

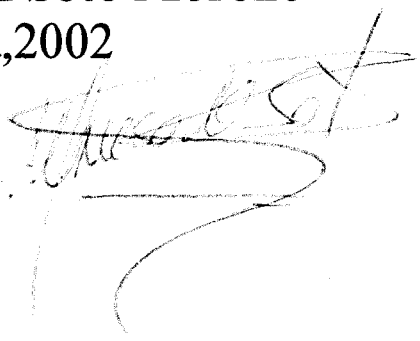
R.34.516 5/111

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

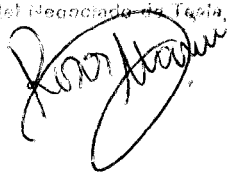
“EVALUACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL ARNm DE LA TIROGLOBULINA EN SANGRE COMO MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE RECIDIVAS EN EL CÁNCER DIFERENCIADO DE TIROIDES”

Tesis doctoral
Alfonso Manuel Soto Moreno
Sevilla, 2002



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Quedó inscrita en el Libro de Tesis Doctorales
el día 177 de mayo de 83 del libro
correspondiente.
Sevilla, 4 ABR. 2002

El Jefe del Negociado de Tesis,


DON RICARDO ASTORGA JIMÉNEZ, profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla y jefe de Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Virgen del Rocío y **DOÑA ELENA NAVARRO GONZÁLEZ** medico adjunto del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Virgen del Rocío

CERTIFICAN :

Que **DON ALFONSO MANUEL SOTO MORENO**, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación que lleva por título: **“EVALUACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL ARN_M DE LA TIROGLOBULINA EN SANGRE COMO MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE RECIDIVAS EN EL CÁNCER DIFERENCIADO DE TIROIDES”**

Para que conste y a los efectos oportunos expedimos el presente certificados en:

Sevilla, Marzo de 2002



DIRECTORES

FDO. D. Ricardo Astorga Jiménez

FDO. Dña. Elena Navarro González

A Flora

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A Elena Navarro, por su dedicación y ayuda en el desarrollo de este trabajo, por prestarme su apoyo siempre que lo he necesitado y porque con ella he madurado como persona.

A Ricardo Astorga, por ser el primero que pensó que este proyecto era viable, por confiar en mi para desarrollarlo y porque es un ejemplo diario de calidad humana para todo nuestro servicio.

A Miguel Ángel Japón, que es mi tercer director de tesis, y sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible. Con él aprendí no sólo técnicas de laboratorio, sino otra forma de hacer las cosas.

A José Ramón Rodríguez, por prestarme su tiempo y porque con su meticulosidad en el quehacer diario ha permitido que este trabajo sea una realidad.

A Loli, Toñi y Rosa, porque siempre colaboraron conmigo cuando me fue necesario.

A los miembros de mi servicio que despertaron en mí el interés por la investigación, con los que aprendí la importancia de avanzar en el conocimiento.

INTRODUCCIÓN	3
CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIROIDES	4
1. <i>EPIDEMIOLOGÍA</i>	4
2. <i>HISTOLOGÍA</i>	6
3. <i>DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO</i>	10
4. <i>FACTORES PRONÓSTICO</i>	14
5. <i>SEGUIMIENTO</i>	20
ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL (EMR)	33
ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL Y CDT.....	37
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	46
OBJETIVOS CONCRETOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS	51
DISEÑO DEL ESTUDIO	52
PACIENTES.....	54
DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	56
DETECCIÓN DE ARNm DE TIROGLOBULINA	57
RESULTADOS	69
1.- <i>SENSIBILIDAD DEL MÉTODO IN VITRO</i>	70
2.- <i>SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL ARNm DE TIROGLOBULINA EN LOS PACIENTES CON CDT</i>	73
3.- <i>COMPARACIÓN DE ARNm DE TIROGLOBULINA Y TIROGLOBULINA SÉRICA</i>	75
4.- <i>ARNm DE TIROGLOBULINA EN PACIENTES CON RASTREO NEGATIVO Y TIROGLOBULINA NEGATIVA</i>	80
5.- <i>ARNm DE TIROGLOBULINA EN PACIENTES CON RASTREO NEGATIVO Y TIROGLOBULINA POSITIVA</i>	83
6.- <i>ARNm DE TIROGLOBULINA EN PACIENTES CON ANTICUERPOS ANTI- TIROGLOBULINA (ANTI-TG) ELEVADOS</i>	84
7.- <i>COMPARACIÓN DE LOS PACIENTES CON DETERMINACIÓN DE ARNm DE TIROGLOBULINA EN HIPO Y EUTIROIDISMO</i>	85

DISCUSIÓN.....	87
CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	110

INTRODUCCIÓN

CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIROIDES

1. EPIDEMIOLOGÍA

Los carcinomas tiroideos son la neoplasia de origen endocrinológico más frecuente y suponen el 1,1% de los tumores malignos excluidos los de piel¹. Dentro de ellos, el carcinoma diferenciado de tiroides (CDT), neoplasia que tiene su origen en el epitelio folicular, supone el 90% de todas las originadas en el tiroides, así como el 70% de las muertes por esta causa². Dentro de los CDT se incluyen el Carcinoma Papilar, y el Carcinoma Folicular con sus respectivas variedades histológicas.

La incidencia anual de los Carcinomas Tiroideos ha aumentado considerablemente en los últimos años. De una incidencia de 13900 casos/año en EEUU en 1995 , se pasó a 15000 nuevos casos año en 1997³ y a más de 18000 nuevos casos/año en 2000. En Europa los datos de la European Comission⁴ hablan de una Incidencia anual de 28000 casos/año. La explicación a este incremento parece ser la mayor resolución de los medios diagnósticos de los que disponemos actualmente.

Este tipo de tumores tienen además una baja tasa de mortalidad, en el año 1999 en EEUU murieron 1200 personas de esa patología, con una tendencia hacia la disminución progresiva en los últimos años. (20% de 1973 a 1996, $p < 0,05$)¹.

En nuestra comunidad Andaluza, y según fuentes del Instituto Andaluz de Estadística, la mortalidad por cáncer de tiroides oscilaba en 1993 entre 7,7 y 3,9 casos /1000000 habitantes según las provincias, y no observamos ese descenso de

mortalidad al que hacen referencia otros autores, sino que por el contrario hay una estabilización e incluso discreto aumento en la mortalidad según las zonas en los últimos 20 años.

La supervivencia de estos tumores, por tanto, es elevada a largo plazo. En una cohorte amplia estudiada en EEUU, la supervivencia de las neoplasias Papilares y Foliculares a los 10 años fue del 93 y 85% respectivamente², datos que concuerdan con la serie de 1528 pacientes aportada por Mazzaferri et al⁵, en la que la supervivencia a 10 años eran de 94 y 84%.

Este aumento progresivo de la incidencia, junto con la baja mortalidad, actualmente en progresiva disminución, determina una elevada prevalencia de pacientes afectos de CDT, que en EEUU se estima en 188000 pacientes⁶. Esta elevada prevalencia genera un alto número de pacientes que precisan seguimiento a largo plazo.

Factores de riesgo

Diferentes estudios epidemiológicos han tratado de encontrar diversos factores que puedan asociarse a la mayor incidencia de carcinomas tiroideos, y estos serían:

La historia previa de irradiación en la infancia es el único factor etiológico claramente demostrado que interviene en el desarrollo del cáncer de tiroides. Desde 1920 se empleó la radioterapia en el tratamiento de patología benigna de cabeza y cuello (timo, amígdalas, adenoides, angiomas, acné, otitis...^{7,8,9,10,11}). En 1970, según datos de USA, el 76% de los niños con carcinoma tiroideo tenían historia previa de irradiación¹². En Europa, según datos del instituto Gustave-Roussy, sólo el 10% de los niños con carcinoma tiroideo habían sido previamente irradiados¹³.

La Historia familiar de determinadas enfermedades hereditarias también aumenta considerablemente el riesgo de presentar un carcinoma tiroideo, pero la frecuencia de las mismas es muy baja. Las familias afectas de Síndrome de Gardner (Poliposis adenomatosa familiar) o de la enfermedad de Cowden (hamartomas múltiples) con transmisión autosómica recesiva, tienen un riesgo más elevado de desarrollar Carcinoma Papilar de tiroides, generalmente multicéntrico, con respecto a la población general^{14,15}.

Enfermedades tiroideas autoinmunes¹⁶, y en menor medida nódulos benignos y bocio¹⁷, se han asociado en la literatura a CDT. A pesar de que la relación de la tiroiditis de Hashimoto con el CDT se ha establecido en diferentes artículos¹⁸, su relación pronóstica con el desarrollo del mismo aún no está filiada, postulándose incluso una mayor supervivencia en pacientes que presentan CDT junto con tiroiditis de Hashimoto que en los que no la presentan.

Otros estudios epidemiológicos han tratado de encontrar factores relacionados con la mayor incidencia de carcinomas tiroideos. Así, la presencia de factores hormonales en la mujer¹⁹, medidas corporales²⁰, déficits en la ingesta de yodo²¹ y otros factores dietéticos o medioambientales²² se han relacionado de una u otra forma con la incidencia de esta patología, pero las evidencias existentes son aún muy débiles.

2. HISTOLOGÍA

El CDT se incluye el Carcinoma Papilar y el Carcinoma Folicular, ambos tumores derivados del epitelio folicular tiroideo. El Diagnóstico de Carcinoma Papilar se establece en base a que exista diferenciación folicular, con estructuras papilares y foliculares, y por cambios típicos en el núcleo, tales como el alargamiento y aparente vaciamiento de los mismos, que les da un aspecto en “cristal esmerilado”, la aparición de las llamadas “jorobas nucleares”, o la disposición en hilera de estos con su eje mayor en paralelo, zonas de fibrosis y cuerpos de Psamoma. Así mismo

El diagnóstico de carcinoma folicular se basa en la misma diferenciación folicular pero sin los cambios nucleares típicos del papilar^{23,24}.

Dentro de los **Carcinomas Papilares** encontramos:

Carcinoma papilar convencional; que a su vez en función del tamaño y la extensión se subdividen en:

Microcarcinoma papilar tiroideo; son aquellos tumores de menos de 1 cm de diámetro, que se encuentran con frecuencia (5-35%) en estudios de autopsias. El número de casos se está incrementando a medida que mejora la sensibilidad de los medios diagnósticos y en general tienen un buen pronóstico, aunque se asocian frecuentemente con metástasis linfáticas locales, en un porcentaje variable del 23 al 67%^{25 26}.

Carcinoma papilar tiroideo limitado a la glándula tiroidea o invasivo; suponen más del 70% de los carcinomas papilares. Al igual que en los microcarcinomas el diagnóstico se establece en función de las características de los núcleos. Su extensión suele ser a través de los vasos linfáticos a los ganglios regionales del compartimento anterior y lateral del cuello. Son tumores de crecimiento lento, e incluso cuando presenta metástasis a distancia estas suelen tener un comportamiento poco agresivo, y los pacientes pueden sobrevivir muchos años con estas. La muerte causada por el tumor suele precipitarse por la dediferenciación del tumor, a veces progresando a una transformación anaplásica²⁷. Se estima que el índice de curación para aquellos pacientes que presentan adenopatías cervicales o recurrencias locales es del 76%, mientras que cuando la metástasis es de gran tamaño o a distancia este porcentaje disminuye al 46%²⁸.

Variantes Histológicas del Carcinoma papilar tiroideo; Son tumores que representan un 15-20% de los carcinomas papilares, y además de

las características nucleares típicas presentan una histología específica que permite clasificarlos aparte:

Carcinoma papilar variante folicular; Su apariencia es idéntica a un adenoma folicular pero con las características nucleares típicas del carcinoma papilar. Se encuentra frecuentemente en sujetos jóvenes y suponen el 21% de los tumores diagnosticados en los niños de Chernobil estudiados²⁹. El pronóstico es similar al papilar convencional, aunque a veces es más agresivo. En la mayoría de los casos aparecen metástasis locales o a distancia, pero responde correctamente a la terapia con radioyodo²⁷.

Carcinoma papilar variante esclerosante difusa; Se trata de un tumor que incluye de manera difusa uno o ambos lóbulos tiroideos, además de presentar abundantes cuerpos de Psamoma y área de metaplasia escamosa. Se encuentra fundamentalmente en niños y adultos jóvenes^{30,31}. Aunque parece que este tumor se asocia a una mayor cantidad de metástasis locales y pulmonares, no hay suficiente evidencia para afirmar que su pronóstico sea menos favorable que el carcinoma papilar convencional²⁷.

Carcinoma papilar variante “células altas”³² Es una variante rara de carcinoma papilar, que se caracteriza por sus células claras y la característica disposición de sus núcleos en la base de las mismas, además de las características nucleares. Aparecen fundamentalmente en personas de mayor edad. Tienen capacidad de invasión vascular pero son muy agresivos localmente. Su pronóstico es peor que el de los carcinomas papilares convencionales, y la supervivencia de estos pacientes está acortada en la mayoría de las series²⁷.

Carcinoma papilar variante “células columnares”³³; Se trata de una variante de carcinoma papilar similar a la variante células altas, pero con la característica de la disposición columnar de sus células. Su pronóstico es de una agresividad similar a la variante anterior²⁷.

Carcinoma papilar variante encapsulada; Se asemejan a un adenoma, aunque la cápsula está invadida. Representan el 10% de los casos de carcinoma papilar tiroideo y tienen un muy buen pronóstico³⁴ dado su escaso número de recurrencias y su casi nula mortalidad²⁷.

Los **Carcinomas Foliculares** se caracterizan por presentarse como un tumor sólido y encapsulado, y su principal dificultad diagnóstica radica en la dificultad para diferenciarlos de los adenomas foliculares mediante Punción Aspiración con Aguja Fina (PAAF). Cuando invaden, generalmente lo hacen en vasos y raramente por la vía linfática. A veces es preciso usar la inmunohistoquímica para tiroglobulina a la hora de identificar las metástasis a distancia³⁵. En función de la mayor o menor invasión de la cápsula⁹ se dividen en :

Carcinoma folicular mínimamente invasor; Representan el 50% de los casos. El diagnóstico a veces es difícil y requiere la demostración de invasión vascular o capsular. Su pronóstico si no existen imágenes a distancia es bueno.

Carcinoma folicular invasor; En estos la cápsula, si esta presente, se encuentra completamente invadida o infiltrada. El porcentaje de metástasis a distancia es mayor que en el mínimamente invasor, y por tanto su pronóstico es más incierto²⁷.

Al igual que ocurre con los carcinomas papilares, también en los foliculares hay algunos tumores que se identifican como **Variantes Foliculares**:

Carcinoma folicular variante células claras; Es una variante rara³⁶, que muchas veces es muy difícil de diferenciar de una metástasis tiroidea de un carcinoma renal. Recibe su nombre debido al acúmulo de glucógeno o grasa en las células. El uso de la inmunohistoquímica es también muy útil en la identificación de estos tumores¹⁷.

Carcinoma folicular variante oncocítica o tumor de Hürthle; Reciben su nombre de un tipo de células denominadas “oncocitos” o “células

oxifílicas”, caracterizadas por tener citoplasmas muy acidófilos debido al gran número de mitocondrias que presentan²⁷. Son tumores sólidos solitarios, que se presentan con frecuencia con extensión extratiroidea especialmente en ganglios locales y cuyo pronóstico es peor al de los carcinomas foliculares convencionales³⁷.

Carcinoma folicular variante insular; Se trata también de tumores poco frecuentes³⁸, sólidos, con frecuencia de extensión extratiroidea y metástasis a distancia, que presentan un mal pronóstico debido a su escasa diferenciación y abundantes mitosis en los núcleos.

3. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

La manifestación clínica más habitual es masa palpable en el cuello, bien un nódulo intratiroideo o bien una adenopatía cervical. Otras veces, sin embargo, sin masa cervical alguna, la sospecha de carcinoma nos viene dada por una técnica radiológica de alta resolución o por el propio cirujano al extirpar una adenopatía en una intervención quirúrgica.

Aunque la forma más frecuente de presentación del carcinoma diferenciado es como un nódulo cervical, no en todos los nódulos hay que sospechar un carcinoma. En diferentes series se ha descrito en torno a un 5-6,5% de cánceres tiroideos en los nódulos observados^{39,40}. Se han identificado diferentes factores de riesgo para desarrollar un carcinoma diferenciado de tiroides, y los más importantes son la edad³⁸, donde edades muy tempranas deben hacer sospechar la malignidad del nódulo, el sexo²², dado que en un nódulo en un varón tiene el doble de posibilidades de ser un carcinoma que en una mujer, y la historia previa de irradiación en la región del cuello¹², que también se ha asociado con una mayor tasa de malignidad en los nódulos.

La historia clínica y la exploración física rara vez llevan al diagnóstico definitivo y se precisa la confirmación citológica o histológica del tumor. La punción aspiración con aguja fina (PAAF) es el método diagnóstico más coste-efectivo en la

diferenciación de un nódulo benigno de uno maligno preoperatoriamente. De todas formas, el diagnóstico de carcinoma diferenciado de tiroides debe confirmarse siempre en la pieza de biopsia, sobre todo el carcinoma folicular, que precisa la demostración de invasión de la cápsula del tumor o de los vasos sanguíneos para ser diagnosticado⁴¹.

Por último reseñar la elevada proporción de microcarcinomas tiroideos encontrados en las piezas de autopsias, entre el 6 y el 13%^{42,43} de los pacientes fallecidos estudiados, lo que nos indica que la verdadera prevalencia de este tipo de tumores es aún mayor de la que se manifiesta clínicamente.

El tratamiento del CDT, se basa en tres pilares fundamentales: Tratamiento quirúrgico, Terapia con radioiodo y tratamiento supresor con Hormona tiroidea.

Tratamiento Quirúrgico:

A pesar de los muchos estudios, la mayoría de ellos retrospectivos, que hacen referencia al tema, no hay aún consenso en cuanto al tipo de cirugía a realizar, debatiéndose entre Tiroidectomía total o parcial.

La tiroidectomía total o casi total ha demostrado reducir el riesgo de recurrencias locales, cuando se compara con las recurrencias de aquellos pacientes que fueron intervenidos mediante una técnica menos agresiva⁵. Otros factores a tener en cuenta para recomendar este tipo de cirugía son la frecuente multicentricidad de estos tumores (en el 60 al 85% de los mismos se aprecian focos de tumor en el lóbulo contralateral)⁴⁴, la elevada mortalidad por complicaciones del compartimento central del cuello⁴⁵, el hecho de que facilita la ablación de los restos tiroideos potquirúrgicos y por tanto permite utilizar la determinación de tiroglobulina como marcador de recidiva ya que se elimina todo el tejido tiroideo.

Hay algunos grupos que defiende la realización de hemitiroidectomía más istmectomía en aquellos pacientes de bajo riesgo, con tumores menores de un

centímetro y sin extensión extratiroidea^{46, 47}. Fundamentan su postura en dos hechos fundamentales, la menor tasa de complicaciones quirúrgicas (aunque en manos de cirujanos expertos estas han de ser muy bajas) y la dificultad de demostrar una disminución de la tasa de recurrencia en los estudios retrospectivos en este grupo de pacientes cuando se realiza tiroidectomía total⁴⁸.

Hoy en día se recomienda la realización de Tiroidectomía total o “casi total” en tumores que sean mayores de un centímetro de diámetro, siempre que hay extensión extratiroidea tanto ganglionar como metástasis a distancia. También se recomienda este tipo de cirugía en aquellos pacientes que, sea cual sea el tipo de tumor, hayan sido previamente sometidos a tratamiento con radiaciones ionizantes^{41,49}. La Hemitiroidectomía más istmectomía estaría indicada sólo en aquellos pacientes con tumores inferiores a un centímetro de diámetro y confinados a la glándula tiroidea, dado que en estos casos la supervivencia a los 30 años del diagnóstico se aproxima al 100%⁵.

Terapia con Radioyodo (I^{131}):

El Yodo 131 es hoy en día uno de los pilares del tratamiento del CDT. En un estudio realizado en la Universidad de Texas, el tratamiento con radioyodo resultó el indicador pronóstico individual más potente considerar al paciente libre de enfermedad y aumentar la supervivencia⁵⁰. La base fisiológica de su uso es la capacidad del tiroides humano de atraer el Yodo ingerido para posteriormente utilizarlo en la síntesis de hormona tiroidea. Existen preparaciones en forma de cápsula, líquidas e intravenosas, y el manejo debe ser cuidadoso para evitar radiación en el personal de las unidades de terapia metabólica. Al ir la molécula marcada y captarla el tiroides, la cantidad de radiación liberada en él es de 1000 a 10000 veces mayor que la de acumulada en el resto del cuerpo⁵¹, y se hace en forma de emisión de radiación beta. Por tanto conseguimos una terapia local mediante un isótopo dirigido por una molécula, el Yodo, que tiene afección por el tejido tiroideo. Los objetivos de la terapia son varios: 1) la ablación del tejido tiroideo residual, 2) obtener una imagen de la posible recidiva de la enfermedad y 3) tratar esta última si la hubiese.

Con la terapia ablativa postquirúrgica se pretende destruir cualquier resto de tejido tiroideo normal o tumoral que exista ya que siempre persisten en mayor o menor grado a pesar de que se realice una cirugía tiroidea extensa. Varios estudios demuestran la disminución de la mortalidad si se realiza ablación de los restos tiroideos en tumores mayores de un centímetro, en tumores multicéntricos y en aquellos en los que hay invasión de tejidos blandos^{5, 52}.

La utilización del radioyodo postcirugía permite:

- 1) destruir los restos microscópicos de células tumorales que pudieran persistir.
- 2) identificar en rastreos posteriores la presencia o no de recurrencia tumoral.
- 3) aumenta la sensibilidad de la tiroglobulina como marcador tumoral en el seguimiento del cáncer diferenciado de tiroides.

Las dosis de radioyodo utilizadas difieren en función del objetivo a conseguir. Son mucho más altas las dosis que se precisan para destruir restos metastáticos del tumor en hueso o pulmón que los que se precisan para ablacionar restos tiroideos posquirúrgicos. Las dosis empleadas, por tanto, varían desde hasta 200 mCi empleados cuando hay metástasis óseas a dosis inferiores a 100 mCi empleadas para ablación de restos postquirúrgicos. En este último punto, la ablación de restos, no existe un consenso en cuanto a las dosis a emplear, variando desde 30 mCi hasta los 150 mCi defendidos por Beierwaltes⁵³. En los últimos años se han puesto en marcha diferentes protocolos que tratan de optimizar el tratamiento con radioyodo en estos pacientes, así dosis de 25 a 30 mCi, sobre todo si los restos tiroideos son pequeños, permiten una menor dosis de irradiación total y no precisan de la hospitalización del paciente⁵⁴.

