

Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y de su receptor KDR en carcinomas papilares de tiroides con invasión extracapsular

Rogelio González González,* Ronell Bologna Molina,**,*** Adalberto Mosqueda Taylor,** Nelly Molina Frechero,** J Rodrigo Muñoz Gutiérrez,* Eduardo Farfán Morales,** Hugo Domínguez Malagon*

RESUMEN

Antecedentes: la angiogénesis es importante para el crecimiento y desarrollo tumoral, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el que tiene mayor participación en la neoformación vascular. Su incremento en la expresión se asocia con progresión tumoral y mal pronóstico en diversos tipos de tumores malignos.

Objetivo: evaluar la expresión de VEGF-A y su receptor KDR (VEGFR-2/Flk-1) en carcinomas papilares de tiroides mayores y menores a 10 mm, con y sin extensión extracapsular.

Pacientes y métodos: la expresión de VEGF-A y KDR se estudió por inmunohistoquímica, con la técnica de microarreglos tisulares, en 62 pacientes con carcinoma papilar con y sin extensión extratiroidea, mayores y menores a 10 mm. La positividad del VEGF-A y KDR fue predominantemente citoplasmática, la intensidad se evaluó en (-), (+) y (++)

Resultados: la expresión del VEGF-A fue similar en carcinomas con y sin extensión extratiroidea; no se encontró significancia estadística entre éstos y el tamaño tumoral, pero se observó mayor intensidad en el carcinoma con extensión tisular mayor de 10 mm. En KDR la expresión ocurrió con mayor frecuencia en los carcinomas sin extensión extratiroidea menores de 10 mm, aunque la intensidad fue semejante en ambos grupos y también con respecto al tamaño tumoral.

Conclusiones: la intensidad del VEGF-A en la expresión de las células tumorales fue mayor en pacientes con carcinoma papilar con extensión extratiroidea mayor de 10 mm, mientras que la intensidad de expresión en KDR fue semejante entre ambos grupos. Estos hallazgos suponen que la sobreexpresión del VEGF-A, pero no la de KDR, se relaciona con invasión extracapsular y, por tanto, con un posible mal pronóstico.

Palabras clave: VEGF, KDR, VEGFR-2, carcinoma papilar de tiroides, inmunohistoquímica.

ABSTRACT

Abstract: Angiogenesis is an important event for the tumoral growth and progression. The vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most important factor in the vascular neoformation, and the increase on its expression is associated with tumoral progression and worse prognosis in many different malignant tumors.

Objective: To evaluate the expression of VEGF-A and its receptor KDR/VEGF-2 in papillary thyroid carcinoma (CPT) larger and smaller than 10mm, with and without extracapsular extension (CPT-E and CPT-NE).

Methods: The expression of VEGF-A and KDR was studied with tissular microarray (TMA) in 62 cases of CPT-E and CPT-NE larger and smaller than 10mm. The positivity of VEGF-A and KDR was predominantly cytoplasmatic, and it was evaluated in (-), (+), and (++)

Results: The expression of VEGF-A was very similar in CPT-E and CPT-NE with no statistical significance between tumoral size and between CPT-E and CPT-NE, but the expression intensity was harder for CPT-E >10mm, while the expression of KDR was more frequently observed in CPT-NE ≤10mm, the intensity was similar for both groups and sizes.

Conclusion: The results obtained correlate with the results published before, nevertheless, there are no publicated studies related with extracapsular extension and correlating VEGF-A and KDR. The intensity of the expression of VEGF-A was harder in CPT-E >10mm, while the expression intensity of KDR was similar between both groups concluding that the overexpression of VEGF-A, not the same for KDR, may be related to the extracapsular invasion, and because of that represents a worse prognosis.

Key words: VEGF, KDR, VEGFR-2, papillary thyroid carcinoma, immunohistochemistry.

* Departamento de Patología Quirúrgica, Instituto Nacional de Cancerología, México.

** Universidad de Guadalajara, México.

*** Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México.

**** Laboratorio de Patología Molecular, Instituto Nacional de Pediatría, México

Correspondencia: Dr. Rogelio González González. Instituto Nacional de Cancerología. Av. San Fernando 22, colonia Sección XVI, CP

14080, México, DF. Correo electrónico: rogegg26@yahoo.com
Recibido: mayo, 2009. Aceptado, mayo, 2009.

