ME, Kaira KI. *Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections.* J Histochem Cytochem 1991; 39: 741-748.
- Castilla-Guerra L, Moreno AM, Fernández-Moreno MC y cols. *Expression and prognostic value of c-erbB-2 oncogene product in human pheochromocytomas.* Histopathology 1997; 31: 144-149.
- De Potter CR, Van Daele S, Van de Vijver MJ y cols. *The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues.* Histopathology 1989; 15: 351-362.
- Gusterson BA, Gullick WJ, Venter DJ y cols. *Immunohistochemical localization of c-erbB-2 in human breast carcinomas.* Mol Cell 1988; 2: 383-391.
- Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E y cols. *Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder.* Br J Cancer 1991; 63: 601-608.
- Mori S, Akijama T, Morishita Y y cols. *Light and electron microscopical demonstration of c-erbB-2 gene product-like immunoreactivity in human malignant tumours.* Virchows Arch B 1987; 54: 8-15.
- Haugen DRF, Akslen LA, Varhaug JE y cols. *Expression of c-erbB-3 and c-erbB-4 proteins in papillary thyroid carcinomas.* Cancer Res 1996; 56: 1184-1188.
- Fusco A, Grieco M, Santoro M y cols. *A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases.* Nature 1987; 328: 170-172.
- Bongarzone I, Pierotti MA, Monzini N y cols. *High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma.* Oncogene 1989; 4: 1457-1462.
- Suárez HG, Du Villard JA, Caillou B y cols. *Detection of activated ras oncogenes in human thyroid carcinomas.* Oncogene 1988; 2: 403-406.
- Basolo F, Pinchera A, Fugazzola L y cols. *Expression of p21 ras protein as a prognostic factor in papillary thyroid carcinomas.* Eur J Cancer 1994; 30A: 171-174.