En cuanto a las condiciones del tratamiento con radioyodo, es preciso que se emplee en situación de hipotiroidismo, con TSH elevada para que esta estimule la captación de los restos tiroideos y las metástasis si las hubiera. Para ello es preciso suspender el tratamiento sustitutivo con Tiroxina 4 semanas antes de la

terapia. No existe un consenso en cuanto a la cifra de TSH precisa para que el tratamiento sea totalmente efectiva, pero se asume una nunca inferior a 30 $\mu\text{UI/ml}$. El tratamiento inicial con radioyodo se realiza tras la Tiroidectomía, para completar el tratamiento del CDT.

Tratamiento supresor con hormona tiroidea:

La administración de dosis suprafisiológica de hormona tiroidea para suprimir la TSH en suero en pacientes con CDT se ha venido realizando hace más de 40 años⁵⁵. Tradicionalmente la dosis utilizada era aquella que permitiera una supresión de la TSH, tal que la hiciera indetectable en los inmunoensayos, estimada entre 2,2 y 2,8 $\mu\text{g/kilogramo}$ de peso en adultos⁵⁶. Aunque hay estudios retrospectivos que parecen demostrar que la terapia supresora con tiroxina disminuye la recurrencia tumoral en CDT⁵⁷, no existen sin embargo estudios prospectivos que demuestren la eficacia de esta terapia y las complicaciones que se pueden derivar de su efecto (pérdida de hueso^{58,59}, fibrilación auricular⁶⁰, disfunción ventricular⁶¹) han hecho replantearse este tratamiento.

Por otro lado los actuales sistemas de medición de TSH en suero, que nos permiten una cuantificación más exacta de la misma, han hecho a algunos autores plantearse limitar la supresión severa (de 0,01 a 0,1 $\mu\text{UI/ml}$) a aquellos pacientes con riesgo elevado de metástasis, y mantener a los pacientes con bajo riesgo de recurrencia con la TSH frenada, pero en un rango superior (0,1-0,5 $\mu\text{UI/ml}$)^{62, 63}. En este último rango también podrían mantenerse los pacientes con enfermedades óseas o cardíacas y aquellos que llevan más de cinco o diez años libres de enfermedad.

4. FACTORES PRONÓSTICO

Los pacientes afectos de CDT tienen una elevada tasa de curación después del tratamiento inicial y el pronóstico a largo plazo es habitualmente favorable. La supervivencia de las neoplasias Papilares y Foliculares a los 10 años

en series Americanas fue del 93 y 85% respectivamente², datos que concuerdan con la serie de 1528 pacientes aportada por Mazzaferri et al⁵, en la que la supervivencia a 10 años eran de 94 y 84%. Sin embargo algunos pacientes presentan un riesgo elevado de recurrencia, e incluso de muerte⁶⁴.

Se han identificado una serie de factores, denominados de riesgo, que se asocian claramente a un peor pronóstico de la enfermedad tanto en lo referente a mortalidad como a recidivas, y son los siguientes (Tabla 1):

<i>Edad</i>	<i>< 16 años y > 45 años</i>
<i>Histología</i>	<i>Tamaño del tumor</i> <i>Extensión extracapsular</i> <i>Cels.altas,cels columnares, esclerosis difusa</i>
<i>Metástasis</i>	<i>Ganglionares bilaterales o mediastínicas</i> <i>A distancia</i>
<i>Tratamiento</i>	<i>Cirugía incompleta</i> <i>No ablación con I131</i>
<i>Evolución</i>	<i>Tg elevada mas de 3 meses tras cirugía</i>

Tabla 1: Factores pronóstico de riesgo en el carcinoma papilar de tiroides

a) Factores pronóstico ligados a características individuales

Edad: Mediante estudios estadísticos multivariantes se ha demostrado que la edad es el factor pronóstico independiente más importante en el CDT. Los índices de mortalidad son bajos en los pacientes menores de 40 años y el riesgo se incrementa progresivamente con la edad^{6, 65, 66}. Así mismo el riesgo de recurrencia es especialmente alto (40%) si el diagnóstico se realiza durante las 2 primeras décadas de la vida, dado que los pacientes suelen presentar la enfermedad más avanzada y variantes histológicas más agresivas.^{7,15}. Por tanto se considera factor

de riesgo tener menos de 15 años o más de 45 años en el momento del diagnóstico del CDT.

Sexo: A pesar de que el CDT es mucho menos frecuente en varones que en mujeres, éstos tienen el doble de riesgo de morir por esta patología que las mujeres. Por tanto ser varón se considera un factor de riesgo para recurrencia y mortalidad del CDT^{4,7, 64, 67}.

Patología autoinmune tiroidea: La influencia o no de la patología tiroidea autoinmune en la evolución del CDT no está aún bien delimitada. Solamente un grupo⁶⁸ ha encontrado diferencia en la evolución del CDT asociado a enfermedad de Graves-Basedow. En cuanto a la asociación con Tiroiditis de Hashimoto tampoco existen datos concluyentes al respecto de su relación con el CDT. Si es interesante reseñar que la desaparición de los anticuerpos antitiroglobulina tras la terapia ablativa es un signo de curación de la enfermedad, así como la reaparición posterior o la persistencia lo son de recidiva⁶⁹.

b) Factores pronóstico ligados a las características del tumor:

Tipos y variantes histológicas: En general el pronóstico de los carcinomas papilares tiroideos es mejor que el de los carcinomas foliculares, aunque hay algunas excepciones a la regla^{7,70}. Dentro del Carcinoma Papilar se ha descrito un peor pronóstico en las variantes histológicas Carcinoma Papilar de Células Altas²⁹, Carcinoma Papilar de Células Columnares³⁰ y Esclerosis difusa^{27,28}, que en el Carcinoma Papilar Convencional. Sin embargo el Carcinoma Papilar variante Encapsulado, ha demostrado tener un mejor pronóstico que este³¹. Dentro de los Carcinomas Foliculares, también ha demostrado tener un peor pronóstico la variante Insular³⁵ y la forma invasora con respecto a la minimamente invasora.

Diferenciación celular: El grado de diferenciación celular es un importante factor pronóstico tanto en el Carcinoma papilar como en el Folicular. A mayor grado de dediferenciación celular y atípicas celulares, peor es el pronóstico de la enfermedad⁷¹.

Tamaño Tumoral: Existe una relación directa entre el tamaño del tumor primario, mayor frecuencia de recidivas y mayor mortalidad. Sin embargo no hay un límite de tamaño en el que señalar el aumento de riesgo. Si está bien demostrado que cuando los tumores son menores de 1,5 cm, el pronóstico mejora de manera significativa.^{70,71,72}

Multifocalidad: La multifocalidad de los tumores se asocia con una mayor frecuencia de extensión linfática⁷³ y a distancia^{7,35}, por lo que se relaciona con un peor pronóstico, sin embargo no hay evidencia de que sea la propia multifocalidad la que determina la mala evolución tumoral o bien estaría ligada a los otros factores.

Extensión tumoral:

La extensión del tumor **fuera de los límites de la cápsula tiroidea** es por sí mismo un importante factor pronóstico de recidiva. Aparece en el 5-10% de los Carcinomas Papilares y en el 3-5% de los foliculares y supone para el paciente una mayor frecuencia de metástasis linfáticas, a distancia y una mayor mortalidad^{7, 65,74}.

Las **metástasis linfáticas** están presentes en un 35 al 65% de los Carcinomas Papilares según las series y en un 15 a 20% de los foliculares⁷⁵. Tanto en la serie de la universidad de Ohio (EEUU)⁷ como en la del instituto Gustave-Roussy de París⁶⁶, las metástasis linfáticas fueron por sí mismas un factor de riesgo para recidiva tumoral y mayor mortalidad. Resultados similares obtiene Mazzaferri⁶ en un estudio de 1528 pacientes.

La presencia de **metástasis a distancia** en el momento del diagnóstico se ha considerado como el peor dato pronóstico tanto en el Carcinoma Papilar como en el Folicular⁷⁶. En estos pacientes, la mortalidad a largo plazo es muy alta, superando un 50% a los 15 años⁶.

c) Factores pronóstico relacionados con el tratamiento:

Tipo de cirugía: La mayoría de expertos están de acuerdo en que un diagnóstico precoz y una cirugía radical inicial son factores decisivos en el pronóstico del CDT. Diferentes estudios han demostrado que la cirugía incompleta se asocia con un peor pronóstico⁵. Por ello la tiroidectomía total se ha propugnado como tratamiento de elección para todos los CDT a excepción de los microcarcinomas intratiroideos, donde aún existe controversia^{6,7, 65,71,75}.

Ablación de los restos tiroideos con radioyodo: El fundamento de este tratamiento es eliminar todos los restos tiroideos con el fin de permitir posteriormente rastrear la posible existencia de tejido tiroideo. Aunque su uso rutinario hoy en día se discute, parece demostrado que en tumores grandes, con factores de riesgo pronóstico o en estadios avanzados, la no ablación de los restos tiroideos se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad⁶

Tiroglobulina como marcador tumoral elevado: La persistencia de la tiroglobulina, como marcador tumoral del CDT, elevada unos meses tras la cirugía, se asocia con un mal pronóstico de la enfermedad^{77, 78}.

Estadíaje clínico-patológico del CDT

Con el fin de identificar a aquel grupo de pacientes con mayor riesgo de presentar recidivas y por tanto realizar diferentes tipos de seguimiento, se han desarrollado varios sistemas de estadíaje que pretenden estratificar a los pacientes según grupos de riesgo utilizan distintos factores pronóstico (Tabla 3). No hay un claro consenso sobre cual de estos sistemas tiene una mayor utilidad clínica. Los sistemas de estadíaje existentes son:

TNM System: Es un sistema elaborado por el American Joint Committee on Cancer (AJCC), basado en el Tamaño, extensión linfática y metástasis a distancia del tumor, relacionado con la edad al diagnóstico⁷⁹. Divide al paciente en 4 estadios de riesgo y es, actualmente, el más usado (Tabla 2).

Estadio	Edad < de 45 años	Edad > de 45 años
I	M0	T1
II	M1	T2-T3
III	T4 o N1
IV	M1

Tabla 2: Sistema de estadiaje establecido Por la American Joint Committee on Cancer (AJCC)

EORTC System: La asociación europea para el desarrollo y tratamiento del cáncer desarrolló y posteriormente modificó un sistema de medida basado en un análisis multivariante de 507 pacientes⁸⁰. El sistema introduce como variables la edad, el sexo, el tipo histológico, la invasión extratiroidea y la metástasis a distancia. Hay un total de 5 grupos de riesgo.

AMES System: Esta clasificación divide a los pacientes en 2 grupos, bajo o alto riesgo, en función de 4 variables: Edad, extensión, tamaño y metástasis. El estudio se realizó en 310 pacientes con un seguimiento de 20 años⁸¹.

AGES y MACIS System: El AGES es un sistema elaborado en la Clínica Mayo, que estratifica a los pacientes en 4 grupos de riesgo en función de, en orden descendente de importancia, metástasis a distancia, edad al diagnóstico, tamaño tumoral, extensión extratiroidea y grado histológico del tumor⁸². Posteriormente y obviando el grado histológico del tumor, se estableció el sistema MACIS⁸³, que añade la valoración de la resección completa o no.

UNIVERSITY OF CHICAGO System: Este sistema elaborado por De Groot en la universidad de Chicago está basado únicamente en la extensión tumoral, y también estratifica a los pacientes en 4 grupos⁴⁷.

OHIO STATE UNIVERSITY System: Esta clasificación se elaboró en base al análisis multivariante retrospectivo de 1355 pacientes, estableciendo 4 estadios y valorando la extensión tumoral⁷.

Variable pronóstica	EORTC	AMES	AGES	MACIS	U de C	U de O
Edad	X	X	X	X
Sexo	X	X
Tamaño	X	X	X	X	X
Multicentricidad	X
Grado Histológico	X
Tipo Histológico	X	X
Invasión Extratiroidea	X	X	X	X	X	X
Metastasis linfática	X	X
Metastasis a distancia	X	X	X	X	X	X
Resección incompleta	X

Tabla 3: Factores pronóstico usados para definir grupos de riesgo en por los diferentes sistemas en pacientes con CDT.

A pesar de todo, estos sistemas no predicen el pronóstico si lo aplicamos a un paciente individual, así el clínico debe usar las características clínico-patológicas propias de cada paciente para establecer un tratamiento individualizado.

5. SEGUIMIENTO

El elevado riesgo de recurrencias (20-30%) de aparición de metástasis a largo plazo determina que el seguimiento de estos pacientes ha de ser continuado durante toda su vida, lo que sumado a la alta supervivencia hace que el seguimiento sea un punto clave en el CDT⁷⁶.

5.1 Métodos de seguimiento

5.1.1 Exploración clínica

La palpación del cuello, para detección de nódulos y/o adenopatías se ha de realizar de forma rutinaria. La presencia de adenopatías pequeñas, blandas y que se reducen de tamaño en un intervalo de 3 meses se consideran como benignas. Es conveniente realizar ecografía de cuello en cualquier paciente con hallazgos clínicos sospechosos, e incluso hay autores que recomiendan esta exploración de forma rutinaria en pacientes con alto riesgo de recidivas⁵⁶. En el caso de que existan lesiones sospechosas puede realizarse una punción aspirado de las mismas e inmunohistoquímica para TG en el aspirado⁸⁴.

5.1.2 Radiología de Tórax

La Rx de tórax no ha de realizarse de forma rutinaria en los pacientes que tienen niveles de Tiroglobulina indetectables, ya que todos los pacientes que tienen anomalías radiológicas presentan niveles de Tiroglobulina elevados y las metástasis pulmonares habitualmente son pequeñas y múltiples y no se detectan en la radiología convencional, que no aprecia lesiones inferiores a 1 cm de diámetro⁸⁵. Por esto la rentabilidad de la prueba es muy baja y hoy día se excluye de la mayoría de los protocolos de seguimiento.

5.1.3 Rastreo corporales con I¹³¹

Junto con la detección de tiroglobulina sérica, el rastreo corporal total con I¹³¹ es el método de seguimiento de los pacientes con CDT más eficaz en la actualidad.

La dosis de I¹³¹ utilizada en los rastreos diagnósticos es de 2-5 mCi (74-185 MBq), ya que dosis superiores a estas pueden reducir la captación de una dosis terapéutica posterior, en el caso de que esta sea precisa. A esto último se le

denomina efecto “Stunning” o “Aturdimiento”⁸⁶. El resultado de los rastreos con I^{131} depende de la capacidad que tenga el tejido tiroideo tumoral para captar el radioyodo, para lo cual se precisan unos niveles de TSH elevados, definidos arbitrariamente como > 30 u/l. Se requiere pues la suspensión del tratamiento con LT4 durante 4-6 semanas o bien la sustitución de LT4 por Triyodotironina durante 3 semanas, suspendiéndola durante otras 2 semanas. La preparación para la realización del rastreo con I^{131} podría pues realizarse de 3 formas representadas en la Figura 2. En cualquiera de los 2 casos se precisa una situación de hipotiroidismo, la cual además de la mala tolerancia clínica, puede asociarse a un mayor crecimiento de las lesiones metastásicas debido a un prolongado periodo de hiperestimulación con TSH. Antes de realizar la exploración se ha de evitar el consumo de medicaciones que contengan yodo y alimentos ricos en yodo, y si existen dudas es conveniente evaluar niveles de yodo en orina. Ha de evitarse el embarazo en mujeres en edad fértil.

Se realiza el rastreo entre 48 y 72 horas después de administrar la dosis, utilizando una gammacámara de doble cabezal con colimador de alta energía. Es importante localizar todos los posibles focos de captación que puedan aparecer en el paciente. Cuando aparece captación en el cuello, es importante diferenciar entre metástasis linfáticas regionales y restos tiroideos normales, pues las primeras pueden requerir un nuevo procedimiento quirúrgico. En las captaciones óseas, el rastreo con radioyodo sirve de guía a otros métodos de localización, dado que puede detectar restos tumorales muy pequeños.

Los pacientes que presentan captación en el rastreo inicial y a los que se les administra una dosis de I^{131} generalmente superior a 100 mCi, pueden presentar en el rastreo postratamiento captación en alguna zona que no apareciera en el rastreo inicial con 2 a 5 mCi. Este hecho a llevado a plantearse la conveniencia de administrar a todos los pacientes dosis elevadas de I^{131} para localizar y tratar enfermedad residual no detectable con dosis inferiores. Sin embargo este tipo de actuación en el seguimiento del CDT no se lleva a cabo, por diferentes razones, entre ellas el riesgo de administrar elevadas dosis de I^{131} a pacientes que pueden estar libres de enfermedad, la posibilidad de otros tratamientos como la cirugía para

las metástasis linfáticas, y la escasa capacidad de concentrar radioyodo que presentan estas metástasis, lo que hace pensar que el tratamiento en ellas no sea efectivo.

Los falsos positivos son mínimos, y se relacionan más con circunstancias poco habituales, pero si son más frecuentes los falsos negativos, habiéndose descrito que sólo dos terceras partes de los pacientes con enfermedad metastásica, muestran captación en el rastreo corporal, esto se observa sobre todo en el caso de lesiones de pequeño tamaño⁸⁵. En este sentido, la complementariedad con la determinación sérica de Tiroglobulina es muy importante, pues por sí sola esta técnica no detecta a un elevado número de pacientes con enfermedad residual. La causa de estos falsos negativos no está aún determinada, aunque podría estar relacionada con alteraciones en la capacidad de captar I^{131} de algunos tumores poco diferenciados.

En los últimos años se ha podido obtener TSH mediante técnicas de ingeniería genética, con propiedades similares a la TSH nativa. El primer estudio fase I/II se publicó en 1994, y se aprobó su utilización en USA tras los resultados de 2 estudios multicéntricos internacionales. En el primero de ellos⁸⁷ se comprobó que los rastreos realizados tras 2 dosis de 0.9 mg de rTSH fueron equivalentes a los realizados en situación de hipotiroidismo en 66% de pacientes, superiores en el 5% e inferiores en el 29%, es decir se demostró que la administración de rTSH conseguía estimular la captación de I^{131} , pero su sensibilidad era menor que cuando se realizaba este en situación de hipotiroidismo. El segundo estudio⁸⁸ evalúa 2 regímenes de dosificación de rTSH (0.9 mg durante 2 días y 0.9 mg durante 3 días), compara resultados de rastreos y de niveles de Tg (en hipotiroidismo y con rTSH) y fue cuidadosamente estandarizado. No se encontraron diferencias entre las 2 dosis investigadas, los rastreos fueron concordantes en el 92%, comparando los niveles de Tg fueron detectables en el 52% tras rTSH y en el 56% en situación de hipotiroidismo. Si se combinan los resultados del rastreo y los niveles de Tg tras rTSH la tasa de detección de enfermedad fue del 94%. Ante estos resultados puede recomendarse de forma racional el uso de rTSH en el seguimiento de los pacientes con Carcinoma Papilar de tiroides, ya que: es efectiva para estimular captación de

l131 y producción de Tg; es bien tolerada, con mínimos efectos secundarios; mejora significativamente la calidad de vida, ya que evita el hipotiroidismo y potencialmente disminuye el riesgo de estimular el crecimiento tumoral, debido a la menor exposición a niveles elevados de TSH.

5.1.4 Determinación de los niveles de Tiroglobulina

La determinación de Tiroglobulina es actualmente el principal método del que disponemos para la detección precoz de enfermedad persistente y/o recurrente en el Carcinoma Papilar de tiroides.

Durante muchos años se pensó que era una proteína limitada al tiroides, pero desde que en 1940 Lerman⁸⁹ detectó tiroglobulina en sangre venosa en pacientes que habían sido sometidos a una tiroidectomía previamente, el papel que ha jugado en las enfermedades tiroideas en general y en el CDT en particular ha sido muy importante.

El gen de la Tiroglobulina se localiza en el cromosoma 8. Se trata de una glicoproteína de 660 kd, y su función es la de ser precursora de la síntesis de hormona tiroidea. Se produce sólo en las células foliculares tiroideas tanto normales, como neoplásicas. Puede estar elevada en Tirotoxicosis, en tiroiditis, en deficiencia de yodo, en adenomas benignos y en cáncer de tiroides⁹⁰, pero no es detectable en los pacientes tras tiroidectomía total y tratamiento ablativo con radioyodo.

Se pueden utilizar varios tipos de ensayos para la detección de Tiroglobulina, aunque todos tienen sus limitaciones. Los 4 ensayos actualmente disponibles son el RIA (ensayo radioinmunoanálisis) con anticuerpo único o doble, ELISA (ensayo inmunoenzimático), IRMA (ensayo inmunoradiométrico) e ICMA (Ensayo inmunoquimioluminiscente). La fiabilidad del ensayo depende de la especificidad del anticuerpo que utilizemos. En la actualidad el método más usado es el IRMA con anticuerpos monoclonales, uno de ellos marcado con un radioisótopo, con una sensibilidad para detectar niveles inferiores a entre 1 y 3 ng/ml. El límite de corte, que en teoría es el límite inferior de detección del ensayo

que se utilice, por razones prácticas es preferible que este basado en la experiencia de cada centro en particular⁹¹. La determinación de Tg tiene varias limitaciones:

1. - Presencia de anticuerpos antitiroglobulina, que se detectan en el 15-25% de los casos, cuando la determinación de Tg se hace mediante técnicas de RIA, método que tiende a sobreestimar el valor de la tiroglobulina, pero sólo en el 1% de los casos cuando la determinación es por método IRMA o ICMA, que tienden a infraestimar el valor en estas circunstancias. Se trata de un factor de confusión ensayo-independiente, por tanto la determinación de Tg siempre ha de acompañarse de la determinación de anticuerpos antiTg. El título de anticuerpos antitiroglobulina no está relacionado con la mayor o menor concentración de Tiroglobulina sérica y están compuestos de manera primaria por IgG, y en menor medida por IgM e IgA.