Este artículo debe citarse como: González-González R, Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N y col. Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y de su receptor KDR en carcinomas papilares de tiroides con invasión extracapsular. Patología Rev Latinoam 2009;47(3):204-9.

La versión completa (y a color) de este artículo también está disponible en: www.nietoeditores.com.mx

El carcinoma papilar de tiroides es la neoplasia más frecuente de dicha glándula; afecta comúnmente a las mujeres, se clasifica entre los carcinomas bien diferenciados y, aunque con frecuencia evoluciona a metástasis ganglionares, se considera una neoplasia de bajo grado; la mayor parte de las veces tiene curso indolente. El carcinoma papilar de tiroides tiene características clinicopatológicas que pueden modificar el curso de la enfermedad.¹ Por ejemplo, el carcinoma papilar sin extensión extratiroidea, en conjunto con otras características, como: pacientes menores de 45 años de edad, tamaño tumoral ≤ 3 cm y variantes histológicas encapsulada, folicular, oncocítica, entre otras, son factores que favorecen un buen pronóstico.^{1,2} Sin embargo, el carcinoma papilar con invasión extracapsular suele relacionarse con altas recurrencias, y se asocia con otros factores de mal pronóstico, como: edad mayor de 45 años, género masculino, tamaño mayor de 4 cm y metástasis a distancia.^{1,2} Además, debe considerarse que la invasión vascular y linfática, angiogénesis, proliferación celular, desprendimiento de células neoplásicas y variedades histológicas columnares de células altas y esclerosante difusa son características de mal pronóstico, asociadas con progresión de la enfermedad, recurrencias e incluso la muerte.^{3,4}

En la proliferación celular, la angiogénesis, el tamaño tumoral, la extensión extratiroidea y el desprendimiento de células neoplásicas participan diversas moléculas de adhesión y factores de crecimiento. Algunos de éstos pueden estimular la angiogénesis y estar estrechamente relacionados con la implantación, el crecimiento y el desarrollo tumoral. Esta característica se debe a que las células tumorales secretan diversos tipos de factores de crecimiento que participan en la angiogénesis (β -FGF, PDGF, EGF, TNF, VEGF, angiogenina, entre otros), necesarios para el desarrollo y crecimiento tumoral.⁵⁻⁸

Entre los diversos factores de crecimiento, el endotelial vascular (VEGF) tiene mayor participación en la angiogénesis, debido a su alta especificidad para células endoteliales, actúa como estimulante de la angiogénesis, estimula la regeneración endotelial, la formación de vasos sanguíneos, incrementa la permeabilidad vascular, induce la producción de proteínas antiapoptóticas y participa en la degradación de la matriz extracelular.⁹⁻¹¹ La respuesta del VEGF es mediada por receptores tirosina-cinasa, principalmente KDR (por sus siglas en inglés: *kinase*

insert domain receptor) y Flt-1 (*fms-related tyrosine kinase 1*), que funcionan como reguladores en su expresión. El receptor KDR participa como mediador en la mitogénesis, en la supervivencia de células endoteliales, permeabilidad microvascular, angiogénesis y ensamblaje de canales vasculares,¹²⁻¹⁵ mientras que el receptor Flt-1 funciona como regulador negativo para la retención del VEGF, previniendo la interacción con el KDR e induciendo cambios en la morfología de las células endoteliales y hematopoyéticas.⁹⁻¹⁵

El factor de crecimiento endotelial vascular es fundamental para la organogénesis de la glándula tiroides: es secretado por células foliculares, probablemente en respuesta a la hormona estimulante de la tiroides y tiene expresión mínima en el tejido tiroideo sano; sin embargo, en pacientes con carcinomas de tiroides, el VEGF se ve sobreexpresado, quizá por alguna inducción debido a hipoxia, deficiencia de p53, mutaciones de los oncogenes RAS y BRAF, y a estímulos autocrinos y paracrinos de células tumorales.¹⁶