En el CDT habitualmente descienden gradualmente y desaparecen en los 2 años siguientes al tratamiento inicial, dado que desaparece el tejido diana, en este caso la Tiroglobulina, por lo que su persistencia o reaparición han de considerarse como sospecha de enfermedad recurrente^{90, 92}

2. - La producción de Tg tanto en el tejido tiroideo normal, como en el neoplásico, depende de la estimulación por la TSH, por lo que la interpretación del resultado siempre ha de evaluarse conjuntamente con los niveles de TSH. La sensibilidad de la Tg es mucho menor cuando se evalúa con niveles de TSH elevados, ya que aunque con el tratamiento sustitutivo el 98% de los pacientes considerados en remisión completa tiene niveles de Tg indetectables y prácticamente todos los pacientes con metástasis a distancia tienen niveles de Tg elevados, hay un 20% de pacientes con metástasis Ganglionares que tienen niveles de Tg normales. Al discontinuar la terapia con levotiroxina la sensibilidad del método se incrementa, a pesar de lo cual persisten indetectables en un 5% de pacientes con metástasis ganglionares⁶⁴. La cantidad de tejido neoplásico necesario para aumentar la Tiroglobulina sérica está aún por determinar. De manera global podemos decir que la sensibilidad para detectar cáncer de tiroides midiendo tiroglobulina después de retirar la hormona tiroidea es del 85%, pero baja por debajo del 50% con tratamiento supresor⁹³

3. – La existencia de la Tiroglobulina llamada “inmunológicamente inerte”. Se han encontrado variantes en los epítomos que expresa la Tiroglobulina sintetizada por los CDT, y esto puede alterar la detección analítica de la misma, detectando valores falsamente disminuidos.

4. – La variabilidad de los resultados obtenidos usando diferentes ensayos⁹⁰ e incluso la propia variedad intraensayo dificulta la cuantificación de los resultados. Para tratar de atajar este problema, se ha desarrollado un estándar internacional de Tiroglobulina sérica (CRM-457), aunque aún existen muchos métodos que no están estandarizados⁹⁴.

A pesar de estas limitaciones los niveles de Tg son un excelente indicador de pronóstico en los CDT, ya que el 99% de pacientes con niveles de Tg indetectables en situación de hipotiroidismo, permanecen en remisión clínica durante 20 años, mientras que aquellos que tienen cifras de Tg detectables, pero menores de 10 ng/ml tienen recurrencias en el 20% de los casos y con niveles de Tg >40 ng/ml se comprueba una tasa de recurrencias del 60-80%^{85,92}. Este valor pronóstico hace que la medición de los niveles de Tg sea de gran importancia para el manejo y las decisiones en el seguimiento a largo plazo de los pacientes, teniendo en cuenta además que es un método nada invasivo. La búsqueda de un valor de corte en los diferentes ensayos que nos diferencie enfermedad residual de curación es continua, pero actualmente se recomienda que cada centro tome el valor de corte que mejor se adapte a su medio. Lo que si podemos afirmar es que niveles de Tiroglobulina superiores a 3 ng/ml un año después de la intervención es un factor de riesgo independiente para la recurrencia tumoral.

Con respecto a la comparación con el rastreo con radioyodo, en un principio se pensó que con la determinación de tiroglobulina sería posible abandonar los rastreos como método de seguimiento en el CDT, pero posteriormente se ha demostrado que ambas exploraciones son complementarias y que, usándolas conjuntamente se mejoran los resultados individuales de cada una de las dos técnicas. Por otro lado es importante reseñar que ni la tiroglobulina predice el

resultado del rastreo con radioyodo, ni a la inversa, el rastreo la determinación de Tiroglobulina.

5.1.5 Otros estudios morfológicos

Pueden utilizarse en pacientes con alta probabilidad de enfermedad recurrente y/o metastásica, con niveles de Tg elevados y rastreos corporales con I131 en los que no se encuentra ninguna captación. No precisan suspensión del tratamiento con levotiroxina.

TAC y RMN: Ambas exploraciones pueden localizar lesiones en cuello, pulmón y huesos. Habitualmente son difíciles de interpretar en la región cervical, ya que está artefactada por la cirugía previa. Generalmente se utilizan para intentar visualizar anomalías detectadas en otros estudios isotópicos.

TECNECIO 99 SESTAMIBI Y TECNECIO TETRAFOSMINA: La sensibilidad de estos fármacos se ha descrito⁹⁵ es de un 80% para la detección de recidivas locales, habiéndose encontrado un 84% de concordancia entre esta exploración y los rastreos con I¹³¹. Puede ser pues de utilidad, con la limitación de la región mediastínica que no se visualiza adecuadamente debido a la captación miocárdica.

TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET): La Tomografía por emisión de positrones usando 18F-fluorodeoxiglucosa (FDG) es una técnica relativamente nueva que combina un excelente escáner, con un trazador radioactivo que tiene una buena biodistribución y alta afinidad por las células tumorales. No hay actualmente un consenso en cuanto al papel óptimo que puede jugar en el seguimiento del CDTPT. Sus dos potenciales aplicaciones serían la identificación del tumor en aquellos casos que tienen niveles de Tg elevada y rastreos con radioyodo negativo y completar estadiaje en aquellos tumores en los que conocemos el foco neoplásico, con el fin de planificar la posterior terapia. Hay varias publicaciones en los últimos años, que han sido evaluadas por Hooff⁹⁶, revisándose una serie de 14 publicaciones, todas ellas relativamente heterogéneas

en cuanto a indicaciones de PET y espectro de pacientes evaluados. Los datos se resumieron en 2 puntos:

- PET en casos de rastreo negativo con Tg elevada, con valores de Tg que son > 40ng/ml en 50% de los casos y mayores de 100 ng/ml en el 30%, pero se utilizaban diversos kits de Tg y se realizaban con niveles de TSH elevados y frenados. A pesar de esta heterogeneidad la capacidad de localización de tumor fue de 50-100% casos/estudio

- PET en casos de rastreo negativo, con niveles de Tg normales, sin que describiese en estos artículos la indicación de realización del estudio. El PET fue negativo en el 68% de los casos.

Todos los estudios presentaban el problema de la validación, es decir el tipo de "gold estándar" utilizado, por lo que los valores predictivos no son del todo comparables, considerándose que para la comparación se precisa o bien la histología o bien el seguimiento a largo plazo, como mínimo de 12 meses.

5.2 Protocolos de seguimiento

El manejo del carcinoma papilar en general y particularmente en lo que a seguimiento se refiere es muy variable. Según los datos de una encuesta realizada entre 300 miembros de la American Thyroid Association⁹⁷, durante el primer año tras el tratamiento inicial, el 59% de los clínicos revisaba al paciente cada 3 meses, el 34% cada 6 meses. Si no existía evidencia de enfermedad al año, el 50% seguían revisiones anuales y el 75% continuaban el seguimiento de forma indefinida. En cuanto a la forma de seguimiento el 51% realizaba rastreo corporal completo con I¹³¹ al año del tratamiento inicial y en el caso de que este fuese negativo, es decir sin datos de recidivas, el 18% no realizaba mas rastreos, el 82% continuaba realizando rastreos con un intervalo medio de 20 meses (6-60 meses), en general esta era la continuidad durante 1-2 años en el 36%, durante 3-5 años en el 35% y durante 6- más de 10 años en el 28%. Solo el 85% de los clínicos utilizaba los niveles de Tiroglobulina como marcador de actividad tumoral.

Por tanto aunque hay distintas corrientes de opinión, no hay en absoluto ningún consenso establecido en cuanto al seguimiento a largo plazo del carcinoma papilar de tiroides.

5.2.1.- Protocolo de seguimiento Clásico

Este protocolo es el que ha venido siendo utilizado y recogido en toda la bibliografía desde los años 70, de hecho al revisar los datos de la encuesta de 1996 el 82% de los endocrinólogos americanos seguían de una manera más o menos regular este protocolo.

Según este protocolo todos los pacientes tienen el mismo tipo de seguimiento, independientemente de los factores de riesgo pronóstico que tengan, es decir se continua con la realización de rastreos periódicos, cada 6-12 meses, hasta que tengan 2 rastreos continuados negativos y con niveles de Tg normales. El inconveniente fundamental es que más del 80% de pacientes están curados con el tratamiento inicial, por tanto esta estrategia de seguimiento tiene un bajo rendimiento diagnóstico, considerables molestias derivadas de la suspensión del tratamiento para los pacientes y se aumenta la dosis acumulativa de radiación. No tiene en cuenta los factores pronóstico de riesgo, hoy en día bien establecidos (Tabla 1), según los que posiblemente tenga que individualizarse el tipo de seguimiento y por último no considera el valor que actualmente tiene la Tg como principal marcador tumoral de recidiva.

5.2.2 Otros protocolos de seguimiento:

5.2.2.1 Según factores pronóstico

Este segundo protocolo ha sido sugerido por el grupo francés e italiano (Schlumberger y Pacini)⁶⁴ y evalúa fundamentalmente los niveles de Tg, según los cuales establece en caso de rastreo corporal con I¹³¹ 3 grupos:

- Tg indetectable (< 1ng/ml)
- Mínimamente elevada (1-10 ng/ml)
- Claramente elevada (>10 ng/ml).

Cuando la Tg es indetectable estos autores sugieren continuar el seguimiento de forma anual, solo con determinaciones de Tg sin suspensión del tratamiento sustitutivo. Cuando la Tg está poco elevada sugieren que sólo en casos de pacientes de alto riesgo se realicen rastreos periódicos y determinación de Tg suspendiendo el tratamiento con levotiroxina. Se basan en que el rendimiento de los rastreos rutinarios es bajo, ya que en un 90% de los casos se consigue la ablación completa, y que en el caso de que existan focos tumorales se detectan de forma más precoz con la determinación de Tg.

El principal punto conflictivo de este protocolo es el tratamiento de forma empírica con dosis elevadas de I^{131} en aquellos casos de Tg elevada y rastreo con 2-5 mCi negativo. Hay 3 grupos que han publicado datos de este tipo de actuación, Pacini en 1987⁹⁸ y 2001⁹⁹, Schlumberger en 1988 y 1997 y Pineda en 1995¹⁰⁰. En todos ellos tras la administración de dosis elevadas de I^{131} la localización de metástasis ha sido del 60-90%, y se ha conseguido disminuir los niveles de Tg en la mayoría de los casos, aunque generalmente no por debajo de 5 ng/ml. La principal crítica a este tipo de actitud es que no se ha demostrado una menor mortalidad tras este tipo de terapia, frente a la postura más convencional intentando localizar las lesiones por otras técnicas de imagen, mientras que existe el teórico riesgo derivado de la utilización de dosis elevadas de radioyodo¹⁰¹. De hecho en una reciente publicación de Pacini⁹⁹ la evolución a largo plazo de un grupo de pacientes tratados, frente un grupo de pacientes no tratados, aun no siendo un estudio randomizado, no encuentra diferencias entre ambos grupos, ya que la Tg disminuye en los tratados, pero también lo hace en los no tratados de manera espontánea. En estos últimos tras un periodo de seguimiento de 12 años la Tg se hizo indetectable en el 68% de los casos, disminuyó significativamente en el 21% y no cambio o se incremento en el 11% de casos.

5.2.2.2 Con TSH-R y determinación de tiroglobulina

En los últimos años algunos autores europeos, concretamente el grupo francés liderado por Schlumberger y el grupo Italiano liderado por Pacini, proponen un protocolo de seguimiento en el que se obvia la realización del rastreo corporal con I¹³¹ al año del tratamiento inicial, basándose en que en más del 90% de estos rastreos son negativos y que rara vez se detectan focos de captación¹⁰². En este protocolo la evaluación anual se realiza mediante la determinación de Tg tras administración de TSH-R y en función de los resultados se plantea posteriormente la realización de rastreo corporal total con I¹³¹, suspendiendo el tratamiento con Levotiroxina, solo en aquellos casos en los que la Tg este elevada.

Este planteamiento se basa en datos publicados por estos autores¹⁰³ evaluando un grupo de 256 pacientes, a los que se les realizó un rastreo corporal a los 6-12 meses de la terapia inicial, comprobándose que no existía ninguna captación en el 92% de los casos (236), en 20 pacientes se observó mínima captación en lecho tiroideo no valorable y solo en 1 caso la captación en lecho tiroideo fue superior al 1%. En el mismo grupo de pacientes los niveles de Tg fueron indetectables en el 82% (210), entre 1-10 ng/ml en 31 pacientes y > 10 ng/ml en 15 pacientes. No existía relación entre los niveles de Tg y la captación en lecho tiroideo. Con estos datos postulan que el rastreo rutinario al año del tratamiento solo es de utilidad para demostrar la existencia de la ablación completa y que esta exploración tiene un alto valor predictivo negativo, siendo la determinación de Tg mucho más sensible para detectar enfermedad persistente o recurrente y por tanto tiene un mayor significado pronóstico.

Por otra parte estos mismos autores⁹² consideran que los niveles de Tg indetectables en situación de hipotiroidismo son un fuerte indicador de curación, ya que sólo 2 de 210 pacientes (0.9%) en esta situación presentan recidivas a largo plazo (más de 3 años). Los datos de Pacini¹⁰⁴ de un grupo de 315 pacientes son similares, observando una recurrencia de 0.6% a los 12 años de seguimiento en aquellos casos de Tg en el 1º rastreo < 3 ng/ml.

Desde 1994 se han publicado los primeros estudios clínicos de utilización de TSH-R, en los que se evaluó en primer lugar (Fase I/II) sólo los resultados en cuanto a los rastreos corporales con I 131. La fase III, en un estudio multicéntrico que recogía datos de 11 centros de USA y 3 centros Europeos (Francia, Italia y Alemania) se diseñó ya para recoger los resultados de Tg tras TSH-R, evaluándose un total de 229 pacientes a los que se les determinaba Tg tras TSH-R y en situación de hipotiroidismo. Se confirmó la sensibilidad de la Tg tras TSH-R, que fue superior a 2 ng/ml en 52% de pacientes con captación en lecho tiroideo, frente al 56% en situación de hipotiroidismo, fue superior a 2 ng/ml en el 100% de los pacientes con enfermedad metastásica versus 100% en situación de hipotiroidismo¹⁰⁵.

Estudios posteriores han confirmado estos datos¹⁰⁶ y de hecho existe un grupo de investigación denominado "Grupo de investigadores de Tg estimulada por TSH-R" que han presentado sus datos en el Congreso Internacional de Cáncer de Tiroides celebrado en Varsovia en Noviembre 2000.

Por ello se plantea actualmente este protocolo de seguimiento, que en principio sería más rápido, más confortable para el paciente y probablemente más barato, si se tienen en cuenta los costes sociales derivados de la situación de hipotiroidismo.

ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL (EMR)

La primera publicación sobre Células Tumorales Circulantes (CTC) se atribuye a Ashworth quien, en 1869, comunicó un caso de cáncer en el cual células similares a las del tumor original se encontraron en sangre del paciente después de su muerte¹⁰⁷. Hasta 1955, sólo ocasionalmente se describen en la literatura casos que hagan referencia a este aspecto, y fue en ese año cuando Engell publicó la detección de CTC en pacientes con cáncer avanzado¹⁰⁸, usando técnicas de bloques celulares. Este estudio generó un gran entusiasmo en la comunidad científica¹⁰⁹ y en los 10 años sucesivos miles de pacientes con cáncer fueron evaluados para CTC por más de 40 grupos de investigación, usando más de 20 métodos citológicos diferentes. Los estudios iniciales demostraban una alta tasa de detección de CTC entre los pacientes con cáncer, cercana al 100%¹⁰⁹, sin embargo pronto estos resultados se comenzaron a interpretar como falsos positivos de la técnica ya que algunas células hematopoyéticas, fundamentalmente los megacariocitos, se confundían con frecuencia con células tumorales. Una vez las técnicas de conservación de las células mejoraron y comenzó a ser posible un mejor análisis morfológico de las mismas, la detección de CTC por técnicas de microscopía demostró tener una sensibilidad muy baja, en torno al 1%, en pacientes con cáncer. A la vista de estos resultados, la detección rutinaria por microscopía de CTC se abandonó completamente.

La detección de CTC y micrometástasis resurgió 20 años después gracias a los avances en la inmunohistoquímica, pues se desarrollaron tests muy sensibles para la detección en médula ósea y en sangre periférica de células tumorales de pacientes con neuroblastoma, carcinoma de próstata y carcinoma pulmonar^{110,111,112}. Estos test permitían identificar enfermedad de la médula ósea con más sensibilidad que las técnicas convencionales¹¹¹. Estas técnicas inmunocitológicas permitían detectar una sola célula tumoral entre 10000 o 100000 células mononucleares. A pesar del valor pronóstico de estas determinaciones^{113,114} la detección de micrometástasis por técnicas de inmunohistoquímica no comenzó a

utilizarse de manera rutinaria en los protocolos de seguimiento de los cánceres, probablemente debido a una combinación de factores, tales como la ausencia de relevancia clínica en algunos estudios^{115, 116, 117}, la pérdida de la expresión del antígeno en tumores poco diferenciados, la positividad antigénica en algunas células no epiteliales¹¹⁸ y el deseo de encontrar un mejor método para la detección de tumores ocultos usando el análisis de DNA y RNA.

La aparición a finales de los 80 de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) altamente sensible ha facilitado enormemente la detección de CTC y micrometástasis. Desde 1987 se han desarrollado una gran variedad de técnicas basadas en la PCR para la detección de CTC en Leucemia, linfoma, melanoma, neuroblastoma y otros diferentes tipos de carcinomas^{119, 120, 121}.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La PCR es un método que, in vitro, amplifica enzimáticamente una secuencia específica de DNA usando unos cebadores que definen la región de interés a amplificar en el DNA¹²². El procedimiento consta de una serie de ciclos repetidos al final de los cuales se obtienen copias en cantidades muy importantes del fragmento elegido para copiar. La PCR también puede realizarse a partir de RNA, y este procedimiento que se conoce como transcripción inversa (RT-PCR), es similar al que se realiza partiendo de DNA como material, pero precedido por la transcripción del RNA en DNA complementario (cDNA).

Una de las mejores estrategias para la detección de CTC es la amplificación mediante PCR de anomalías presentes en el DNA o en el RNA mensajero (RNAm) de la célula tumoral. Esta técnica es muy usada para la detección de enfermedad mínima residual en neoplasias hematológicas.

La otra estrategia más usada para la detección de enfermedad mínima residual se basa en la amplificación de RNAm específico de tejido mediante la RT-PCR. Esta técnica se ha usado fundamentalmente en micrometástasis de los tumores sólidos.

A pesar de su bondad la técnica de PCR tiene una serie de limitaciones que son:

1) Falsos positivos: Se deben a la extremada sensibilidad de la técnica, que en algunas publicaciones alcanza a discriminar 1 célula tumoral diluida en hasta 10 millones de células tumorales¹²³. Para evitar estos falsos positivos es importante en primer lugar tomar todas las precauciones para prevenir la contaminación de las muestras e incluir un control negativo en la PCR para monitorizar esta posibilidad. Estos falsos positivos también pueden ser causados por la llamada transcripción ilegítima (transcripción de cualquier gen por cualquier célula), dado que a pesar de la escasa cantidad de transcripciones que hay en células inapropiadas¹²⁴, la elevada sensibilidad de la RT-PCR hace que pueda aparecer el error. Para evitarlo es importante optimizar las condiciones de la PCR, de forma que si existe este fenómeno, no se amplifique la secuencia errónea.

2) Falsos negativos: debido a la presencia de inhibidores en algunos tejidos específicos, que pueden disminuir la sensibilidad del método y llevar a resultados erróneos. Para evitarlo es importante cerciorarse de que las muestras que incluimos en la PCR a estudio son viables para ser amplificadas, lo que se hace realizando previamente una PCR con las mismas muestras para Actina o B₂Microglobulina, marcadores presentes en todas las muestras. Estos inhibidores pueden estar presentes tanto en el ambiente como en los fluidos corporales, por lo que las medidas empleadas para evitar la contaminación también son aplicables para evitar el contacto de la muestra con estos inhibidores. Por otro lado errores en la realización de la técnica también pueden llevar a falsos negativos, por lo que la inclusión de un control positivo para la secuencia que estamos analizando puede solventar este problema.

A pesar de los falsos positivos y negativos de la técnica, la PCR ha demostrado ser superior a las técnicas convencionales en detectar CTC y micrometástasis en neoplasias hematológicas y tumores sólidos epiteliales¹²⁵.

Aparte, la presencia de enfermedad mínima residual no implica necesariamente el desarrollo de enfermedad metastásica clínicamente detectable.

Una gran mayoría de las células que pasan al torrente sanguíneo se destruyen por mecanismos mecánicos, inmunológicos o de otro tipo¹²⁶. Sin embargo, como postuló Weiss, la ineficiencia total de estas micrometástasis rara vez es completa, y las metástasis son la principal causa de muerte en los pacientes con cáncer.

En la década de los 90, diferentes estudios han demostrado que la detección por PCR de enfermedad mínima residual tiene importancia pronóstica en algunos tumores sólidos como próstata^{127, 128} y melanoma^{129, 130}, sin embargo no está aún totalmente aclarado si la positividad de la PCR predice de manera independiente la evolución en diferentes tipos de tumores sólidos. Si la correlación entre la presencia de enfermedad mínima residual detectada por PCR y el pronóstico de recurrencia y muerte de los diferentes tumores se establece definitivamente, esta técnica tendrá un mayor impacto en los algoritmos de tratamiento de muchos tumores sólidos. Los pacientes podrían ser tratados como si presentaran enfermedad metastásica, sin presentar aún los síntomas clínicos de la misma y cuando el potencial curativo de la terapia podría ser mayor¹³¹. Por otro lado estas técnicas podrían facilitar el estadiaje preoperatorio de algunas neoplasias epiteliales, por ejemplo próstata, y evitar procedimientos quirúrgicos radicales en pacientes que no lo precisaran. Por último esta técnica puede ser útil en la monitorización de la efectividad del tratamiento empleado y de la intensidad y duración del mismo que cada paciente requiera. La detección de enfermedad mínima residual mediante técnicas de PCR tiene un potencial muy importante para ser un punto clave en el diagnóstico, estadiaje y monitorización del tratamiento en pacientes con tumores sólidos.

ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL Y CDT

La aplicación de las técnicas de detección de enfermedad mínima residual a los CDT tiene una historia muy recortada en el tiempo. Las condiciones que hacen a esta neoplasia ser candidata a beneficiarse de esta técnica son varias: en primer lugar se trata de un tumor sólido, derivado del epitelio folicular tiroideo, lo que lo hace especialmente sensible a la detección de células circulantes por el torrente sanguíneo. En segundo lugar es una neoplasia que a pesar de no tener una gran incidencia, su prevalencia si es elevada dado su escasa mortalidad y en tercer lugar tiene una tasa de recurrencia, que oscila entre el 20 y el 30%, por lo que la necesidad de seguimiento se establece para toda la vida.