El objetivo de este estudio es determinar la expresión inmunohistoquímica del factor de crecimiento endotelial vascular y el receptor KDR (VEGFR-2/Flk-1) mediante microarreglos tisulares en pacientes con carcinoma papilar de tiroides, con y sin invasión extracapsular, para identificarlos como posibles mediadores en la invasión extracapsular y evolución tumoral.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudiaron 62 casos de carcinoma papilar de tiroides, tratados en el Instituto Nacional de Cancerología entre los años 2000 y 2005. Se evaluaron las variables demográficas de edad (pacientes menores o mayores de 45 años), género y tamaño tumoral (menor o mayor de 10 mm).

El material de patología, incluidas las laminillas y los bloques de parafina, se extrajo de los archivos de dicho servicio; 40 casos correspondieron a carcinoma papilar con extensión extratiroidea y 22 a carcinoma papilar sin extensión extratiroidea. Todas las muestras obtenidas se reevaluaron por dos diferentes patólogos con experiencia (Domínguez Malagon y Mosqueda Taylor), para confirmar el diagnóstico de acuerdo con la última revisión de la OMS.¹⁷

Los microarreglos tisulares se realizaron según el método de Pan y colaboradores:¹⁸ se elaboran cortes de 4

mm de diámetro de las zonas representativas de cada caso; cada muestra se obtuvo de áreas de invasión extracapsular (pacientes con carcinoma con extensión extratiroidea), y de áreas hipercelulares y cercanas a la cápsula (pacientes con carcinoma sin extensión extratiroidea). Para los estudios de inmunohistoquímica, cada bloque de microarreglos tisulares se cortó a 2 μm de grosor y se colocó en laminillas tratadas con poli-lisina; posteriormente, se secaron a temperatura ambiente durante la noche. Después de la desparafinización y rehidratación, cada corte fue tratado con 0.1 M de citrato de sodio (pH 6.2), para desenmascarar los epítopes. La peroxidasa endógena se bloqueó con 0.9% de peróxido de hidrógeno; posteriormente, se incubó en PBS con 1% de suero bovino durante cinco minutos, para eliminar los ligandos no específicos. Se utilizó el anticuerpo policlonal anti-VEGF-A (*clone Z-CVF3*, Zymed Laboratories Inc. Dilution 1:50) y el monoclonal anti-KDR (*clone KDR-1*, Sigma Chemical Corporation. Dilution 1:25). Las laminillas se incubaron durante 45 minutos con el anticuerpo primario, y después durante 30 minutos con anticuerpos biotinizados antirrátón/anticonejo y con el complejo estreptavidina/peroxidasa (LSAB + Labeled streptavidin-Biotin, Dako Corporation, Carpinteria, California, Estados Unidos), respectivamente.

Para visualizar la reacción se utilizó el sustrato 3,3'-diaminobencidina- H_2O (Dako Corporation, Carpinteria California, Estados Unidos). Las laminillas fueron contrateñidas con solución de hematoxilina de Mayer. En los controles negativos, el anticuerpo primario se reemplazó por PBS. Posteriormente, cada microarreglo tisular se evaluó de manera independiente, con microscopía de luz por tres diferentes patólogos, sin acceso a información clínica. Cuando la opinión de los tres evaluadores difería, se llegaba a un acuerdo por consenso.

Cuantificación de la inmunexpresión en células tumorales

La expresión del VEGF-A y KDR en células tumorales se calculó con un microscopio de luz (objetivos de 10x y 40x, marca Olympus CX-31), tomando fotografías con una cámara digital (Olympus C-7070); las fotomicrografías se obtuvieron de la interfase tumor-estroma. La expresión del VEGF y KDR fue predominantemente citoplasmática y su intensidad se evaluó de manera arbitraria, mediante la escala modificada de Götte y su grupo.¹⁹ Las muestras con inmunexpresión de moderada a intensa (+ y ++) se

clasificaron positivas y las que tuvieron expresión débil o ausente (-) se definieron como negativas.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizaron las pruebas del cuadrado de Pearson y exacta de Fisher, con la finalidad de obtener los valores esperados. Las pruebas de Mann-Whitney (*U-test*) y Kurskal Wallis se efectuaron para identificar las diferencias entre el carcinoma papilar con y sin extensión extratiroidea. Los resultados se consideraron significativos con $p \leq 0.05$. Los datos se tabularon y analizaron con el paquete estadístico SPSS 12.0 (SPSS Professional Statistics, SPSS Inc., IL, Estados Unidos).