Otro factor importante que hace del CDT un buen candidato a beneficiarse del uso de la RT-PCR para la detección de enfermedad mínima residual es el hecho de que actualmente el seguimiento de este tipo de tumor se basa fundamentalmente en los rastreos periódicos con I^{131} y la determinación de tiroglobulina sérica, técnicas ambas que precisan de la estimulación de la TSH para aumentar su sensibilidad, por lo que es preciso someter al paciente a una situación de hipotiroidismo con las molestias de ello derivadas. Por otra parte la presencia de anticuerpos anti-Tiroglobulina, invalidan la determinación de tiroglobulina cuando están circulantes, lo que anula su valor como marcador tumoral.

Fue Ditkoff en 1997, el primero que planteó la posibilidad de la detección de células tiroideas circulantes en sangre periférica¹³². El propósito de su estudio fue la identificación de ARNm de tiroglobulina en sangre periférica, en pacientes intervenidos de algún tipo de patología tiroidea, comparando posteriormente los resultados con el estadio clínico de dicha patología. Su hipótesis de partida era que los pacientes con carcinoma tiroideo metastático tendrían células tiroideas circulantes mientras que los pacientes sin carcinoma tiroideo no los tendrían. Para comprobar esto utilizó un grupo de 100 pacientes (9 con CDT y metástasis conocidas, 78 con CDT pero sin evidencia de enfermedad metastásica y 6 con bocios multinodulares no tóxicos) que habían previamente sido sometidos a

cirugía, incluyéndose también 7 voluntarios sanos. El autor no especifica el tipo de cirugía, salvo en los casos de enfermedad metastásica, a los que se les realizó tiroidectomía completa ni la aplicación o no de I^{131} para ablación de restos. A todos se les extrajo 5 ml de sangre venosa que fue posteriormente procesada hasta realizar una RT-PCR con 35 ciclos de un minuto a 94 °C, realizados después de la desnaturalización durante 5 minutos a 95 °C. La RT-PCR finalizaba con 2 minutos a 58 °C y 3 a 72 °C.

Dikoff y su grupo consiguieron detectar tiroglobulina como un fragmento amplificado de 529 pares de bases en líneas celulares de tiroides humano, en tejido tiroideo humano y en sangre periférica de los pacientes con enfermedad metastásica (9 de 9), no detectándose en sangre periférica de los pacientes con enfermedades tiroideas benignas, ni en los 7 voluntarios sanos. En los pacientes con CDT pero sin enfermedad metastásica aparente se detectó ARNm de tiroglobulina en 7 de los 78 casos.

Como defectos de este estudio, el mismo autor señala la no existencia de determinación de Tiroglobulina plasmática de todos los pacientes, la escasa homogeneización de la muestra, pues no se conocía si los pacientes estaban en situación de hipotiroidismo o con TSH suprimida y la no realización de rastreo con I^{131} de manera rutinaria. Su sensibilidad para detectar ARNm de Tiroglobulina fue de 20 células por mililitro de sangre. En la discusión, los autores plantean la posibilidad de que los pacientes que presentaron ARNm de tiroglobulina positivo sin la aparente presencia de metástasis, pudieran desarrollarla en un futuro, dado las características de indolencia y crecimiento lento de estos tumores.

Un año más tarde Tallini y su grupo comunicaron los resultados obtenidos estudiando 58 muestras tomadas de 44 pacientes, de los cuales 24 eran CDT, 5 adenomas tiroideos y 15 hiperplasias nodulares, en las que se estudió la existencia de ARNm para TG¹³³. En este estudio, al igual que ocurre en el anterior, las muestras no se tomaron en situación de TSH elevada. En cuanto al método de detección, la RT-PCR que realizaron constaba de 22 ciclos de amplificación (95 °C/45 segundos, 55 °C 45 segundos y 42 °C/ 1 minuto), habiendo previamente

realizado un comienzo en caliente (3 minutos a 98 °C) y 8 ciclos de amplificación a temperaturas que iban descendiendo progresivamente de 63 a 55 °C. Los productos de la RT-PCR eran posteriormente sometidos a electroforesis y vistos en un gel de agarosa o después de un Southern Blot, hibridando con una sonda interna marcada.

No se detectó positividad para RNAm de Tiroglobulina en ninguno de los controles sanos, pero sí en 2 de las 17 muestras recogidas de pacientes con nódulos tiroideos benignos. En cuanto a los pacientes con CDT (24) se encontró positividad en las muestras en 13 de ellos (54,2%), incluyendo a 5 pacientes que no presentaban evidencia clínica de enfermedad metastásica, aunque 4 de estos 5 pacientes sí habían presentado metástasis linfáticas previamente. Sólo en 18 pacientes se obtuvieron los valores de Tiroglobulina sérica y en estos no se encontró correlación entre RNAm de Tiroglobulina y niveles de Tiroglobulina sérica. Tampoco se correlacionó la positividad de la prueba con el estadiaje tumoral, ni con la histología. En la discusión los autores remarcan la positividad de 2 pacientes sin carcinoma tiroideo y la negatividad de la técnica en 4 pacientes con carcinoma papilar y enfermedad metastásica clínicamente probada. También discuten el hecho de que si se aumentan excesivamente el número de ciclos de la RT-PCR esta podría presentar un mayor número de falsos positivos, bien por la expresión anómala de una variedad de genes en distintas células, o bien por el fenómeno de la transcripción ilegítima.

Han sido Ringel y su grupo quienes han aportado más luz a este tipo de ensayos. En su trabajo inicial¹³⁴ exponen los resultados de un ensayo con RT-PCR para RNAm de Tiroglobulina en sangre de 77 pacientes con CDT tratados mediante tiroidectomía total y ablación de restos con radioyodo, y comparándolo con los resultados obtenidos simultáneamente en un inmunoensayo para Tiroglobulina en sangre durante el tratamiento supresor con TSH, y durante el rastreo corporal total, realizado tras la supresión del tratamiento con Levotiroxina.

El método de PCR utilizado por este grupo varía con los previamente presentados fundamentalmente en 3 puntos: el primero es que la muestra de la que

se extrae el ARN es sangre total, a diferencia de Tallini y su grupo que lo hacían de plasma, pues Ringel expone en que cuando trataban de reproducir sus resultados con este material no lo conseguían. En segundo lugar el mayor número de ciclos de RT-PCR que se practicaban. La RT-PCR de Ringel consistía en realizar tras una desnaturalización de 4 minutos a 95 °C, 39 ciclos formados por 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C y 1 minuto a 72 °C. Para terminar la técnica se mantenían las muestras 4 minutos a 72 °C. El número de ciclos realizados era mayor que el de los otros trabajos, así como los tiempos diferentes. El producto de estos 39 ciclos era un producto de 348 pares de bases, tal y como se preveía para la secuencia de Tiroglobulina. En tercer lugar la hibridación con sonda interna marcada con radioactividad le permitió una mayor capacidad de detectar positivos. En base a estos 3 puntos parece que la RT-PCR realizada por ese grupo era más sensible que las previas, llegando a detectar hasta 10 célula tiroideas normales en 1 ml de sangre total¹³⁴ .

En cuanto a sus resultados es importante reseñar varias circunstancias: Ringel detectó ARNm de tiroglobulina en los 14 pacientes con enfermedad metastásica durante la terapia supresiva con hormona tiroidea, mientras que la Tiroglobulina sérica se detectó por inmunoensayo en sólo 6 de estos pacientes. De los 19 pacientes con captación en el rastreo compatible con restos en el lecho tiroideo, el ARNm de Tiroglobulina se detectó en 12 casos (63%) mientras la Tiroglobulina sérica sólo en 3 de ellos (16%). En cuanto a los pacientes con rastreo negativo, un total de 35, 7 resultaron positivos para ARNm de Tiroglobulina, mientras sólo 3 para tiroglobulina sérica. Los pacientes controles sin carcinoma tiroideo, resultaron positivos para la prueba a diferencia de lo ocurrido en los trabajos anteriores.

Ringel postula que los controles normales tienen una pequeña cantidad de células tiroideas en sangre, y esta pequeña cantidad se detecta con su técnica y no con las otras ya que tiene mayor sensibilidad. Cuando se evalúa a un paciente tiroidectomizado y sin restos tiroideos tras la ablación con radioyodo, el ARNm de Tiroglobulina resulta negativo. En cuanto a los carcinomas sin metástasis evidentes que muestran positividad para ARNm, se plantea la posibilidad de que aún

presenten células circulantes, aunque no se conoce cual sería la significación clínica de este hecho.

Evalúa también en este estudio a 7 pacientes durante terapia supresiva con hormona tiroidea, 2 de los cuales con rastreo negativo y uno con restos en el lecho tiroideo que resultaban negativos con TSH elevada se positivizan, al igual que se positiviza la tiroglobulina sérica en 1 de ellos. En cuanto a los que presentaban rastreo positivo y ARNm de Tiroglobulina positivo en situación de hipotiroidismo, mantienen esa positividad, apreciándose como la tiroglobulina sérica aumenta en 2 de ellos en los que era negativa en situación de TSH frenada.

A raíz de estos resultados en el trabajo Ringel descarta la posibilidad apuntada por Tallini de la transcripción ilegítima, proponiendo la detección de ARNm de Tiroglobulina como una técnica más precisa para conocer la existencia de tejido tiroideo residual o metastático que la tiroglobulina sérica, sobre todo en pacientes durante el tratamiento supresor con hormona tiroidea o en aquellos que tienen anticuerpos anti-Tiroglobulina positivos.

Haber¹³⁵ propone establecer un método que permita cuantificar la cantidad de ARNm de Tiroglobulina presente en sangre periférica de los pacientes, así como correlacionar estos resultados con la Tiroglobulina durante la fase de estimulación con TSH. A la primera cuestión contesta el propio Ringel en otro artículo publicado en 1999 y en el que expone un método cuantitativo para la detección de ARNm de Tiroglobulina en sangre periférica¹³⁶. Este método consiste en una RT-PCR usando técnicas de fluorescencia que sólo se positiviza cuando se replica el ARNm de Tiroglobulina y permite cuantificarlo.

Ringel aporta los resultados obtenidos evaluando 107 pacientes con Carcinoma Diferenciado Tiroideo, incluyendo a 23 con anticuerpos anti-Tiroglobulina positivos y 10 controles sanos. De estos 107 pacientes, 84 se evaluaron durante supresión de tiroxina, 14 se evaluaron tras la suspensión del tratamiento, es decir con TSH elevada y 9 se evaluaron en ambas circunstancias. Como primer resultado, los pacientes con rastreo negativo tenían menores niveles circulantes de RNAm de

Tiroglobulina, que aquellos con restos en el lecho tiroideo y que aquellos con metástasis. También los sujetos normales presentaban niveles circulantes de ARNm de Tiroglobulina. No se pudo establecer por ser un número escaso de muestras, una correlación entre la positividad de la prueba y el estadio clínico. En los 9 pacientes que se evaluaron con y sin terapia supresora con levotiroxina, se observó que la cuantificación de ARNm de Tiroglobulina era mayor cuando se sometía a estimulación con TSH que cuando esta estaba frenada, por lo que se mantiene la importancia de la estimulación con TSH, para detectar recurrencia en estos tumores.

Se demuestra en este estudio como tanto el ARNm de Tiroglobulina como la detección de tiroglobulina sérica, correlacionan con la presencia de tejido residual o metástasis en los pacientes, aunque la primera técnica presentaba una mayor sensibilidad. Cuando se estudiaba a los pacientes mientras tomaban levotiroxina, la detección de Tiroglobulina sérica no conseguía diferenciar a los pacientes que presentaban rastreos negativos de los que presentaban restos en el lecho tiroideo, aunque sí débilmente de los que presentaban metástasis a distancia. La detección de ARNm de Tiroglobulina sí conseguía una diferencia importante entre los 2 grupos. También muestran 5 pacientes con rastreo negativo, ARNm de Tiroglobulina negativo, pero tiroglobulina sérica positiva, aunque con valores poco expresivos. Por último 2 pacientes con metástasis presentaban tiroglobulina sérica positiva con ARNm de Tiroglobulina negativo.

Por tanto se postula la complementariedad de estos métodos, dado que estos tumores pueden secretar Tiroglobulina anómala y, mientras que un método evalúa la cantidad de células circulantes, el otro evalúa la secreción de proteínas por estos tumores. En los pacientes con anticuerpos elevados contra la tiroglobulina sérica, el método mostró unos resultados similares a los presentados en pacientes sin este factor de confusión. Se defiende el uso de este método sobre todo en los pacientes con anticuerpos elevados, se propone la posibilidad de combinarlo con TSH recombinante para el seguimiento de este tipo de tumores y se confirma la existencia de células tiroideas circulantes en pacientes normales, así como el aumento en la expresión de ARNm de Tiroglobulina en los pacientes en los que se realiza la técnica en situación de TSH suprimida y posteriormente elevada, lo que

implica una mayor utilidad de la técnica con TSH elevada. Tampoco aquí se establece una correlación entre los pacientes que presentan rastreo negativo, y positividad de la prueba y la existencia de metástasis previas o posteriores y indica la necesidad de ensayos para aclarar este punto.

El cuarto grupo que ha realizado un estudio sobre la utilidad de la detección de enfermedad mínima residual en CDT es el grupo brasileño de Biscolla¹³⁷, que publicó su trabajo en el año 2000. La diferencia fundamental con el trabajo de Ringel es el método de detección, y concretamente la RT-PCR, pues utiliza un modelo de Nested RT-PCR. El modelo consistió en una fase inicial de 5 minutos a 94 °C, seguida de 25 ciclos compuestos de 45 segundos a 94 °C, 90 segundos a 60 °C y 2 minutos a 72 °C. Después de esta fase una décima parte del producto de PCR se usaba para la fase de reamplificación que consistía en 20 ciclos más. En cuanto a resultados, no diferían mucho de lo publicado anteriormente. De las 34 muestras de pacientes empleadas, 2 de los 3 correspondientes a carcinomas tiroideos con metástasis conocidas resultaron tener ARNm de Tiroglobulina detectable. El tercer paciente resultó negativo tanto para ARNm de Tiroglobulina, como para tiroglobulina sérica, sin encontrar una razón aparente, tal y como ocurría en los estudios de Tallini¹³³ y Ringel¹³⁴. Cinco de los 8 pacientes con restos en el lecho tiroideo resultaron positivos para el test, y 7 de los 23 pacientes con rastreos negativos también resultaron positivos. Este grupo confirmó la existencia de metástasis en 3 de estos pacientes mediante ecografía tiroidea y posterior PAAF de las lesiones encontradas. Defienden una mayor sensibilidad de la técnica de ARNm de Tiroglobulina para detectar recurrencia de Carcinoma Diferenciado de Tiroides, si se compara con tiroglobulina sérica e incluso con el rastreo con radioyodo. Discute la posibilidad de transcripción ilegítima como causa de la positividad en pacientes aparentemente libre de metástasis y comunica sus resultados con la detección del ARNm del gen transportador de sodio y yodo, que son francamente peores que los de ARNm de Tiroglobulina.

Posteriormente a estos 4 trabajos que abogan por la utilización de las técnicas de enfermedad mínima residual en CDT mediante la RT-PCR, se publicaron otros 3 que ponían en cuestión la utilidad de la técnica. El primero de

ellos realizado por un grupo Alemán¹³⁸ realizó determinación de ARNm de Tiroglobulina en más de 200 pacientes mediante 2 RT-PCR diferentes, una de 30 ciclos y otra de 40, mostrando diferentes resultados en función de si se usaba una u otra. Mientras con el primer modelo se detectaba ARNm de Tiroglobulina en 9 de 13 pacientes con metástasis, 63 de 137 con CDT sin apariencia clínica de metástasis, 21 de 85 pacientes con enfermedad tiroidea no cancerosa y 9 de 50 controles, con el segundo modelo los resultados eran de 11 de 13 en pacientes con metástasis, 111 de 137 pacientes con carcinoma tiroideo y sin metástasis, 61 de 85 con enfermedad tiroidea no cancerosa y 41 de 50 controles. Concluye que la RT-PCR de alta sensibilidad, como llama a la de 40 ciclos, se acompaña de una menor especificidad a la hora de predecir recurrencia del tumor. Plantea la necesidad de estandarizar los métodos para evitar falsos positivos, plantea el significado de los resultados obtenidos con la RT-PCR de alta sensibilidad y de nuevo expone la necesidad de estudios a largo plazo que nos den luz sobre el significado clínico o no de la presencia de células tiroideas circulantes en pacientes intervenidos y tratados con radioyodo por presentar un carcinoma tiroideo.

Los otros dos artículos que discute la utilidad del método son el de un grupo Portugués¹³⁹ y el de un grupo Japonés¹⁴⁰. El primero estudia 10 controles normales y 10 pacientes intervenidos de tiroides por otro motivo no tumoral y obtiene resultados positivos en todas las muestras, en base a lo cual concluye que las propias células sanguíneas pueden expresar ARNm de Tiroglobulina. Este estudio, sin embargo, no detalla el número de ciclos de RT-PCR usados y, lo que es más importante, no tiene en cuenta que ninguno de sus pacientes habían sido sometidos a tratamiento ablativo con radioyodo, por lo que la presencia de tejido tiroideo residual era segura. Lo mismo podemos decir del grupo Japonés, que analiza pacientes no sometidos a ablación con radioyodo y también encuentra positividad en todas las muestras. Los hallazgos de estos dos trabajos no hace sino confirmar los datos de Ringel¹³⁴. ya que el encontró positividad en todos los controles, y sólo encontró negativos en los previamente tratados con radioyodo.

El último artículo publicado hasta el momento en esta línea de trabajo ha sido el de el grupo Italiano de Bellantone¹⁴¹ en el que se encuentra

incluido Tallini, que ya comunicó su experiencia en 1997. Este grupo evaluó un total de 66 pacientes en situación de hipotiroidismo, con TSH elevada. El método de RT-PCR utilizado fue una Nested RT-PCR muy parecida a la utilizada por el grupo brasileño¹³⁷. En cuanto a los resultados, sólo 1 de los 5 pacientes estudiados que presentaban enfermedad metastásica conocida fue positivo para RNAm de Tiroglobulina, así como 7 de 36 con rastreo positivo en el lecho tiroideo y 6 de 30 pacientes con ausencia de captación en el rastreo.

Sus resultados son por tanto mucho peores que los obtenidos por otros grupos y, según ellos, la técnica resulta menos sensible que la Tiroglobulina sérica. Sin embargo cuando evalúan las características histológicas del tumor, observaron que la técnica siempre resultaba negativa en los tumores Foliculares, y que si se excluían estos del grupo los resultados en tumores Papilares Convencionales eran mejores que los de otros grupos, y similares en cuanto a sensibilidad a la Tiroglobulina sérica. Este hecho no había sido observado por otros grupos que si encontraban positividad en esta variedad de CDT. También correlacionan la positividad de los resultados con los niveles de tiroglobulina, alcanzando una alta correlación sin llegar a ser positiva y con la existencia o no de metástasis, donde sin alcanzar significación estadística si parecer haber una mayor proporción de positivos en el grupo con enfermedad metastásica actual o pasada, que en el aparentemente libre de enfermedad.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El CDT, que incluye al Carcinoma Papilar y al Carcinoma Folicular de tiroides, supone más del 90% de los tumores tiroideos², que son la neoplasia de origen endocrinológico más frecuente¹. A pesar de que su incidencia no es excesivamente elevada, su prevalencia sí que lo es, debido a su bajo índice de mortalidad⁶.

Teniendo en cuenta la elevada tasa de recurrencias, cifrada en torno al 20-30%⁵, el seguimiento de este grupo de pacientes ha de realizarse durante un largo periodo de tiempo, por lo que la optimización del mismo supondría un beneficio evidente. En la actualidad las técnicas usadas son fundamentalmente el rastreo con radioyodo y la determinación de tiroglobulina sérica⁵. Estas dos técnicas tienen el inconveniente de precisar para su utilización en condiciones óptimas la supresión del tratamiento con levotiroxina, determinando la aparición de síntomas de hipotiroidismo, además del posible crecimiento tumoral. Por otra parte, la presencia de anticuerpos anti-tiroglobulina que pueden invalidar la determinación de esta en sangre del paciente⁹². Además los diferentes protocolos de seguimiento tratan de manera homogénea a todos los pacientes, realizando toda la batería de pruebas sin estratificar por factores de riesgo o presencia o no de recidiva previamente.

Las técnicas de detección de enfermedad mínima residual en sangre periférica se han venido utilizando hace poco tiempo en determinadas neoplasias de origen hematológico y tumores epiteliales sólidos para estratificar el riesgo de recidiva de estos pacientes y someterlos a unas técnicas diagnósticas o terapéuticas diferentes¹²⁵.

En los últimos años diferentes trabajos han establecido la posibilidad de la detección de ARNm de Tiroglobulina en sangre periférica de pacientes con CDT^{132,133,134,136,137,141}. Esta técnica según los autores podría obviar los problemas existentes con los actuales métodos de seguimiento y mejorar la sensibilidad de la detección de recurrencias.

Si se demuestra que la determinación de RNAm de Tiroglobulina es un método de screening sensible para detectar recidivas en los pacientes diagnosticados de Cáncer diferenciado de tiroides, supondría varias ventajas con respecto a la situación actual:

1º) Posibilidad de diagnosticar recidivas sin necesidad de suspender el tratamiento sustitutivo hormonal, es decir, evitar la situación de hipotiroidismo clínico que actualmente se precisa.

2º) Permitiría evaluar la posibilidad de recidivas en aquel grupo de pacientes que presentan anticuerpos anti-tiroglobulina elevados, en los cuales en el momento actual no es válida la determinación de TG y por tanto el único sistema de control es el rastreo. Esta técnica nos permitiría espaciar los rastreos en este grupo de pacientes.

3º) Podríamos identificar a un grupo seleccionado de pacientes en riesgo, que precisarían realización de rastreos con I-131 con mayor frecuencia, mientras que otro grupo con RNAm de Tiroglobulina indetectable requeriría menor frecuencia e intensidad de exploraciones, con la consiguiente disminución del gasto sanitario.

4º) Nos permitiría identificar a un grupo de pacientes que requerirían otras exploraciones distintas al rastreo, por presentar niveles detectables de RNAm de Tiroglobulina y rastreos negativos.

Todos estos factores facilitarían el seguimiento de los pacientes con Carcinoma Diferenciado de Tiroides, ya que se limitarían el número de exploraciones (rastreos) y las molestias derivadas de la situación de hipotiroidismo, que se obviaría.

OBJETIVOS CONCRETOS

1) Evaluar la sensibilidad y especificidad de la determinación de RNAm de Tiroglobulina, como marcador tumoral para detectar recidivas o enfermedad residual en los pacientes diagnosticados de Carcinoma Diferenciado de Tiroides.

2) Comparar los resultados de la detección de RNAm de Tiroglobulina con los niveles de Tiroglobulina plasmática (en situación con y sin tratamiento sustitutivo hormonal). Valorar las posibles ventajas de la determinación de RNAm de Tiroglobulina frente a la Tiroglobulina en el diagnóstico y seguimiento de las recidivas del Carcinoma Diferenciado de Tiroides.

3) Determinar la posible ventaja de la determinación de RNAm de Tiroglobulina en pacientes con elevación de anticuerpos anti-tiroglobulina, en los cuales está invalidada la determinación de TG plasmática.

4) Establecer, en la medida de lo posible, una cuantificación de RNAm de Tiroglobulina, lo cual permitiría, realizando mediciones periódicas, la identificación de la progresión de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio prospectivo y abierto en pacientes diagnosticados de Carcinoma Diferenciado de Tiroides, en seguimiento en el servicio de Endocrinología del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

El estudio se desarrolló durante los meses de mayo de 2000 a febrero de 2001 y se incluyeron todos los pacientes a los que se les realizó rastreo con I¹³¹ en el servicio de Medicina Nuclear de dicho Hospital durante esa fecha.

Criterios de inclusión:

- Estar diagnosticado de CDT (Carcinoma Papilar convencional o alguna de sus variantes histológicas, Carcinoma Folicular o alguna de sus variantes histológicas).
- Haber sido intervenido mediante Tiroidectomía Total o casi Total.
- Seguir revisiones periódicas en el Servicio de endocrinología del Virgen del Rocío de Sevilla.
- Realizarse un rastreo con I¹³¹ en el servicio de Medicina Nuclear del Hospital Virgen del rocío entre el 1 de mayo de 2000 y el 28 de Febrero de 2001.

Protocolo de estudio:

A los pacientes incluidos se les realizó extracción de sangre venosa, coincidiendo con la toma de muestra previa a la realización del rastreo, con 2 mCi de I¹³¹, tras 4 semanas de supresión del tratamiento sustitutivo con Levotiroxina, y por tanto en situación de hipotiroidismo (con TSH<30 μ UI/ml). Se les realizó determinación de TSH, Tiroglobulina, Anticuerpos antitiroglobulina y ARNm de Tiroglobulina.

El rastreo se realizó a las 24 y posteriormente a las 48 y 72 horas de administrar la dosis de I^{131} , en gammacámara de doble colimador. Una vez realizado el rastreo el paciente es remitido a consultas si no presenta captación alguna, e ingresa en la unidad de terapia metabólica para recibir tratamiento con I^{131} si lo precisa a dosis variable, de 80 a 150 mCi, en función de la existencia de tejido residual, metástasis linfática o a distancia.

Se tomó nueva muestra de sangre venosa a todos los pacientes previamente incluidos, cuando se revisaron en consultas de Endocrinología durante el periodo de estudio, siempre que hubieran normalizado las cifras de TSH al reinstaurar el tratamiento sustitutivo con Levotiroxina. Se les realizó nuevamente determinación de TSH, Tiroglobulina, Anticuerpos antitiroglobulina y ARNm de Tiroglobulina.

Finalizado el plazo de toma de muestras, y una vez procesadas las diferentes determinaciones analíticas, se revisaron retrospectivamente todas las historias clínicas de los pacientes incluidos en el estudio, haciendo hincapié en aspectos clínicos, histológicos y epidemiológicos de los mismos.

Como control del estudio se determinó ARNm de Tiroglobulina a 6 pacientes "normales", que no presentaban patología tiroidea alguna ni se habían sometido a tiroidectomía

Los resultados obtenidos se analizaron mediante programa estadístico SPSS 10.0 para Window. La concordancia entre los diferentes métodos diagnósticos se estudió mediante el coeficiente Kappa y la asociación de los resultados a los factores pronóstico mediante Chi Cuadrado.

PACIENTES

Se incluyeron en el estudio un total de 111 pacientes diagnosticados de CDT. A 100 de estos pacientes se les realizaron determinaciones en situación de en situación de hipotiroidismo y a 58 en situación de Eutiroidismo, de los cuales 47 pacientes se estudiaron en las dos situaciones, con TSH elevada y suprimida.

De los 111 pacientes incluidos 83 eran mujeres (74,7%) y 29 hombres (26,3%), siendo la edad media de 48,3_± 16,3 años, con rango de 16 a 88 años.

En situación de hipotiroidismo (con TSH > de 30 u/l), 39 pacientes presentaron Rastreo y Tiroglobulina sérica negativa, 37 Rastreo y Tiroglobulina sérica positiva, 10 Rastreo negativo con Tiroglobulina sérica positiva, 4 rastreo positivo con tiroglobulina sérica negativa y 10 presentaron anticuerpos anti-tiroglobulina elevados en sangre, 4 de ellos con rastreo negativo y 6 con rastreo positivo (Tabla 4).

<i>Situación Clínica</i>	<i>Sin Tratamiento con T4</i>
<i>Rastreo + y TG +</i>	37
<i>Rastreo - y TG -</i>	39
<i>Rastreo - y TG +</i>	10
<i>Rastreo + y TG -</i>	4
<i>Rastreo + y Anticuerpos Anti-TG +</i>	6
<i>Rastreo - y Anticuerpos Anti-TG +</i>	4

Tabla 4: Situación clínica de los pacientes en Hipotiroidismo.

En situación de Eutiroidismo (TSH < 5 u/l) 39 pacientes presentaron rastreo y Tiroglobulina sérica negativa, 5 rastreo y Tiroglobulina sérica positiva, 5 rastreo negativo con Tiroglobulina sérica positiva, 3 rastreo positivo con tiroglobulina sérica negativa y 6 presentaron anticuerpos anti-tiroglobulina elevados en sangre, 5 de ellos con rastreo negativo y 1 con rastreo positivo (Tabla 5).

Situación Clínica	En Tratamiento con T4
	n
<i>Rastreo + y TG +</i>	5
<i>Rastreo - y TG -</i>	39
<i>Rastreo - y TG +</i>	5
<i>Rastreo + y TG -</i>	3
<i>Rastreo + y Anticuerpos Anti-TG +</i>	1
<i>Rastreo - y Anticuerpos Anti-TG +</i>	5

Tabla 5. Situación clínica de los pacientes en eutiroidismo.

El tipo histológico de los CDT estudiados fue: 59 pacientes Carcinoma Papilar Convencional, 28 Carcinoma Folicular, 11 Carcinoma Papilar de Variante de células Altas, 7 Carcinoma Papilar de Variante Folicular, 2 Carcinoma de Hürthle y 3 Carcinoma Insular, Carcinoma Papilar variante Columnar y Carcinoma Papilar Variante Esclerosis difusa respectivamente. (Tabla 6)

Características Histológicas	n	%
<i>Carcinoma Papilar Convencional</i>	59	53
<i>Carcinoma Folicular</i>	28	25,5
<i>Carcinoma Papilar Variante células Altas</i>	11	10
<i>Carcinoma Papilar variante Folicular</i>	7	6
<i>Carcinoma de Hürthle</i>	2	1,9
<i>Carcinoma Insular</i>	1	0,9
<i>Carcinoma Papilar variante Columnar</i>	1	0,9
<i>Carcinoma Papilar Variante Esclerosante</i>	1	0,9

Tabla 6: Características histológicas de los CDT en nuestro estudio.

El tamaño tumoral se pudo documentar en 97 pacientes, de los cuales 39 presentaban un tumor de tamaño inferior a 2 centímetros, 38 un tumor de tamaño comprendido entre 2 y 4 centímetros y 20 un tumor de tamaño superior a los 4 centímetros.

La extensión tumoral evaluada según la existencia de captaciones ganglionares o a distancia tras la administración de dosis de rastreo con I¹³¹ o en alguna otra prueba de imagen. Un total de 59 pacientes (53%) habían presentado en algún punto a lo largo de la evolución de su enfermedad metastasis, 55 (50%) ganglionares y 30 (27%) a distancia.

Sólo 2 pacientes se habían sometido previamente a radioterapia externa en la región de cabeza o cuello.

DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Determinación de Tiroglobulina:

Mediante IRMA doble anticuerpo monoclonal Diasorin. Realizamos análisis de normalidad en nuestra población y el punto de corte más apropiado era 3 ng/ml, por lo que es el valor que usamos en el estudio para definir como positivo o negativo en la técnica.

Determinación de TSH:

Mediante RIA momoclonal CIS-Bio Internacional. En nuestro laboratorio se consideran valores de normalidad los comprendidos entre 0,05 y 5 μ UI/ml.

Determinación de anticuerpos antitiroglobulina:

Mediante IRMA doble anticuerpo monoclonal Diasorin. En nuestro laboratorio se consideran valores de normalidad los que se mantienen por debajo de 100 UI/ml.

DETECCIÓN DE ARNm DE TIROGLOBULINA

1. Resumen del procedimiento

El método de detección de ARNm de Tiroglobulina en sangre periférica se realiza en varias etapas. Partiendo de sangre venosa y tras un proceso de obtención de las células blancas extraemos de éstas el ARN total. Una vez cuantificado este ARN total y mediante transcripción inversa, sintetizamos ADN complementario (ADNc). Con este ADNc realizamos una RT-PCR de control ($\beta 2$ microglobulina) y posteriormente la RT-PCR para ARNm de Tiroglobulina en las condiciones que posteriormente detallamos. Los productos de PCR se someten a electroforesis en un gel de agarosa y posteriormente, para aumentar la sensibilidad del método, e hibridamos con sonda interna.

2. Procesamiento de las muestras

OBTENCIÓN DEL ARN Total:

A cada paciente se le extrajeron 3 ml de sangre periférica que se depositaron en tubos con EDTA, transportándose en hielo al laboratorio, donde inmediatamente se procesaba la muestra.

La obtención de ARN total se realizaba en condiciones libres de ARNasas y todo el material usado era previamente lavado con agua tratada con dietilpircarbamato (DEPC), autoclavado o calentado en horno a 250° durante un mínimo de 3 horas¹⁴².

Obtención de células blancas

- Tras tomar 1,5 ml de sangre periférica, se deposita en un tubo cónico de 15 ml, al que se añaden 10 ml de solución de lisis de hematíes (Tris 2 M; Cl_2Mg 1 M; pH 7,5) y se mezcla.
- Se coloca en centrífuga refrigerada durante 15 minutos a 3500 revoluciones por minuto (rpm) a 4 °C.
- Se descarta el sobrenadante, se añaden 10 ml de solución de lisis y se mezcla.
- Se coloca en centrífuga durante 15 minutos a 3500 rpm a 4 °C.
- Se tira el sobrenadante, añadimos 0,5 ml de solución de lisis, se toma mezclándolo con el botón de células y se transporta a tubo Eppendorf de 1,5 ml.
- Se centrifuga y se tira el sobrenadante quedando un botón de células blancas.
- Se almacena a -80 °C hasta su uso.

Extracción de ARN total

- Para aislar ARN total usamos un método en paso único basado en la desnaturalización con sales de guanidina y urea¹⁴³.
- Se añade 1 ml de Ultraspec (Biotecx) al botón de células blancas.
- Se homogeniza la solución pasándola por una jeringa con aguja del 18 g unas 10 veces.
- Se mantiene en hielo al menos 10 minutos.
- Se añade 0,2 ml de cloroformo al tubo Eppendorf y se agita.
- Se mantiene en hielo 10 minutos.
- Se coloca en centrífuga 20 minutos a 12000 rpm.
- Al sacar de la centrífuga quedan 2 fases bien diferenciadas, extraemos con micropipeta la fase acuosa (unos 500 μ l aproximadamente) y la depositamos en un tubo Eppendorf.
- Se añade un volumen igual de isopropanol, se mezcla y 10 minutos en hielo.
- Se coloca en centrífuga 10 minutos a 12000 rpm.
- Al sacar de la centrífuga se observa un precipitado blanco correspondiente al ARN en el fondo del tubo. Tiramos el sobrenadante y añadimos 1 ml de etanol absoluto, se mezcla con vortex.

- Se coloca en centrífuga 5 minutos a 12000 rpm.
- Tiramos el sobrenadante y dejamos secar el botón al fondo del tubo.
- Se resuspende en 60 μ l de agua tratada con DEPC, agitando con vortex.

CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL

Para verificar el material y cerciorarnos de que la cantidad y calidad de ARN total obtenido de la sangre de los paciente era aceptable, cuantificamos las muestras mediante absorbancia de luz ultravioleta¹⁴⁴. Este procedimiento nos permitió eliminar algunos pacientes del estudio, pues las muestras no alcanzaban una garantía suficiente para continuar el procesamiento.

Se añaden 10 μ l de ARN total de las muestras a 390 μ l de agua destilada en un tubo Eppendorf. En el espectrofotómetro (Ultrospec III) se introducen las 400 μ l en una cubeta de cuarzo, un control en la otra y obtenemos la concentración de ARN total en μ g/ μ l en el tubo Eppendorf, la OD260 y la OD280, pudiendo obtener por tanto el rendimiento de ARN total en cada muestra.

SÍNTESIS DEL ADNc

Para la síntesis de ADNc a partir de ARN total mediante transcripción inversa utilizamos el sistema de Roche Molecular Biochemicals basado en, primero sintetizar una cadena de ADNc y posteriormente formar un dúplex de ADNc/ARNm para molde de amplificación. Se utilizaron 8 μ l de ARN total para cada muestra lo que supone una concentración de entre 0,2y 0,8 μ g de ARN total.

Procedimiento:

- Descongelamos las muestras de ARN total que estaban a -80°C , tomamos con pipeta 8 μ l en un tubo Eppendorf.
- Calentamos en termobloque a 65°C durante 15 minutos.

- Preparemos una mezcla con las concentraciones de los componentes del kit que paso a detallar :
 - 2 μ l de Buffer 10x (100 mM Tris; 500 mM ClK; pH=8,3).
 - 4 μ l de Cl_2 Mg 25 μ M.
 - 2 μ l de dATP, dCTP, dTTP y dGTP; 10 mM cada uno.
 - 2 μ l de Oligo-p(dt)₁₅ Primer 0,8 μ g/l.
 - 1 μ l del inhibidor de ARNasas.
 - 0,8 μ l de la enzima AMV transcriptasa inversa (20 unidades).
 - 0,2 μ l de agua estéril

En total 12 μ l a añadir a cada tubo Eppendorf con los 8 μ l de ARN total, sumando un total de 20 μ l de ADNc al final de la reacción.

- Sacamos del termobloque y mantenemos los tubos 5 minutos en hielo.
- Añadimos los 12 μ l de la mezcla a cada muestra y dejamos 10 minutos a 25°C.
- Colocamos en termobloque 1 hora a 42°C, temperatura a la que funciona la reacción.
- Pasada la hora introducimos durante 5 minutos a los tubos de Eppendorf en un vaso de precipitado con agua a 100°C.
- Introducimos posteriormente los tubos 5 minutos en hielo, mezclamos con vortex, y congelamos a -20°C los 20 μ l de ADNc obtenidas de cada muestra.

REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR) PARA β_2 MICROGLOBULINA

Para comprobar la calidad del ADNc obtenido, realizamos a todas las muestras una PCR para β_2 microglobulina, gen constitutivamente expresado en todas las células, eliminando aquellas muestras que no presentaran positividad en la PCR.

Utilizamos 3 μ l de ADNc para realizar esta PCR, que añadíamos a 47 μ l de mezcla que se depositaban en un tubo de PCR de 0,5 μ l. Los componentes de

la mezcla son los que paso a enumerar, multiplicando las cantidades de cada uno por el número de muestras que vayamos a someter a la reacción:

- 2 μ l de cebador sentido (25 pmol). (Tabla 7)
- 2 μ l de cebador antisentido (25 pmol). (tabla 11)
- 8 μ l de deoxinucleótidos trifosfatos (50 μ mol de dATP, dCTP, dTTP y dGTP)
- 10 μ l de Buffer 5x (TRIS-Cl H 20 mM, pH =9).
- 0,2 μ l de TAQ ADN polimerasa (1 unidad).
- 25 μ l de agua destilada bidestilada.

En total 47 μ l de mezcla que junto a las 3 μ l de ADNc suman 50 μ l en cada tubo de PCR que se depositan en el termociclador Master Cycler, (Eppendorf). Para permitir el comienzo en caliente de la reacción se añade el producto Hot Wax Mg Beads (Invitrogen) con 1,5 mM Cl_2 Mg.

<i>Gen de</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Posición</i>
<i>Tiroglobulina</i>		
5'-3'	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCT	Exón 1
5'-3'	CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC	Exones 2 y 3

Tabla 7: Cebadores de la PCR de β_2 microglobulina

La PCR para $B_2\mu$ globulina constaba de las siguientes fases:

- 5 minutos iniciales a 95°C.
- 35 ciclos compuestos de las siguientes fases:
 - 1 minuto a 95°C, desnaturalización.
 - 1 minuto a 55°C, hibridación.
 - 2 minutos a 72°C, extensión.
- 7 minutos a 72°C.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Analizamos los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa:

Procedimiento:

- Preparamos gel de agarosa al 1,6%, utilizando Agarosa Seaken GTG Biowhittaker y tampón TAE 1x (TAE 50x : TRIS, Acido Acético y 0,5 M de EDTA a Ph=8)
- Calentamos, disolviendo la agarosa en el Buffer y añadimos bromuro de etidio con una concentración final de 0,5 µg/ml en la agarosa.
- Vertimos el gel en la bandeja de electroforesis con el peine ya colocado para marcar los pocillos. Dejamos que el gel se solidifique.
- Una vez el gel consolida, se deposita en la cubeta con tampón TAE 1x y se retira el peine, quedando el gel con los pocillos donde colocaremos las muestras.
- Tomamos 9 µl de producto de PCR mezclándolas con 1 µl de tampón de carga 10x (30% Ficoll, 0,25 % azul de bromofenol y 0,25 % de cianol xileno). A su vez utilizamos un indicador de peso molecular, que nos permitirá posteriormente referenciar la banda obtenida.
- Iniciamos electroforesis del gel a una corriente de 8-10 V/cm de gel. El proceso se mantiene hasta que se aprecia una correcta separación de las bandas del colorante, durante aproximadamente 45 minutos.
- El producto amplificado se visualiza colocando el gel sobre un trans-iluminador de ultravioletas. El producto amplificado se documenta mediante cámara de fotos Polaroid.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA TIROGLOBULINA

Puesta a punto de la PCR:

Para realizar PCR de tiroglobulina precisamos poner a punto el método, pues no teníamos más referencia que la banda descrita en trabajos anteriores. Para hacerlo utilizamos tiroides normal (100 mgr):

- Lo homogeneizamos en 1ml de Ultraspec, y lo procesamos para obtener ARN total mediante el procedimiento anteriormente descrito.
- Cuantificamos mediante espectrofotometría, tal y como se especifica anteriormente la cantidad de ARN total en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se obtuvieron $0,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ARN total de tejido tiroideo, lo que multiplicado por las $60 \mu\text{l}$ de ARN total resultan aproximadamente $48 \mu\text{g}$ de ARN total obtenidos de 100 mgr de tejido tiroideo.
- A partir de este ARN total elaboramos ADNc mediante el método de Roche Molecular Biochemical, tal y como se especifica anteriormente. La cantidad de ARN total utilizada para elaborar el ADNc fue de $11,5 \mu\text{l}$ lo que supone $9,2 \mu\text{g}$ de ARN total en las $20 \mu\text{l}$ de cDNA obtenido.
- Realizamos PCR para ARNm de β_2 microglobulina con $3 \mu\text{l}$ de ADNc obtenido del tejido tiroideo, comprobando mediante la positividad de este producto en el gel la calidad del ADNc.
- Una vez estábamos seguros del ADNc obtenido, nos propusimos realizar una PCR para amplificar el ARNm de Tiroglobulina. Tomamos $5 \mu\text{l}$ de ADNc de tejido tiroideo para amplificar.

Los componentes de la reacción eran los siguientes:

- $2 \mu\text{l}$ de cebador sentido (Tabla 8).
- $2 \mu\text{l}$ de cebador antisentido (Tabla 8).
- $8 \mu\text{l}$ de dNTPs ($50 \mu\text{mol}$ de dATP, dCTP, dTTP y dGTP)
- $10 \mu\text{l}$ de Buffer 5x (TRIS-Cl H 20 mM , pH =9).
- $0,2 \mu\text{l}$ de TAC ADN polimerasa (1 unidad).

- 23 μ l de agua bidestilada.

Estos cebadores amplifican una banda de 378 pares de bases. En total 45 μ l de mezcla que junto a las 5 μ l de ADNc suman 50 μ l en cada tubo de PCR. Antes de introducir en el termociclador se deposita el producto Hot Wax Mg Beads (Invitrogen) de 1,5 mM Cl_2 Mg.

<i>Gen de</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Posición</i>
<i>Tiroglobulina</i>		
5'-3'	TGTGAGCTGCAGAGGGAAACGGCC	Exón 2
3'-5'	ATACACCTCCATCCCCTCTGCGTCCACACA	Exón 4

Tabla 8: Cebadores de la PCR de Tiroglobulina

La PCR para Tiroglobulina constaba de las siguientes fases:

- 5 minutos iniciales a 90°C.
- 40 ciclos compuestos de las siguientes fases:
 - 1 minuto a 90°C, desnaturalización.
 - 1 minuto a 60°C, hibridación.
 - 2 minutos a 72°C, extensión.
- 7 minutos a 72°C.

Realizamos electroforesis en gel de agarosa en las condiciones anteriormente reseñadas y con luz ultravioleta obtuvimos positividad para la banda de tiroglobulina (Figura 1).

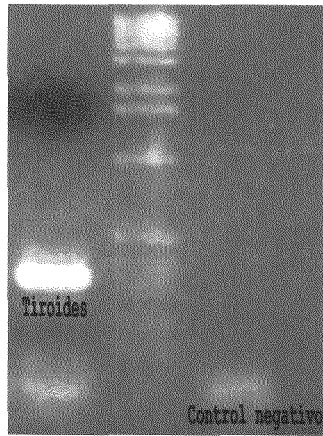


Figura 1: Detección de la banda de Tiroglobulina en un gel de agarosa (348 pb).