RESULTADOS

De los 62 casos, se registraron 14 hombres (22.5%) y 48 mujeres (77.5%), con edad media de 45.4 ± 14.7 años (límites de 17 a 76). Entre éstos, 40 tuvieron carcinoma papilar con extensión extratiroidea y 22 sin extensión extratiroidea. La edad promedio para carcinoma con extensión fue de 45.05 ± 14.52 y sin extensión de 46 ± 15.41 . La media del tamaño tumoral en pacientes con extensión extratiroidea fue de 3.85 ± 2.63 cm y sin ésta, de 2.74 ± 2.29 cm ($p = 0.048$).

No se encontró asociación significativa entre edad, género y expresión del VEGF y KDR para ambos grupos.

Expresión del VEGF-A y KDR en pacientes con carcinoma papilar de tiroides

El VEGF-A tuvo inmunorreacción en 30/40 (75%) casos con carcinoma papilar con extensión extratiroidea, equiparable a la encontrada en 17/22 (77.2%) pacientes sin extensión. No se encontró asociación significativa en la expresión del VEGF-A y el tamaño tumoral entre ambos grupos (cuadro 1; figuras 1 y 2, a y c).

El KDR mostró inmunorreacción en 27/40 (67.5%) casos de carcinoma con extensión extratiroidea *versus* 19/22 (86.3%) sin ésta ($p < 0.05$).

Con respecto al tamaño tumoral, los carcinomas papilares con extensión extratiroidea mayores de 10 mm mostraron expresión en 18/30 (60%) casos contra 9/10 (90%) en los menores de 10 mm ($p < 0.05$ vs tamaño tumoral). En pacientes con carcinoma sin extensión extratiroidea, la expresión en tumores mayores de 10 mm se observó en 9/11 (81.8%) casos y en menores de 10 mm,

en 10/11 (90.9%) [$p < 0.005$ vs tamaño tumoral, cuadro 1; figuras 1 y 2, b y d].

DISCUSIÓN

La sobreexpresión del VEGF en la glándula tiroides se asocia con diversos tipos de neoplasias, benignas y malignas,²⁰ y con elevada expresión de la proteína y sus receptores, principalmente el KDR. Además, están relacionados con mayor riesgo de recurrencia y metástasis, participando de manera importante en el mantenimiento tumoral y en la transición de carcinomas bien diferenciados y poco diferenciados.¹⁶

En este estudio se observó la expresión del VEGF en pacientes con carcinoma papilar con y sin extensión extratiroidea, con inmunorreacción en el citoplasma de las células tumorales de ambos tipos de carcinoma. Sin embargo, no se encontró significancia estadística con respecto al tamaño tumoral (figuras 1 y 2), lo que puede justificarse porque el VEGF comienza a sobreexpresarse cuando las neoplasias sobrepasan 2 mm de longitud;²¹ quizá por esa característica no hubo relación entre el tamaño tumoral y

la expresión de VEGF. Aunque no fue estadísticamente significativo, se encontró mayor intensidad (++) en el citoplasma de células tumorales de carcinomas con extensión extratiroidea, que en el citoplasma de células tumorales sin ésta (cuadro 1; figuras 3 y 4), lo que puede sugerir que la sobreexpresión del VEGF se relaciona con invasión extracapsular, independientemente del tamaño tumoral. Estos hallazgos coinciden con lo publicado por Lennard y colaboradores,²² que aunque no evaluaron la invasión extracapsular, encontraron mayor intensidad en la expresión del VEGF en carcinomas papilares de tiroides con características clínicas e histológicas de mal pronóstico, que en los de mejor pronóstico. Los resultados obtenidos con el receptor KDR fueron distintos a los obtenidos con el VEGF. Se encontró significancia estadística en relación con el tamaño tumoral y se expresó con mayor frecuencia en pacientes con carcinoma si extensión extratiroidea menor de 10 mm; la intensidad (++) en la inmunorreacción del citoplasma fue similar en los carcinomas con y sin extensión extratiroidea, menores y mayores de 10 mm (cuadro 1 y figura 5). Jebreel y su grupo²⁰ reportan que la expresión de KDR ocurre en pacientes con neoplasias