ELABORACIÓN DE UN BLOT A PARTIR DE UN GEL DE AGAROSA

Procedimiento:

- Introducimos el gel de agarosa en una solución desnaturante (Na OH 0,5 M; Cl Na 1,5 M) y lo colocamos en agitador durante 30 minutos.
- Tras desnaturar, suspendemos el gel en solución neutralizante (Tris-HCL 1 M; Cl Na 1,5 M, pH 7,4) y lo colocamos en agitador durante 15 minutos.
- Repetimos este último proceso durante otros 15 minutos.

Una vez desnaturado y neutralizado el gel, se procede a transferir por capilaridad el ADN del gel a una membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham):

- En una cubeta con solución SSC 10x (20xSSC es: Citrato Na 0,3 M; Cl Na 3 M, pH 7,0) colocamos papel Whatman 3MM sobre superficie que hace de mecha.
- Colocamos el gel de agarosa ya desnaturado y neutralizado sobre el papel Whatman con la cara de los pocillos hacia abajo.
- Sobre el gel colocamos una membrana de nylon que será sobre la que se depositará el ADN.
- Encima de la membrana se coloca una pila de papel absorbente y un peso de 1 kilogramo.

La transferencia se realiza en un plazo que puede variar de 2 horas a toda la noche. Una vez retirada la membrana de nylon se expone en una cámara de radiación ultravioleta (Crosslinker UVC-508) y se somete a 120 J/m² con el fin de fijar el ADN a la membrana de hibridación. La membrana obtenida se puede almacenar o pasar directamente a la fase de Prehibridación

HIBRIDACIÓN MEDIANTE SONDA INTERNA:

Con este proceso se pretende confirmar la especificidad del producto de PCR y aumentar la sensibilidad del método poniendo de relieve bandas no visibles por nosotros en el gel de agarosa con bromuro de etidio. Para ello utilizamos un método no radiactivo mediante el marcaje de una sonda de oligonucleótidos con digoxigenina (DIG Oligonucleotide Tailing Kit, Roche) y se detecta ésta mediante un método quimioluminiscente (DIG-Luminiscent Detection Kit for Nucleid Acid, Roche).

Procedimiento:

Marcaje de la sonda mediante “tailing”:

El procedimiento de “tailing” consiste en tomar su oligonucleótido (Tabla 8) y mediante la enzima transferasa terminal añadir a este oligo una cola de nucleótidos (40 o 50) marcados con digoxigenina (Tabla 9).

Secuencia

5'-ATCCTCTGCACACTGGGGCACGTAGTCTGCTTGCTTCAGAAA-3'

Tabla 9: Oligonucleótido de Tiroglobulina utilizado

Para realizar el “tailing” es preciso mezclar en un tubo Eppendorf en hielo y por orden :

- 4 µl de Buffer de tailing 5x (Cacodilat potasico 1 M; Tris-Cl H 0,125 M; albúmina sérica bovina 1,25 mg/ml; a pH 6,6).
- 4 µl de solución Cl₂ Co (25 mM).

- 1 μ l de digoxigenina- dUTP (DIG-dUTP 1 mM).
- 1 μ l de solución dATP (dATP 10mM en buffer Tris, a pH 7,5).
- 1 μ l de transferasa terminal (50 unidades de transferasa terminal en cacodilato potásico 0,2 M; EDTA 0,1 mM, ClK 1 mM, albúmina sérica bovina 0,2 mg/ml; pH =6,5).

Incubamos durante 15 minutos a 37°C, luego colocamos el tubo nuevamente en hielo. Añadimos a la reacción 2 μ l de EDTA 0,2M como quelante para frenarla y 18 μ l de dH₂O. La sonda marcada es estable durante meses a -20°C.

Fase de prehibridación:

Se suspende la membrana en solución SSC 2x durante 5 minutos. Mientras tanto en el tubo de hibridación se depositan 4 ml de solución de hibridación (DIG Easy Hyb, Roche) y 50 μ l de poly A (10 ng/ml). Introducimos la membrana en el tubo de hibridación y prehibridamos durante al menos 30 minutos en horno de hibridación.

Fase de hibridación y posthibridación:

Introducimos 3 μ l de la sonda marcada en el tubo de hibridación junto con la membrana de Nylon e hibridamos en horno durante al menos dos horas.

Sacamos la membrana del tubo y realizamos los lavados post-hibridación:

- 2 lavados de 5 minutos cada uno con solución 2x SSc/0,1%SDS (sulfato de nadodecakil) a 37°C en horno.
- 2 lavados de 5 minutos cada uno con solución 0,1xSSc/0,1%SDS a 42°C en horno.

Detección luminiscente del producto de hibridación:

Una vez marcado con sonda interna iniciamos el proceso de detección de los resultados por método luminiscente. se trata de un proceso de detección de la digoxigenina por medio de una reacción inmunoenzimática reportada por un sustrato quimioluminiscente.

- 1 lavado de 5 minutos en agitador con solución de lavado (tampón Maleico (Ácido Maleico 0,1 M; Cl Na 0,15 M; pH =7,5) con Tween 20 al 0,3%)
- Incubamos durante 30 minutos en Solución bloqueante 1x (tampón Maleico con Solución bloqueante 1/10) en agitador.
- Incubamos otros 30 minutos en agitador con la misma solución bloqueante a la que añadimos Anti-Digoxigenina 1:10000 conjugado a fosfatasa alcalina.
- Realizamos dos nuevos lavados con solución de lavado durante 15 minutos en agitador.
- Suspendemos durante 5 minutos en tampón de detección (Tris- ClH 0,1 M; Cl Na 0,1 M; pH9,5) y posteriormente se cubre con 1 ml de tampón detección en el que previamente hemos diluido 10 μ l de CSPD (sustrato quimioluminiscente) durante 5 minutos.
- Escurrimos el líquido y sin dejar secar la membrana se coloca entre hojas de plástico, manteniéndola durante 10 minutos en horno a 37°C para incrementar la luminiscencia según indicaciones del fabricante.
- En cuarto oscuro colocamos una película radiográfica (Mamorag, Agfa) sobre la membrana y lo dejamos al menos 10 horas.
- Revelamos la película mediante procedimiento manual.

RESULTADOS

1.- SENSIBILIDAD DEL MÉTODO IN VITRO

Prueba de sensibilidad:

Una vez conseguida la visualización de la banda de tiroglobulina en el gel de electroforesis nos planteamos la sensibilidad de nuestra PCR para tiroglobulina, es decir, que cantidad mínima de ARN total de tejido tiroideo hace falta poner en la reacción para que sea visible tras la RT-PCR.

Por método de espectrofotometría medimos la cantidad de ARN total por ml de sangre de los pacientes, obteniendo una concentración media de 0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, con un rango que varía entre 0,185 y 0,030 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y una ratio OD260-OD280 que oscila entre 1,4 y 1,8. Este último dato nos permite conocer que la calidad de nuestro ARN total está dentro de unos límites aceptables. Por el mismo método de espectrofotometría medimos la cantidad de ARN total obtenida de 100 mg de tejido tiroideo, que fue de 48 μg , con una concentración de 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y una ratio OD260-OD280 de 1,5

Partiendo de que 10 ng de ARN total corresponden a 10^3 células tiroideas circulantes¹³⁴, y tomando como referencia esta cifra y la cantidad total de ARN total de tejido tiroideo obtenido por nosotros, medido por espectrofotometría, hicimos diluciones hasta conseguir tubos Eppendorf con el equivalente a 10^3 células de tejido tiroideo, a 10^2 células de tejido tiroideo, a 50 células de tejido tiroideo y a 5 células de tejido tiroideo por cada 2 μl . Mezclamos 2 μl de cada uno de estos tubos Eppendorf con 18 μl de ARN total obtenidas de 1,5 ml de sangre de un sujeto tiroidectomizado, posteriormente radiado con I^{131} y rastreado en varias ocasiones siendo reiteradamente negativas sus captaciones e indetectable su tiroglobulina, al que se tomó como control negativo. De los tubos Eppendorf con 20 μl finales, cada uno con una concentración diferente de células tiroideas (1000, 100, 50, 5, 0) se obtuvo ADNc y posteriormente se realizó PCR de B₂microglobulina en las condiciones anteriormente descritas para comprobar la calidad del cDNA obtenido.

Realizamos finalmente PCR de tiroglobulina en las condiciones anteriormente descritas en material y método, alcanzando una sensibilidad de hasta 5 células en un gel de agarosa (figura 2).

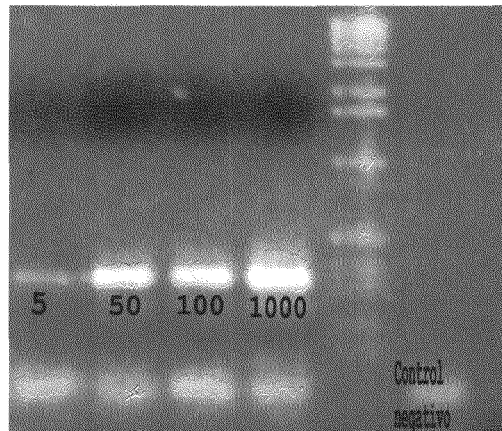


Figura 2: Prueba de sensibilidad de la RT-PCR para Tiroglobulina. Se alcanza una sensibilidad de 5 células/ml de sangre en un gel de agarosa

Para aumentar aún más la sensibilidad de nuestro método, decidimos realizar blot de todos los diferentes gels de agarosa con las muestras de los pacientes, para posteriormente hibridarlos con sonda interna. Mediante este método, conseguimos aumentar en al menos 100 veces la sensibilidad de la técnica (Figura 3).

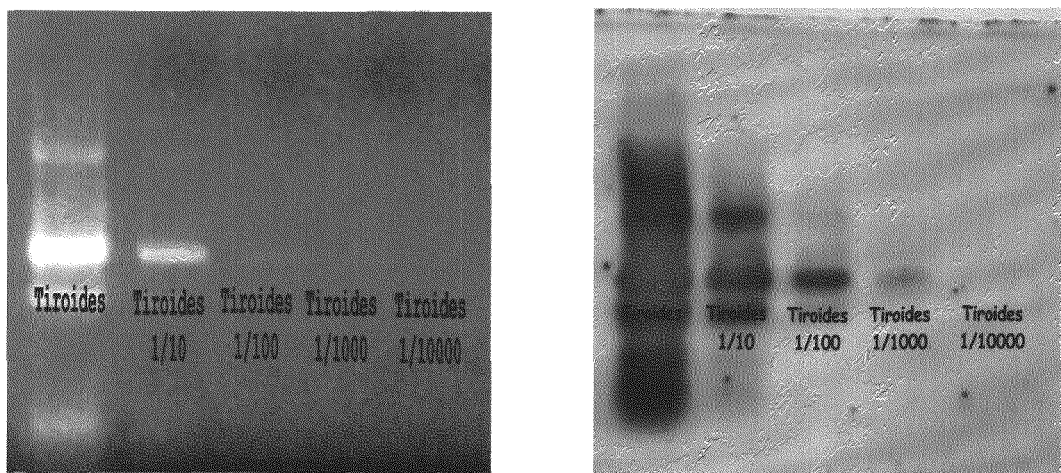


Figura 3: Prueba para aumentar la sensibilidad. En la imagen de la izquierda el gel de agarosa y en la de la derecha el Blot tras hibridar con sonda interna. Se aprecia la mayor sensibilidad del Blot para detectar células tiroideas circulantes.

PCR de tiroglobulina de los casos:

Comenzamos a realizar PCR de tiroglobulina de los diferentes casos y las primeras tandas de pacientes demostraron que en la mayoría de los mismos no apreciábamos banda en el gel de agarosa, salvo en contados casos, que correspondían a algunos pacientes con metástasis a distancia. Cuando hibridamos con la sonda interna, el número de positivos aumentaba considerablemente con respecto a lo obtenido en el gel (Figura 4).

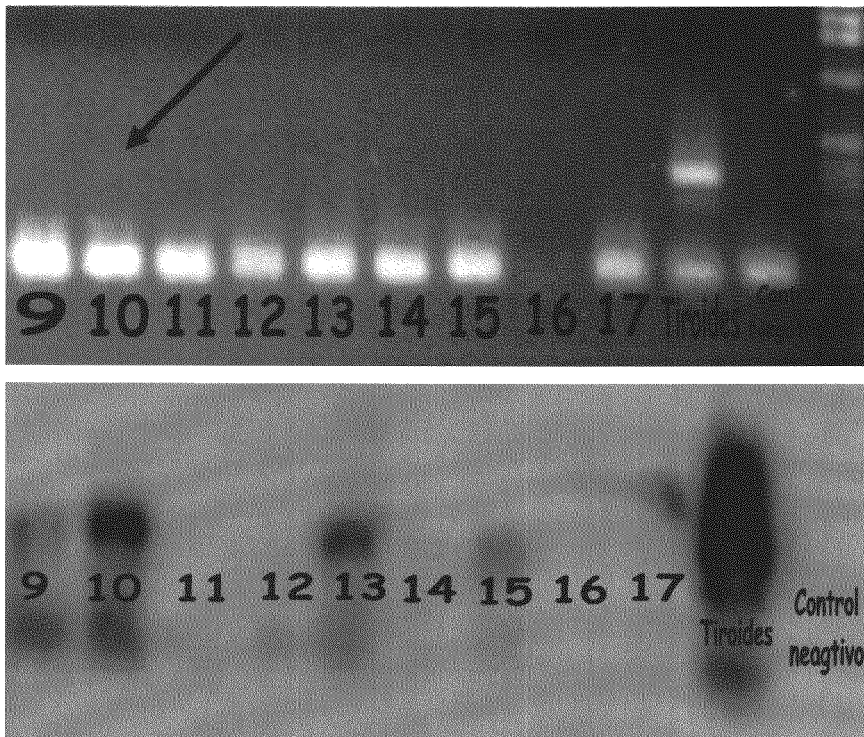


Figura 4: RT-PCR de pacientes. En la primera imagen se observan los resultados obtenidos en gel de agarosa. El caso número 10 se trata de una paciente con metástasis a distancia y Tiroglobulina sérica muy elevada. En la segunda imagen observamos como se positivizan más casos de pacientes en el Blot tras hibridar con sonda interna

2.- SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL ARNm DE TIROGLOBULINA EN LOS PACIENTES CON CDT

Para evaluar la sensibilidad y especificidad de la determinación de ARNm de Tiroglobulina como marcador tumoral para detectar recidivas o enfermedad residual en los pacientes con CDT, consideramos:

- Recidiva tumoral o persistencia de enfermedad en los pacientes cuando el rastreo fue positivo, la Tiroglobulina > de 3 o ambas.
- Libres de enfermedad a todos aquellos pacientes con rastreo y Tiroglobulina sérica negativa.

Se evaluaron los resultados obtenidos en situación de Hipotiroidismo y en situación de Eutiroidismo.

EN HIPOTIROIDISMO:

La técnica mostró una Sensibilidad del 86%, resultando positiva en 44 de los 51 pacientes con enfermedad residual. La Especificidad fue del 46%, resultando negativa en 18 de los 39 pacientes sin enfermedad residual por los métodos actuales (Tabla 10). El cociente de variación de la técnica en nuestro estudio fue de 1,60, variando de una probabilidad Pretest del 57% a una probabilidad post test del 68%.

<i>Extensión de la enfermedad</i>	<i>Con Enfermedad</i>	<i>Sin Enfermedad</i>	
	<i>Según rastreo y TG</i>	<i>Según Rastreo y TG</i>	
<i>ARNm de Tiroglobulina +</i>	44	21	65
<i>ARNm de Tiroglobulina -</i>	7	18	25
<i>Total enfermos</i>	51	39	90

Tabla 10: Sensibilidad y Especificidad de ARNm de Tiroglobulina con TSH elevada.

EN EUTIROIDISMO:

La técnica mostró una Sensibilidad del 69%, resultando positiva en 9 de los 13 pacientes con enfermedad residual. La Especificidad fue del 67%, resultando negativa en de los 26 de los 39 pacientes sin enfermedad residual, por los métodos actuales (Tabla 11). El cociente de variación de la técnica en nuestro estudio fue de 1,60, variando de una probabilidad Pretest del 57% a una probabilidad post test del 68%.

Extensión de la enfermedad	Con Enfermedad Según rastreo y TG	Sin Enfermedad Según Rastreo y TG	
ARNm de Tiroglobulina +	9	13	22
ARNm de Tiroglobulina -	4	26	30
Total enfermos	13	39	52

Tabla 11: Sensibilidad y Especificidad de ARNm de Tiroglobulina con TSH Normal.

3.- COMPARACIÓN DE ARNm DE TIROGLOBULINA Y TIROGLOBULINA SÉRICA

La concordancia global de los 2 métodos se midió según la medida de acuerdo Kappa, tanto en hipotiroidismo como en eutiroidismo. También se compararon los resultados obtenidos por ambos métodos en hipotiroidismo y en eutiroidismo en función del resultado del rastreo con I^{131} , dividiendo los posibles resultados del mismo en 3 bloques: Ausencia de captación, Captación en el lecho tiroideo y captación extratiroidea.

EN HIPOTIROIDISMO:

Resultados Globales:

En hipotiroidismo se obtuvieron un total de 68 (68%) resultados positivos para ARNm de Tiroglobulina y un total de 32 (32%) resultados negativos. La tiroglobulina sérica se mostró elevada en 51 (51%) casos y normal en 49 (49%). 44 pacientes tenían ambos tests positivos, 25 ambos tests negativos, 24 ARNm de Tiroglobulina positivo y Tiroglobulina sérica negativa y 7 pacientes presentaron Tiroglobulina sérica positiva con ARNm de Tiroglobulina negativo (Tabla 12). La medida de acuerdo Kappa presentó un valor de 0,392 de acuerdo entre ambos test.

Métodos Diagnósticos	TG Sérica+	TG Sérica -	
ARNm de Tiroglobulina +	44	24	68
ARNm de Tiroglobulina -	7	25	32
	51	49	100

Tabla 12: Comparación de ARNm de Tiroglobulina con Tiroglobulina sérica en hipotiroidismo.

Resultados en función del Rastreo:

Con Captación extratiroidea (n=25):

Veinte presentaban ARNm de Tiroglobulina elevado en sangre y 5 negativos, mientras que la tiroglobulina sérica se elevó en 23 pacientes, resultando negativa sólo en 2 casos. La medida de acuerdo Kappa presentó un valor de 0,516 de acuerdo entre ambos test, y la sensibilidad de ambos métodos para diagnosticar la existencia de captación fuera del lecho tiroideo fue del 80 y 88% respectivamente.

(Tabla 13)

Captación Fuera del Lecho tiroideo	TG Sérica	TG Sérica -	
ARNm de Tiroglobulina +	18	2	20
ARNm de Tiroglobulina -	5	0	5
	23	2	25

Tabla 13: ARNm de Tiroglobulina y Tiroglobulina Sérica en casos de captación extratiroidea

Con captación en el lecho tiroideo (n=20):

Diecisiete presentaron ARNm de tiroglobulina positivo y 3 negativo. Los mismos resultados se obtuvieron con la determinación de tiroglobulina sérica. La medida de acuerdo Kappa presentó un valor de 0,608 de acuerdo entre ambos test, y la sensibilidad de ambos métodos para diagnosticar la existencia de captación fuera del lecho tiroideo fue del 85% (Tabla 14).

Captación en el LechoTiroideo	TG Sérica+	TG Sérica -	
ARNm de Tiroglobulina +	16	1	17
ARNm de Tiroglobulina -	1	2	3
	17	3	20

Tabla 14: ARNm de Tiroglobulina y Tiroglobulina Sérica en casos de captación en el lecho tiroideo.

En ausencia de captación (n=55):

Treinta presentaban ARNm de Tiroglobulina positivo y 25 negativo, mientras que sólo 9 presentaban Tiroglobulina sérica positiva y 41 negativa. La medida de acuerdo Kappa presentó un valor de 0,214 de acuerdo entre ambos test y la especificidad de ambos métodos para diagnosticar ausencia de captación en el rastreo fue del 45 y del 80 % respectivamente. (Tabla 15).

Sin Captación en el rastreo	TG Sérica+	TG Sérica -	
ARNm de Tiroglobulina +	9	21	30
ARNm de Tiroglobulina -	1	24	25
	10	45	55

Tabla 15: ARNm de Tiroglobulina y Tiroglobulina Sérica en casos de ausencia de captación

EN EUTIROIDISMO:

Resultados Globales:

Con TSH normal se obtuvieron un total de 24 (42,4%) resultados positivos para ARNm de Tiroglobulina y 34 (57,6%) resultados negativos. La tiroglobulina sérica se mostró elevada en 13 (22%) casos y normal en 45 (88%). 11 pacientes tenían ambos tests positivos, 32 ambos tests negativos, 13 ARNm de Tiroglobulina positivo y Tiroglobulina sérica negativa y 2 pacientes presentaron Tiroglobulina sérica positiva con ARNm de Tiroglobulina negativo (Tabla 16). La medida de acuerdo Kappa presentó un valor de 0,428 de acuerdo entre ambos test.

Métodos Diagnósticos	TG Sérica+	TG Sérica -	
ARNm de Tiroglobulina +	11	13	24
ARNm de Tiroglobulina -	2	32	34
	13	45	58

Tabla 16: Comparación de ARNm de Tiroglobulina con Tiroglobulina sérica.

Resultados en función del Rastreo:

Con Captación extratiroidea (n=6):

Cinco tenían ARNm de Tiroglobulina elevado en sangre y 1 negativo, mientras que la tiroglobulina sérica se elevó a su vez en 5 pacientes, resultando negativa en 1 casos. La medida de acuerdo Kappa presentó un acuerdo total (1) entre ambos test, y la sensibilidad de ambos métodos para diagnosticar la existencia de captación fuera del lecho tiroideo fue del 83%. (Tabla 17)

Captación Fuera del LechoTiroideo	TG Sérica+	TG Sérica -	
ARNm de Tiroglobulina +	5	0	5
ARNm de Tiroglobulina -	0	1	1
	5	1	6

Tabla 17: ARNm de Tiroglobulina y Tiroglobulina Sérica en casos de captación extratiroidea

Con captación en el lecho tiroideo (n=3):

Los 3 presentaron ARNm de tiroglobulina positivo, y tiroglobulina sérica elevada en 2 pacientes, resultando negativos ambos test en 1 de los casos. La medida de concordancia entre ambos métodos volvió a ser completa, y la sensibilidad de ambos métodos para diagnosticar la existencia de captación fuera del lecho tiroideo fue del 66% respectivamente (Tabla 18)

Captación en el LechoTiroideo	TG Sérica+	TG Sérica -	
ARNm de Tiroglobulina +	2	0	2
ARNm de Tiroglobulina -	0	1	1
	2	1	3

Tabla 18: ARNm de Tiroglobulina y Tiroglobulina Sérica en casos de captación en el lecho tiroideo.

En ausencia de captación (n=49):

Veintiuno presentaban ARNm de Tiroglobulina positivo y 28 negativo, mientras que 7 presentaban Tiroglobulina sérica positiva y el resto (42) negativa. La medida de acuerdo Kappa presentó un valor de 0,182 de acuerdo entre ambos test y la especificidad de ambos métodos para diagnosticar ausencia de captación en el rastreo fue del 57 y del 86 % respectivamente. (Tabla 19)

Sin Captación en el rastreo	TG Sérica +	TG Sérica -	
ARNm de Tiroglobulina +	5	13	18
ARNm de Tiroglobulina -	2	27	29
	7	40	47

Tabla 19: ARNm de Tiroglobulina y Tiroglobulina Sérica en ausencia de captación.

4.- ARNm DE TIROGLOBULINA EN PACIENTES CON RASTREO NEGATIVO Y TIROGLOBULINA NEGATIVA

En este grupo de pacientes sin enfermedad residual aparente (rastreo negativo con tiroglobulina negativo), hemos encontrado un elevado número de pacientes (13) con ARNm de Tiroglobulina positivo (87%). Correlacionamos la positividad o negatividad del ARNm de Tiroglobulina en este grupo de pacientes con algunos factores considerados de riesgo de presentar recurrencia: la existencia de metastasis a lo largo de la evolución del tumor, tamaño del tumor, histología del mismo y sexo o edad del paciente al diagnóstico. Estas correlaciones las establecimos en situación de hipotiroidismo, pues como se expone anteriormente, según nuestros datos la técnica muestra más sensibilidad en esta situación, que en eutiroidismo.

ARNm positivo y Metastasis: Si comparamos la positividad del ARNm de Tiroglobulina en este grupo con la existencia o no de metastasis (local o a distancia) previa, documentada en rastreo u otra prueba de imagen, obtenemos que de 18 pacientes con ARNm de Tiroglobulina negativo, 6 (33,3%) habían presentado metastasis en algún momento de la evolución del tumor y 12 (66%) no la habían presentado. Dentro del grupo en el que el ARNm de Tiroglobulina resultó positivo, en total 21 pacientes, 11 (52,4%) tenían documentada la presencia de metastasis y 10 no la tenían. $P= 0,19$ (ns) (Tabla 20)

	<i>Metastasis Previa</i>	<i>No Metastasis Previa</i>	
<i>ARNm de Tiroglobulina +</i>	11	10	21
<i>ARNm de Tiroglobulina -</i>	6	12	18
	17	22	39

Tabla 20: Positividad de ARNm de Tiroglobulina en función de metastasis previa

ARNm positivo y tamaño del tumor: Si comparamos la positividad del ARNm de Tiroglobulina en este grupo con el tamaño tumoral, encontramos que 8 de los 18 pacientes con ARNm de Tiroglobulina negativo tenían un tamaño menor a 2 cm, otros ocho un tamaño entre 2 y 4 cm, y sólo 2 un tamaño superior a 4 cm. En el grupo de pacientes con ARNm de Tiroglobulina positivo (n=21), 10 tenían un tamaño inferior a 2 cm, 10 un tamaño entre 2 y 4 cm y 1 paciente un tumor con más de 4 cm. (Tabla 21)

TAMAÑO	< 2 cm	2 a 4 cm	> 4 cm	
ARNm de Tiroglobulina +	10	10	1	21
ARNm de Tiroglobulina -	8	8	2	18
	18	18	3	39

Tabla 21: Positividad de ARNm de Tiroglobulina en función del tamaño del tumor

ARNm positivo e histología del tumor: Si comparamos la positividad del ARNm de Tiroglobulina en este grupo con la histología tumoral, encontramos entre los 18 con ARNm negativo 5 pacientes diagnosticados de carcinoma folicular, 9 de carcinoma papilar convencional y 4 de alguna variante de carcinoma papilar (2 variantes foliculares, 1 columnar y otra células altas). Entre los positivos encontramos 6 carcinomas foliculares, 10 papilares convencionales y 4 variantes (1 tumor Hürthle y 3 papilares variantes células altas). (Tabla 22)

HISTOLOGÍA	CA Papilar Convencional	CA Folicular	
ARNm de Tiroglobulina +	10	9	19
ARNm de Tiroglobulina -	7	5	12
Variantes Histológicas	4	4	8
	21	18	39

Tabla 22: Positividad de ARNm de Tiroglobulina en función de la histología

ARNm positivo y edad al diagnóstico: Si comparamos la positividad del ARNm de Tiroglobulina en este grupo con la edad de los pacientes en el momento del diagnóstico, encontramos que de los 21 pacientes con test positivo, 8 tenían más de 45 años al diagnóstico y 2 menos de 16 años (10 de 21, 47%) y de los 18 pacientes con test negativo 4 tenían más de 45 años al diagnóstico y 2 menos de 16 (6 de 18, 33%) p ns. (Tabla 23)

EDAD AL DIAGNÓSTICO	<16 AÑOS	17 A 45 AÑOS	>45 AÑOS	
ARNm de Tiroglobulina +	2	8	11	21
ARNm de Tiroglobulina -	2	4	12	18
	4	12	23	39

Tabla 23: Positividad de ARNm de Tiroglobulina en función de la edad al diagnóstico

ARNm positivo y sexo: Por último si relacionamos la positividad del ARNm de Tiroglobulina en este grupo con el sexo de los pacientes, encontramos que de los 18 que presentan ARNm de Tiroglobulina negativo, 12 son mujeres y 6 hombres (66 y 33 % respectivamente), mientras que de los 21 con test positivo 17 son mujeres y 4 hombres (80 y 20 % respectivamente). P ns. (Tabla 24)

SEXO	MUJER	VARÓN	
ARNm de Tiroglobulina +	17	4	21
ARNm de Tiroglobulina -	12	4	18
	29	8	39

Tabla 24: Positividad de ARNm de Tiroglobulina en función del sexo.

5.- ARNm DE TIROGLOBULINA EN PACIENTES CON RASTREO NEGATIVO Y TIROGLOBULINA POSITIVA

Con estas características tenemos en la muestra 10 pacientes en situación de TSH elevada y 5 en situación de TSH normal o suprimida. De los 15 pacientes 13 resultaron positivos para la detección de ARNm de Tiroglobulina y sólo dos resultaron negativos (Tabla 25). En 4 pacientes a los que se les ha realizado Tomografía de Emisión de Positrones se apreciaron metastasis locales o a distancia.

RASTREO - Y TG +	
ARNm de Tiroglobulina +	13
ARNm de Tiroglobulina -	1
	15

Tabla 25: ARNm de Tiroglobulina en pacientes con anticuerpos rastreo negativo y Tiroglobulina elevada.

6.- ARNm DE TIROGLOBULINA EN PACIENTES CON ANTICUERPOS ANTI-TIROGLOBULINA (ANTI-TG) ELEVADOS

Evaluamos los resultados obtenidos en los pacientes que presentan anticuerpos elevados contra la Tiroglobulina. Se tomaron un total de 16 pacientes con estas características, de los cuales 3 presentaron ARNm de tiroglobulina positivo y rastreo positivo y otros dos ARNm de tiroglobulina negativo también con rastreo positivo, mientras que 9 presentaron ARNm de tiroglobulina negativo y rastreo negativo y sólo 2 ARNm de tiroglobulina positivo con rastreo negativo. (Tabla 26)

La sensibilidad de la técnica es del 60% con una especificidad con respecto al rastreo del 80%. No realizamos el cálculo por grupos por falta de muestra.

	RASTREO POSITIVO	RASTREO NEGATIVO	
ARNm de Tiroglobulina +	3	2	5
ARNm de Tiroglobulina -	2	9	11
	5	10	16

Tabla 26: ARNm de Tiroglobulina en pacientes con anticuerpos Anti-TG elevados.

7.- COMPARACIÓN DE LOS PACIENTES CON DETERMINACIÓN DE ARNm DE TIROGLOBULINA EN HIPO Y EUTIROIDISMO

Un total de 47 pacientes fueron estudiados en ambas situaciones, hipo tiroidismo y eutiroidismo (Tabla 27), Bajo el estímulo de TSH , 34 pacientes fueron positivos al evaluar la existencia de ARNm de Tiroglobulina, y 13 fueron negativos. Con TSH normal o suprimida 22 de los mismos persistían positivos y 12 se habían negativizado. 13 pacientes no presentaron ARNm de Tiroglobulina positivos en ninguna de las dos situaciones.

	<i>ARNm de Tiroglobulina+ en Eutiroidismo</i>	<i>ARNm de Tiroglobulina- en Eutiroidismo</i>	
<i>ARNm de Tiroglobulina + en Hipotiroidismo</i>	22	12	34
<i>ARNm de Tiroglobulina - en Hipotiroidismo</i>	0	13	13
	22	25	47

Tabla 27: Comparación del ARNm de Tiroglobulina en Hipotiroidismo y Eutiroidismo.

De los 13 pacientes con ambas determinaciones de ARNm de Tiroglobulina negativas. 9 tenían el rastreo pretratamiento negativo, por lo que éste no fue preciso. Los otros 4 pacientes si recibieron I¹³¹ tras el primer rastreo, que fue positivo para restos extratiroideos. De estos 4 que recibieron tratamiento, dos no presentaron captación en el realizado tras la administración del radioyodo, aunque en uno de los casos la Tiroglobulina sérica también permaneció elevada. Los otros 2 pacientes presentaron captación extratiroidea y Tiroglobulina sérica elevada en ambos rastreos.

De los 12 pacientes que negativizaron su resultado tras introducir el tratamiento con Tiroxina, 5 habían recibido tratamiento con I¹³¹ entre ambas

determinaciones por presentar 3 pacientes captación extratiroidea y otros 2 en el lecho tiroideo, negativizándose también la tiroglobulina en 4 de ellos. 7 pacientes presentaron ARNm de Tiroglobulina positivo en hipotiroidismo y negativo en eutiroidismo sin que se instaurara ningún tratamiento entre ambas muestras, y en todos ellos se negativizó también la determinación de Tiroglobulina plasmática.

Otros 22 pacientes con CDT estudiados presentaron ambas determinaciones positivas en las dos situaciones. 5 de esos pacientes presentaron captación fuera del lecho tiroideo en las dos exploraciones, antes y después del tratamiento con I^{131} así como Tiroglobulina sérica elevada. 3 pacientes presentaron captación en el lecho tiroideo en el primer rastreo, pero a pesar de negativizarse el mismo tras el tratamiento con I^{131} , permanecieron con Tiroglobulina sérica elevada además de ARNm de Tiroglobulina elevado en ambas situaciones. 7 pacientes mostraron rastreo positivo, 6 de ellos restos en el lecho tiroideo, en la primera determinación, y rastreo y Tiroglobulina sérica negativa en la segunda, tras el tratamiento con I^{131} , a pesar de lo cual la determinación de ARNm de Tiroglobulina permaneció elevada. Tres pacientes presentaban rastreo negativo con Tiroglobulina sérica negativa desde la primera determinación, a pesar de lo cual la detección de ARNm de Tiroglobulina se produjo en ambas determinaciones. Por último reseñar que de los 4 pacientes con Tiroglobulina sérica elevada en Hipotiroidismo con rastreo negativo, sólo uno mantuvo la tiroglobulina sérica elevada en eutiroidismo, mientras que todos mantuvieron el ARNm de Tiroglobulina detectable en sangre periférica.

DISCUSIÓN

A pesar de los avances que se han producido en los últimos años, los pacientes afectos de CDT siguen presentando una elevada tasa de recurrencia, en torno al 20-30%¹⁴⁵ y precisan de un estricto seguimiento a lo largo de sus vidas para detectarla cuando aparezca y aplicar el tratamiento pertinente lo más precozmente posible. La escasa mortalidad de estos tumores⁶, hace que incluso con su escasa incidencia, un elevado número de pacientes se encuentren actualmente controlados mediante seguimientos periódicos por Endocrinólogos en todo el mundo.

Actualmente los dos métodos fundamentalmente utilizados para el seguimiento en el CDT son los rastreos periódicos con I¹³¹ y la detección de Tiroglobulina sérica por métodos de inmunoensayo¹⁴⁵. Sin embargo, y a pesar de que son los métodos más usados, presentan algunos inconvenientes. El elevado número de falsos negativos⁸⁵ que aparecen en los rastreos con I¹³¹, estimados en más de un tercio de los mismos, hace que esta técnica por sí sola no sea suficiente para el seguimiento de estos pacientes. Otro inconveniente a tener en cuenta es la necesidad de realizar esta exploración bajo estimulación con TSH, dado los síntomas que aparecen en los pacientes como consecuencia del abandono de la medicación, necesaria para conseguir cifras elevadas de TSH. En cuanto a la determinación de Tiroglobulina por métodos de inmunoensayo, además de que también precisa de la retirada del tratamiento con Levotiroxina para obtener una sensibilidad óptima, presenta varios inconvenientes: 1- En un elevado número de casos su determinación queda invalidada por la presencia en sangre de anticuerpos anti-Tiroglobulina⁹², que invalidan su determinación. Se trata de un factor de confusión ensayo-independiente, por tanto la determinación de Tg siempre ha de acompañarse de la determinación de anticuerpos anti-Tiroglobulina. 2- La existencia de Tiroglobulina llamada "inmunológicamente inerte". Se han encontrado variantes en los epítomos que expresa la Tiroglobulina sintetizada por los CDT, y esto puede alterar la detección analítica de la misma, detectando valores falsamente disminuidos y 3- La variabilidad de los resultados obtenidos usando diferentes ensayos⁹⁰ e incluso la propia variedad intraensayo dificulta la cuantificación de los resultados.

La aparición en los últimos años de técnicas para detectar células tumorales circulantes en el torrente sanguíneo, llamadas técnicas de detección de enfermedad mínima residual, ha revolucionado y modificado el seguimiento de diferentes neoplasias de origen hematológico y tumores epiteliales sólidos¹²⁵. La irrupción de esta técnica ha sido posibilitada por el hecho de que se puede amplificar ARNm por medio de RT-PCR en unas condiciones mucho más favorables que las de años anteriores.

El primero que aplicó esta técnica al CDT fue Ditzkoff¹³², que utilizando una RT-PCR para ARNm de Tiroglobulina con 35 ciclos estudió 78 casos de pacientes afectos de esta neoplasia. Fue capaz de detectar unas 20 células/ml de sangre periférica. Dos años después Ringel publicó su primer trabajo¹³⁴, en el que mediante un método de RT-PCR cualitativo conseguía la detección de ARNm de Tiroglobulina en sangre periférica con una sensibilidad de 3 células/ml in vitro y unas 10 células/ml en pacientes reales. La RT-PCR usada por él tenía 40 ciclos y con ella consiguió detectar células circulantes en controles normales, y sólo ausencia de enfermedad mínima residual cuando los pacientes eran tiroidectomizados y posteriormente radiados con radioyodo.

A raíz de esta publicación nosotros nos planteamos estudiar nuestros casos siguiendo el método de este autor y tratando de reproducirlo en nuestro medio. Para ello usamos los mismos cebadores y los mismos ciclos de RT-PCR. Con tejido tiroideo extraído de pacientes sin CDT realizamos las primeras pruebas de sensibilidad del método y una vez conseguido visualizar la banda correspondiente al ARNm de Tiroglobulina, tratamos de acercarnos a un rango de detección de células tiroideas en sangre similar al que alcanzaba Ringel en su experimento. En gel de agarosa conseguimos ver banda hasta en diluciones de 10 células /ml de sangre, cumpliendo el objetivo inicial de mantenemos en el mismo rango de este autor. Una vez comenzamos a realizar casos de pacientes apreciamos que visualizar la banda en gel de agarosa sólo se conseguía en pacientes con enfermedad metastásica extensa, por lo que decidimos hibridar con sonda interna, encontrando que por este método aumentábamos en al menos 100 veces la sensibilidad del método. Ya Ringel planteó en su trabajo la necesidad de, en muchos

pacientes, hibridar con sonda interna para detectar células circulantes en el torrente sanguíneo, aunque no especifica cuales ni cuantos. De esta manera no sólo visualizábamos banda en los pacientes con metastasis local o a distancia sino también en controles sanos y en algunos con aparente curación de la enfermedad, hecho que posteriormente discutiremos con mas extensión.

Posteriormente al inicio de nuestro trabajo han aparecido otros que hacen referencia a la detección de ARNm de Tiroglobulina. El propio Ringel desarrolló un método cuantitativo de detección mediante de RT-PCR en tiempo real¹³⁶, con el que conseguía una sensibilidad parecida, pero cuantificando la cantidad de ARNm de Tiroglobulina. En su trabajo demuestra positividad en todos los controles, al igual que sucede en nuestro grupo, así como una gradación en la positividad en función del tipo de metástasis. Los pacientes con supuesta ausencia de enfermedad presentaban una positividad para ARNm de Tiroglobulina en más de un 30% de los casos, punto este último que se reproduce e incluso aumenta en nuestro trabajo. En febrero de este año Savagner¹⁴⁶ publica un estudio usando también un método de RT-PCR en tiempo real en el que además de confirmar los datos de Ringel sobre positividad de controles introduce algunas variables de interés como un punto de corte para positividad del test estimado en 1 pg ARNm de Tiroglobulina/ μ g de ARN total, lo que equivale a aproximadamente 1 célula/ml, rango en el que también nos movemos nosotros cuando hibridamos con sonda interna. La aparición de estos métodos cuantitativos hizo que nos replanteáramos la utilidad de realizar una aproximación semicuantitativa a los resultados obtenidos en los casos por nuestro método, dado que su comparación con los métodos de RT-PCR en tiempo real no era posible y no podía llegar a ser tan específica. A la luz de los resultados no se estimo oportuno realizar dicha cuantificación.

Otros métodos se han utilizado para obtener ARNm de Tiroglobulina de sangre periférica, fundamentalmente Nested PCR, técnica que no parece aportar nada sobre la RT-PCR convencional con un elevado número de ciclos.

Por tanto en nuestro trabajo usamos un método de detección de ARNm de Tiroglobulina mediante RT-PCR cualitativa, obteniendo los resultados primero en

gel de agarosa y posteriormente hibridando con sonda interna, y consiguiendo un rango de detección de ARNm de Tiroglobulina circulante similar al de los estudios que utilizan métodos cuantitativos, llegando a detectar una sola célula circulante en 1 ml de sangre en el torrente sanguíneo.

Aunque a finales del año 2001 aparecen varias publicaciones que pretenden relativizar la utilidad del método, estas no parecen suficientemente convincentes, dado que presentan a nuestro entender fallos metodológicos importantes, como ser realizados con grupos de pacientes que no habían sido previamente tratados con radioyodo tras la cirugía, que les restan credibilidad^{139, 140}.

Sensibilidad y especificidad del ARNm de Tiroglobulina en los pacientes con CDT

Como primer análisis de los resultados, consideramos como pacientes con enfermedad activa o residual a todos aquellos que presentaban rastreo con I¹³¹, tiroglobulina sérica o ambos test positivos y evaluamos la sensibilidad y especificidad de la técnica de ARNm de Tiroglobulina tanto en situación de hipotiroidismo como de eutiroidismo. En los estudios descritos en la literatura no se hace este tipo de comparación, sino que comparan ARNm de Tiroglobulina con la determinación de Tiroglobulina sérica, referenciando ambos métodos al rastreo con I¹³¹. Nosotros estimamos oportuno este análisis, pues es con estos datos con los que nos manejamos clínicamente a la hora de tomar decisiones terapéuticas con el paciente, bien administrar dosis terapéuticas de I¹³¹ o localizar el tumor con otros medios diagnósticos, para posteriormente intervenirlo quirúrgicamente si es posible.

En cuanto a la sensibilidad del ARNm de Tiroglobulina en función de estos parámetros y con TSH elevada, esta es del 86%, no siendo capaz de localizar enfermedad en 7 de los 51 pacientes que en principio la presentan. La especificidad sin embargo del test, siempre referenciado a rastreo y/o tiroglobulina positivo es muy baja, del 46%. Hasta un total de 21 de los 39 pacientes aparentemente libres de enfermedad presentaron el test positivo. Este hecho que bien puede suponer que

existan falsos positivos, bien una superior capacidad del test sobre el “Gold Estándar” actual.

Cuando suprimimos la TSH mediante tratamiento con Levotiroxina la sensibilidad del método con respecto a estos parámetros baja ligeramente, siendo del 69%, no detectando 4 de los 13 pacientes con aparente enfermedad recurrente. La especificidad del método sin embargo se elevó en este grupo, dado que 26 de los 39 pacientes aparentemente libres de enfermedad son negativos para la detección de ARNm de Tiroglobulina, lo que supone una especificidad del 67%.

Como ya se reseñó previamente no se pueden comparar estos resultados a los de las otras series, dado que se incluyen a los pacientes con rastreo negativo y Tiroglobulina alta, pero si se cumplen algunos aspectos que se repiten en dichas series. Existe un número determinado de pacientes, 7 en hipotiroidismo y 4 en eutiroidismo que, a pesar de tener enfermedad residual presente son negativos para la detección de ARNm de Tiroglobulina. Dos de estos pacientes se estudiaron en situación de hipotiroidismo y eutiroidismo, y ambas determinaciones resultaron negativas, lo que sugiere que estos pacientes presenten alguna característica especial que los haga negativos a la detección de ARNm de Tiroglobulina. Los otros casos sólo se estudiaron en una de las 2 situaciones.

Tallini fue el primero en presentar un caso similar¹³³, pero también otros autores que han usado métodos aparentemente más sensibles como Ringel¹³⁶ o Savagner¹⁴⁶ refieren negatividad de su test en pacientes con enfermedad a distancia. Este último autor en su trabajo identifica una serie de alteraciones en la secuencia normal de ARNm de la Tiroglobulina sérica, que podrían determinar la no detección de esta con los cebadores utilizados, aunque él mismo tampoco es capaz de detectar todos los pacientes que “deberían” ser positivos a pesar del estudio detallado de las alteraciones en las secuencias de nucleótidos del ARNm. Bellantone¹⁴¹ sólo obtuvo positividad para ARNm de Tiroglobulina en 1 de los 5 pacientes de su serie con enfermedad metastásica, y sugiere que la técnica no es útil en los Carcinomas Foliculares y si en los Cacinomas Papilares, dado que sus 4 aparentes falsos negativos ocurrieron en pacientes con Carcinomas Foliculares.