Cuadro 1. Expresión de VEGF y KDR en carcinoma papilar de tiroides

	Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)			
	(-)	(+)	(++)	Total
<i>Carcinoma papilar de tiroides con extensión extracapsular</i>				
≤ 10 mm	2	3	5	10
> 10 mm	8	8	14	30
Total	10	13	17	40
<i>Carcinoma papilar de tiroides sin extensión extracapsular</i>				
≤ 10 mm	2	7	2	11
> 10 mm	3	5	3	11
Total	5	12	5	22
	Expresión del receptor KDR			
	(-)	(+)	(++)	Total
<i>Carcinoma papilar de tiroides con extensión extracapsular</i>				
≤ 10 mm ^a	1	3	6	10
> 10 mm ^a	12	8	10	30
Total ^b	13	11	16	40
<i>Carcinoma papilar de tiroides sin extensión extracapsular</i>				
≤ 10 mm ^c	1	4	6	11
> 10 mm ^c	2	6	3	11
Total ^b	3	10	9	22

^a KDR: $p < 0.05$ (++,+ vs -). ^b KDR: $p < 0.05$ (++,+ vs -). ^c KDR: $p < 0.005$ (++,+ vs -).

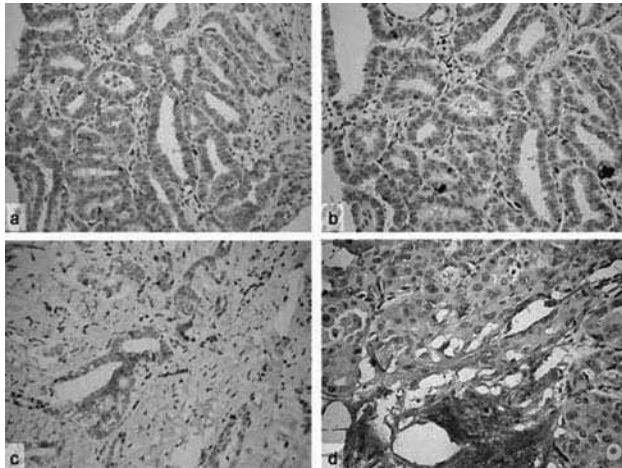


Figura 1. Expresión del VEGF-A y KDR en células epiteliales neoplásicas. (a) VEGF-A, carcinoma papilar con extensión extratiroidea, mayor de 10 mm, positivo (++). (b) KDR, carcinoma papilar con extensión extratiroidea, mayor de 10 mm positivo (+). (c) Expresión del VEGF-A, carcinoma papilar sin extensión extratiroidea, mayor de 10 mm, positivo (+). (d) Expresión de KDR, carcinoma papilar sin extensión extratiroidea, mayor de 10 mm, positivo (+).

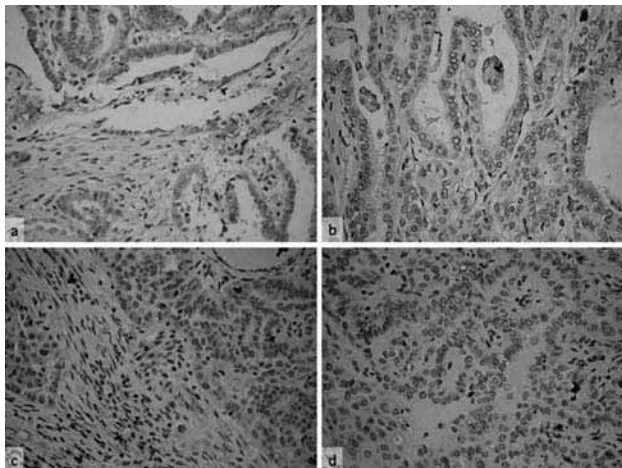


Figura 2. Expresión de VEGF-A y KDR en células epiteliales neoplásicas. (a) VEGF-A, carcinoma papilar con extensión extratiroidea, menor de 10 mm, positivo (++). (b) KDR, carcinoma papilar con extensión extratiroidea, menor de 10 mm positivo (+). (c) Expresión de VEGF-A, carcinoma papilar sin extensión extratiroidea, menor de 10 mm, positivo (+). (d) Expresión de KDR, carcinoma papilar sin extensión extratiroidea, menor de 10 mm, positivo (+).

benignas y malignas, y sugieren que puede ser independiente de la expresión del VEGF.

CONCLUSIÓN

Se observó mayor intensidad (++) en la expresión del VEGF de pacientes con carcinoma papilar de tiroides con

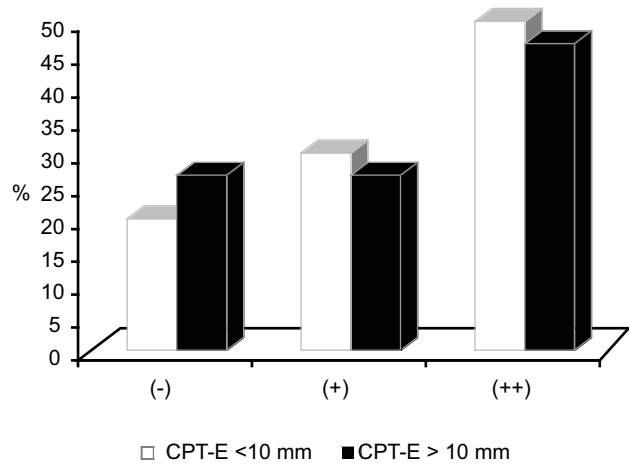


Figura 3. Expresión de VEGF-A en carcinomas papilares con extensión extratiroidea (CPT-E) mayores y menores a 10 mm. Obsérvese la intensidad (++) en comparación con carcinoma papilar sin extensión extratiroidea.

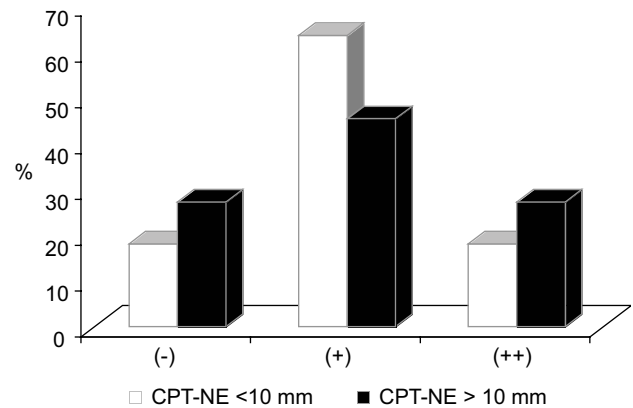


Figura 4. Expresión de VEGF-A en carcinomas papilares sin extensión extratiroidea mayores y menores a 10 mm. Obsérvese la intensidad (++) en comparación con carcinoma papilar con extensión extratiroidea.

extensión extratiroidea mayor de 10 mm, en comparación con la expresión de KDR, cuya intensidad (++) fue similar en carcinomas con y sin extensión extratiroidea, mayores y menores de 10 mm, respectivamente. Por tanto, se sugiere que la expresión de KDR puede ocurrir de manera constante y ser independiente a la expresión del VEGF y quizás KDR no se relacione con invasión extracapsular. Mientras que la expresión del VEGF aumenta conforme al tamaño y progresión tumoral, se observa mayor intensidad en pacientes con carcinoma papilar de tiroides de peor pro-

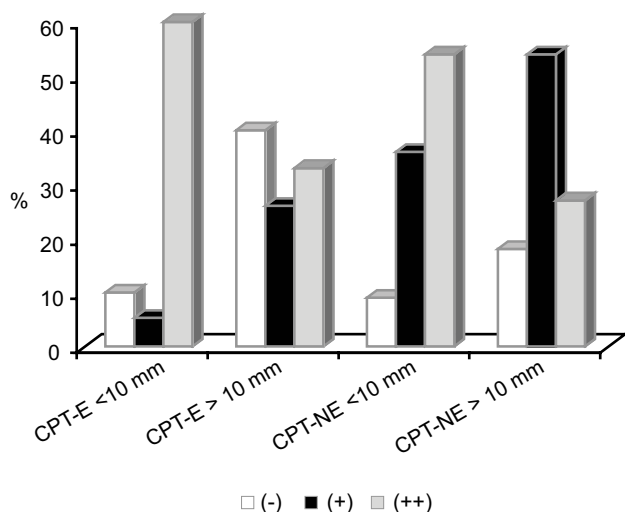


Figura 5. Expresión de KDR en carcinomas papilares con (CPT-E) y sin extensión extratiroidea (CPT-NE), mayores y menores a 10 mm. Obsérvese la intensidad (++) en los carcinomas papilares sin extensión extratiroidea menores a 10 mm.

nóstico, incluidos quienes tienen invasión extracapsular; por tanto, la expresión del VEGF puede ser independiente de la expresión de KDR y el aumento en la expresión de VEGF probablemente participe en la invasión extracapsular de dichos carcinomas.

REFERENCIAS

- Zou M, Al-Baradie RS, Al-Hindi H, Farid NR, Shi Y. S100A4 (Mts1) gene overexpression is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* 2005;93:1277-84.
- Carcangiu ML, Zampi G, Pupi A, Castagnoli A, Rosai J. Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. *Cancer* 1985;55:805-28.
- McWilliams RR, Giannini C, Hay ID, Atkinson JL, et al. Management of brain metastases from thyroid carcinoma: a study of 16 pathologically confirmed cases over 25 years. *Cancer* 2003;98:356-62.
- Michels JJ, Jacques M, Henry-Amar M, Bardet S. Prevalence and prognostic significance of tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2007;38:212-9.
- Patel VA, Hill DJ, Eggo MC, Sheppard MC, et al. Changes in the immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-2, transforming growth factor-beta-1 and thrombospondin-1 are associated with early angiogenic events in the hyperplastic rat thyroid. *J Endocrin* 1996;148:485-99.
- Sato K, Yamazaki K, Shizume K, Kanaji Y, et al. Stimulation of thyroid-stimulating hormone and Graves' immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in

human thyroid follicles *in vitro* and flt mRNA expression in the rat thyroid *in vivo*. *J Clin Invest* 1995;96:1295-302.

- Shpitzer T, Feinmesser M, Stern Y, Feinmesser R. Angiogenesis in follicular tumors of the thyroid. *J Surg Oncol* 1996;63:95-98.
- Ziche M, Maggione D, Ribatti D, Morbidelli L, et al. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest* 1997;76:517-31.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:1-30.
- Muller YA, Li B, Christinger HW, Hans W, et al. Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7192-7
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.
- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, et al. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995;1:1024-8.
- Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:13313-6.
- Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 1999;9:211-20.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
- Soh EY, Duh QY, Sobhi SA, Young DM, et al. Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3741-7.
- DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. 1st ed. Lyon: IARC Press, 2004.
- Pan CC, Chen PC, Chiang H. An easy method for manual construction of high-density tissue arrays. *Appl Immunohistochem Mol Morpho* 2004;12:370-2.
- Götte M, Kerting C, Radke I, Kiesel L, Wülfing P. An expression signature of syndecan-1 (CD138). E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma *in situ*. *Breast Cancer Res* 2007;9:R8.
- Jebrael A, England J, Bedford K, Murphy J, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and microvascular density in benign and malignant thyroid diseases. *Int J Exp Pathol* 2007;88:271-7.
- Lantuéjoul S, Constantin B, Drabkin H, Brambilla C, et al. Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol* 2003;200:336-47.
- Lennard CM, Patel A, Wilson J, Reinhardt B, et al. Intensity of vascular endothelial growth factor expression is associated with increased risk of recurrence and decreased disease-free survival in papillary thyroid cancer. *Surgery* 2001;129:552-8.