Ninguno de los otros autores hace referencia a esta excepción con los Carcinomas Foliculares, ni nosotros lo apreciamos en nuestra serie pues un total de hasta 18 Carcinomas Foliculares resultaron positivos para la detección de ARNm de Tiroglobulina.

Parece que la técnica, aún sensible, no es capaz de detectar el 100% de los pacientes con enfermedad residual, por lo que, como postula Ringel en su último trabajo¹³⁶, la detección de ARNm de tiroglobulina y la determinación de tiroglobulina sérica deben ser complementarias, pues la primera nos informaría de la cantidad de células circulantes por el torrente sanguíneo y la segunda de la función de las mismas, además de que un menor número de pacientes serían erróneamente diagnosticados de "Libre de enfermedad".

En cuanto a la especificidad de la técnica los resultados hacen plantearse dos posibilidades, bien se trata de un método con un alto número de falsos positivo o bien es mucho más sensible que las técnicas actuales para detectar enfermedad residual. La especificidad de nuestra serie, que se sitúa en un 46% en hipotiroidismo y en un 66% en eutiroidismo, indica que un muy elevado número de pacientes aparentemente curados presentan el test positivo. Revisando la literatura ya Ditkoff en su estudio¹³² refería la detección de ARNm de Tiroglobulina en 7 de 78 pacientes con aparente ausencia de enfermedad. Lo mismo ocurre en la primera serie de Ringel¹³⁴ y en la de Bellantone¹⁴¹, que usan métodos cualitativos para la detección de ARNm de Tiroglobulina y presentan en torno a un 20% de positividad en sujetos aparentemente curados. El propio Ringel¹³⁶ y Savagner¹⁴⁶, que han utilizado métodos cuantitativos para la detección de ARNm de Tiroglobulina han confirmado la existencia de células tiroideas circulantes en pacientes sin aparente enfermedad residual. El segundo autor valora los resultados con y sin elevación de la TSH y demuestra un mayor número de células circulantes si se estimula con ésta. Este último dato concuerda perfectamente con lo obtenido en nuestro estudio, en cuanto a la mejor especificidad en eutiroidismo y sobre todo en la negativización de la positividad para ARNm de Tiroglobulina en 7 pacientes con la sola modificación de reiniciar el tratamiento sustitutivo.

Por tanto parece claro que mediante la detección de ARNm de tiroglobulina por métodos de RT-PCR se detectan una serie de pacientes con CDT aparentemente curados según las técnicas convencionales de detección, que presentan positividad para el test. También parece probado que la positividad del mismo está muy en relación con la estimulación o no con TSH, lo cual, al igual que ocurre con la tiroglobulina, modula la mayor o menor expresión de estos marcadores. Por otro lado los ensayos realizados en pacientes con tiroglobulina elevada y rastreo negativo a los que se les ha administrado una dosis de 100 mCi de I^{131} demuestran la existencia de captación en el rastreo postratamiento en un 72%^{64, 99} e incluso en el 94%¹⁰⁰ de los casos tratados, a pesar de que aparentemente y en el primer rastreo estaba libre de enfermedad, lo cual nos lleva a pensar que la negatividad en la captación de algunos pacientes no implica su ausencia de enfermedad. Probablemente la positividad para ARNm de Tiroglobulina en sangre implica la presencia de células tiroideas circulantes por el torrente sanguíneo, que no son detectables por los rastreos con I^{131} ni por la determinación de Tiroglobulina sérica.

Otro tema a discutir es que si se demuestra, como parece, que la detección del ARNm de Tiroglobulina en sangre periférica es capaz de detectar enfermedad mínima residual en estos pacientes, ésta tenga una implicación en el pronóstico futuro de la enfermedad. Siguiendo el ejemplo del tratamiento con I^{131} en pacientes con rastreos negativos, la aparición de tejido tiroideo residual o metastásico en estos pacientes en el rastreo postratamiento no se correlacionó con una mejor evolución de los mismos ni en una mejoría de los niveles de Tiroglobulina séricos. Es decir, el papel que juega la presencia de enfermedad mínima residual en la futura aparición de metastasis clínicamente activa y los factores que desencadenarían la aparición de la misma están aún por determinar en los pacientes con CDT y sólo el seguimiento a medio y largo plazo de estos enfermos nos permitirá conocerlo. En otros tipo de tumores en los que la detección de enfermedad mínima residual también se lleva a cabo, como por ejemplo en próstata, si parece que la negativización de la prueba tras recibir tratamiento puede estar relacionada con una mayor supervivencia¹⁴⁷, aunque los resultados son aún preliminares y, en este campo, esta prácticamente todo por hacer.

Dado que el seguimiento prospectivo de los pacientes requiere tiempo, tratamos en nuestro estudio, mediante análisis retrospectivo, de determinar si algún factor pronóstico pudiera predecir la positividad de la detección de ARNm de Tiroglobulina en este grupo de pacientes. Analizamos diferentes factores como la presencia o no de metastasis previas, la histología y el tamaño tumoral, la edad al diagnóstico y el sexo y lo relacionamos con el resultado del test en los pacientes aparentemente libres de enfermedad.

Cuando analizamos la existencia de metastasis, local o a distancia, detectable por los métodos convencionales en algún momento de la evolución de la enfermedad, apreciamos que mientras sólo 6 de los 18 pacientes con ARNm de Tiroglobulina negativo tenían documentada metastasis, 11 de los 21 pacientes con ARNm de Tiroglobulina detectable la habían presentado. A pesar de que la diferencia no alcanzó significación estadística si se aprecia una tendencia importante a la mayor presencia de metastasis en el grupo de ARNm de Tiroglobulina detectable que en el de no detectable. Bellantone ofrece unos resultados muy parecidos en su serie¹⁴¹, aunque sólo con Carcinomas Papilares, no con los Carcinomas Foliculares.

Esta tendencia puede tener importancia, dado que si la técnica es muy sensible para la detección de células circulantes, es lógico pensar que en algunos de aquellos pacientes que habían presentado metastasis y por tanto células circulantes aún las mantengan en el torrente sanguíneo, y que este fenómeno se produzca con mayor frecuencia en los pacientes que ya habían presentado metastasis alguna vez, que en aquellos que no la habían presentado. La negatividad a las tres técnicas de detección en el grupo que nunca ha presentado metastasis podría hacernos diferir las revisiones periódicas dado que se trataría de un grupo de bajo riesgo. A la inversa, la positividad a ARN de Tiroglobulina podría determinar un seguimiento más estrecho para detectar precozmente la posible aparición de metastasis detectables por métodos convencionales y, tal vez en un futuro, poner en marcha algún tipo de tratamiento, que sería ¹³¹I si se demuestra una disminución de mortalidad en el grupo de tratados con rastreos negativos.

En cuanto al resto de factores de riesgo que relacionamos con la positividad o negatividad de la detección de ARNm de Tiroglobulina en sangre, en este grupo de pacientes, no encontramos relación entre ninguno de ellos y la detección de ARNm de Tiroglobulina. El sexo y la edad al diagnóstico, factores pronóstico de tipo epidemiológico, no predecían la positividad o negatividad del test, ni tampoco lo hacen el tamaño ni la histología del tumor. Es importante reseñar que a diferencia de lo que sucede en el estudio de Bellantone¹⁴¹, tenemos la misma sensibilidad para detectar CDT en cualquiera de sus variedades, incluidos los Carcinomas Foliculares. Las variantes histológicas de los carcinomas Papilares y Foliculares no se asocian a la positividad de ARNm de Tiroglobulina, aunque el número de sujetos en estudio es pequeño (n=8) para establecer conclusiones.

Comparación de ARNm de Tiroglobulina y Tiroglobulina sérica

Uno de los objetivos del estudio es establecer una comparación entre la determinación de ARNm de Tiroglobulina y Tiroglobulina Sérica. Para realizar esta comparación enfrentamos ambas técnicas entre sí referenciadas al resultado del rastreo en situación de Hipo y Eutiroidismo. El resultado del rastreo se dividió en tres grupos, Captación extratiroidea, Captación en el lecho tiroideo y ausencia de captación, tal y como realizan el resto de autores en sus series. La tiroglobulina se consideraba positiva cuando era > de 3 ng/ml como indicamos anteriormente pues es el punto de corte que mejor correlaciona con enfermedad en nuestro medio. En Hipotiroidismo, con TSH > de 30 U/l, el ARNm de Tiroglobulina resultó positivo en 68 de 100 pacientes estudiados, mientras que la Tiroglobulina sérica resultó positiva en 51 pacientes. El acuerdo entre ambos test diagnósticos fue débil, es decir que no hay una asociación fuerte entre ambos.

Si evaluamos los resultados por grupos, observamos que dentro del grupo de pacientes que presentan captación extratiroidea, bien metastasis a distancia o locales, un 80% tenían positividad para ARNm de Tiroglobulina y un 88% para Tiroglobulina sérica. La medida de acuerdo entre ambas técnicas era mejor que la obtenida de manera global, alcanzando un coeficiente κ superior a 0,5. Revisando

las series previas encontramos que la mayoría de los autores han realizado las determinaciones en situación de eutiroidismo, por lo que los datos existentes son escasos. Ringel en su estudio inicial¹³⁴ hace referencia a 4 pacientes que presentaban captación fuera del lecho tiroideo y todos presentaban ambas técnicas positivas. En el segundo estudio¹³⁶ hace referencia a que los 23 pacientes estudiados tienen resultados similares a los estudiados en hipotiroidismo, pero no los detalla. Por último Bellantone¹⁴¹ realiza toda su serie (n= 66) con TSH elevada, y refiere una concordancia muy alta entre los dos métodos, pero tampoco los detalla en su publicación.

Similares resultados obtenemos cuando comparamos los resultados de ambas técnicas en los pacientes que presentan captación sólo en el lecho tiroideo (n=20) ya que 17 de ellos presentaban ambas técnicas positivas, 1 ARNm de Tiroglobulina positivo y Tiroglobulina sérica negativa, otro a la inversa y el último ambas negativos. En esta situación también encontramos una alta correlación entre ambos métodos, y los resultados en la bibliografía también refieren un alto grado de concordancia¹⁴¹.

Por tanto en aquellos pacientes con rastreo positivo dentro o fuera del lecho tiroideo, la detección de ARNm de Tiroglobulina y la de Tiroglobulina sérica en situación de Hipotiroidismo tienen un alto nivel de concordancia y ambas diagnostican la mayoría de los pacientes con rastreo positivo. No se observa en este grupo ninguna ventaja en la utilización de uno u otro método.

Los dos métodos difieren sustancialmente cuando evaluamos los pacientes con rastreos negativos, es decir en ausencia de captación. En este grupo, 30 de los 55 pacientes presentaban ARNm de Tiroglobulina elevada, mientras que sólo 10 de los 55 pacientes presentaban Tiroglobulina sérica elevada. La concordancia entre ambos métodos medida por el coeficiente κ es muy baja, lo que indica una importante disparidad entre los dos métodos. Si se confirmase la asociación de positividad del ARNm de Tiroglobulina con peor pronóstico, la técnica de elección sería esta, pero de no ser así el alto número de falsos positivos la haría una técnica poco útil. En la literatura también aparecen un elevado número de

positividades al ARNm de Tiroglobulina¹⁴¹ (20%), pero no las correlacionan con la tiroglobulina Sérica.

La mayoría de las series publicadas evalúan a los pacientes en situación de Eutiroidismo, mientras toman Levotiroxina como tratamiento sustitutivo, por lo que la comparación con otros métodos es más factible. Con TSH normal se obtuvieron un total de 42% de resultados positivos para la detección de ARNm de Tiroglobulina en sangre, mientras que sólo el 22% de los casos presentaron Tiroglobulina sérica elevada. La concordancia entre las dos técnicas fue débil, como veremos posteriormente debido al elevado número de resultados positivos para ARNm de Tiroglobulina en pacientes con ausencia de captación en el rastreo.

En situación de eutiroidismo, de los 9 pacientes con captación fuera o dentro del lecho tiroideo, 7 presentaron ARNm de Tiroglobulina y Tiroglobulina sérica elevados y dos fueron negativos para ambos test. Estos dos pacientes también presentan ARNm de Tiroglobulina negativo en Hipotiroidismo. Por tanto la sensibilidad de ambos test para los pacientes con captación fuera del lecho tiroideo es del 83% mientras que para la captación dentro del lecho tiroideo es del 66%. La concordancia entre ambos métodos fue total en ambos grupos. Dentro de las series publicadas sobre la detección de enfermedad mínima residual en CDT los resultados son similares. Ditkoff detectó todos los pacientes (n=9) que presentaban metástasis según el rastreo, pero no dice nada sobre los que presentaban restos tiroideos¹³². Tallini obtuvo resultados menos prometedores, ya que sólo alcanzó a detectar ARNm de Tiroglobulina en el 50% de los pacientes con rastreos positivos, y tampoco realizó determinación de tiroglobulina a todos los paientes¹³³.

Ringel fue el primero en comparar los resultados de ambas técnicas enfrentándolas al rastreo, y a diferencia de los resultados que obtenemos nosotros, refiere que un 100% de los pacientes con captación fuera del lecho tiroideo presentaba ARNm de Tiroglobulina positivo mientras que sólo un 53% presentaba Tiroglobulina sérica positivo. Similares resultados obtuvo en los pacientes con captación en el rastreo en el lecho tiroideo, pues un 63% de ellos presentaban ARNm de Tiroglobulina detectable y sólo un 21% Tiroglobulina sérica positiva. En el

segundo trabajo publicado por este autor, utilizando un método cuantitativo¹³⁶, obtuvo una sensibilidad del 94% para metastasis a distancia, 89% para metastasis locales y 75% para captación en el lecho tiroideo con la detección de ARNm de Tiroglobulina, mientras que la tiroglobulina sérica obtuvo unos resultados mucho más pobres 86% en metastasis a distancia, 60% en metastasis locales y 15% en restos tiroideos. De nuevo en este estudio establece una clara diferencia entre ambos métodos en Eutiroidismo, cosa que como hemos reseñado no se produce en nuestra serie. Biscolla y su grupo¹³⁷ analizan un menor número de pacientes con captación en el rastreo encontrando una total concordancia entre ambos métodos en los que presentaban captación fuera del lecho tiroideo, 2 de 3 pacientes con ambas técnicas positivas, y un menor acuerdo en los que presentan restos tiroideos en el rastreo, pues de los 8 pacientes sólo 4 presentaban ARNm de Tiroglobulina detectable y 2 Tiroglobulina sérica positiva.

Por tanto en el grupo de pacientes con rastreos positivos, ya sean en el lecho tiroideo o a distancia, en nuestra serie ambas técnicas son concordantes y obtienen una sensibilidad elevada, no obteniendo los resultados diferenciadores obtenidos por Ringel, que tampoco han confirmado estudios posteriores. Nosotros nos planteamos si, en parte, esta diferencia podría estar explicada por el método de detección de Tiroglobulina sérica empleado, que en su caso detecta un menor número de pacientes con metástasis.

En el grupo de pacientes con rastreo sin captación evaluados en eutiroidismo, encontramos una importante discordancia entre ambas técnicas, con un coeficiente $\kappa < 0,2$. Un total de 7 pacientes de 49 (14%) presentaron Tiroglobulina sérica positiva, mientras que 18 (37%) presentaron ARNm de Tiroglobulina elevado. Se puede observar que las proporciones se mantienen con respecto a la evaluación de los pacientes cuando están hipotiroideos, pero con menor número de positivos para ARNm de Tiroglobulina y Tiroglobulina sérica. La mayor parte de los estudios se han realizado con TSH normal o suprimida, y en todos ellos aparecían, al igual que en nuestra serie pacientes con ARNm de Tiroglobulina positivo, pero no todos lo han comparado con los niveles de Tiroglobulina sérica.

Ditkoff¹³² y Tallini¹³³ refieren un 10 y un 63% respectivamente de positividad para ARNm de Tiroglobulina en pacientes aparentemente curados en el momento de la determinación, pero no hacen referencia a la comparación con los niveles de tiroglobulina. Ringel en su primer trabajo, realizado con método cualitativo¹³⁴ si que evalúa ambos métodos, encontrando un 20% de positividad para ARNm de Tiroglobulina frente a un 5% de positividad para Tiroglobulina sérica en este grupo. En su segundo estudio, realizado con un método cuantitativo¹³⁶ el porcentaje de pacientes con CDT que presentaban ARNm de Tiroglobulina elevado era de un 38%, mientras que un 23% presentaban Tiroglobulina sérica elevada. Estos resultados, aunque no pueden ser extrapolados, son muy similares a los obtenidos por nosotros, lo que refuerza la idea de que nuestro método es tan sensible como el desarrollado por Ringel. Similar porcentaje de pacientes con ARNm de Tiroglobulina elevado se encuentra Blscola¹³⁷ en su serie (30%), aunque su método de detección de Tiroglobulina sérica sólo pudo detectar 1 caso de los 23 con aparente ausencia de enfermedad (4%). Por último Savagner en su trabajo recientemente publicado¹⁴⁶ indica un porcentaje de positividad de ARNm de Tiroglobulina del 18%, pero no hace referencia a la comparación con la Tiroglobulina sérica.

Por tanto todas las series publicadas presentan positividad para la detección de ARNm de Tiroglobulina en un grupo de pacientes con aparente curación de la enfermedad y en porcentajes variables, aunque cercanos en su mayoría al 30%. Pocas conclusiones podemos extraer de la literatura con respecto a la comparación con la Tiroglobulina sérica salvo con los trabajos de Ringel^{134, 136} que demuestran una menor cantidad de positivos de este último método con respecto a la del ARNm de Tiroglobulina.

En nuestras manos, ambos métodos demuestran una elevada concordancia en los pacientes con rastreo positivo fuera del lecho tiroideo o dentro del mismo, que se hace incluso total cuando los evaluamos en situación de eutiroidismo. La discordancia que aparece en el análisis global de los dos métodos, cuando los referenciamos a la positividad o no del rastreo, se fundamenta en la disparidad de resultados obtenidos en el grupo en el que el rastreo es negativo,

dado que hay una mayor cantidad de pacientes que presentan positividad para el ARNm de Tiroglobulina que para la Tiroglobulina sérica. Si esta diferencia importante significa una mayor sensibilidad del ARNm de Tiroglobulina o un mayor número de falsos positivos, sólo la evaluación de los pacientes a largo plazo nos permitirá conocerlo. En las condiciones actuales y teniendo en cuenta el elevado coste de la técnica y la laboriosidad de la misma, no entendemos justificada su aplicación de manera generalizada, sino solamente en grupos concretos y en investigación, hasta que se demuestre una verdadera significación pronóstica en este grupo de pacientes aparentemente sin enfermedad.

Utilidad de la detección de ARNm de Tiroglobulina en los pacientes con anticuerpos anti-Tiroglobulina elevados

Uno de los principales inconvenientes de la determinación de Tiroglobulina sérica es la presencia de anticuerpos anti-tiroglobulina, que invalidan la determinación dado que pueden infraestimar o supraestimar el valor de la misma. De hecho en el protocolo de rutina empleado en la mayoría de hospitales para el seguimiento del CDT se incluye la determinación de estos anticuerpos. El hecho de que estos anticuerpos aparezcan como reacción a la proteína Tiroglobulina no impide la medición del ARNm de la misma. Por tanto la utilización en este grupo de pacientes se postuló desde el principio como una de las mayores utilidades de la técnica.

En nuestra serie un total de 16 pacientes con positividad para anticuerpos anti-Tiroglobulina fueron estudiados, 10 con TSH elevada y 6 con TSH normal. El pequeño número de la muestra no permitía evaluarlos individualmente, pero de modo global la sensibilidad del método comparado con el rastreo fue de un 60% y la especificidad del 80%. Estos datos están muy mediatizados ya que 2 pacientes con rastreo positivo presentaron ARNm de Tiroglobulina negativo, a pesar de lo cual la utilidad de la técnica en este grupo es evidente, dado que podría evitarnos rastreos seriados en pacientes con negatividad para los rastreos y ARNm de Tiroglobulina negativo reiteradamente.

Los pacientes podrían ser seguidos mediante ARNm de Tiroglobulina, que sustituiría a la Tiroglobulina sérica en estos pacientes y mediante rastreos con mayor periodicidad.

En la literatura ha sido Ringel el que ha estudiado un grupo de pacientes con anticuerpos anti-Tiroglobulina elevados, en total 23, y en su publicación¹³⁶ no detalla los resultados obtenidos, limitándose a decir que son similares a los obtenidos en el grupo de pacientes con anticuerpos anti-Tiroglobulina positivos. Savagner¹⁴⁶ tampoco expone datos con este tipo de pacientes pero afirma que es la técnica de elección cuando los anticuerpos están elevados.

Detección de ARNm de Tiroglobulina en los pacientes con rastreo negativo y Tiroglobulina elevada

La existencia de pacientes con Tiroglobulina Sérica elevada y rastreo negativo ha supuesto durante mucho tiempo, y aún hoy lo supone, un auténtico reto para el clínico, pues este tiene que decidir en primer lugar si se trata de un falso positivo de la Tiroglobulina o un falso negativo del rastreo, y si decide lo segundo tratar de localizar los restos de tejido tiroideo con otros métodos de diagnóstico de imagen, para posteriormente intervenirlos o tratarlos con elevadas dosis de radioyodo para erradicar la enfermedad.

En nuestra serie estudiamos un total de 15 pacientes con Tiroglobulina sérica elevada, 10 en situación de Hipotiroidismo y 5 en eutiroidismo. De los 15 pacientes, 13 presentaban ARNm de Tiroglobulina elevado, lo que supone un 87% de los mismos. A 4 de los pacientes estudiados, todos ellos con ARNm de Tiroglobulina y Tiroglobulina Sérica positiva les realizamos técnica de PET, detectando enfermedad a distancia en todos ellos.

La causa de la no captación en el rastreo podría ser un déficit del gen transportador de sodio y yodo, aunque sobre esto han aparecido algunas publicaciones últimamente que parecen no confirmar los hallazgos iniciales¹⁴⁸. Por otro lado los resultados obtenidos por los autores^{64, 100} que han administrado dosis

elevadas de I^{131} , demostrando captación en aquellos pacientes que presentaban rastreo negativo cuando se realizaban según las dosis habituales, hacen pensar que efectivamente muchos de estos pacientes si tienen enfermedad residual. Savagner describe a 15 pacientes en esta situación de los cuales 9 presentaban ARNm de Tiroglobulina detectable.

En principio, y aunque no hay resultados suficientes para afirmarlo, esta técnica podría ser complementaria a la detección de Tiroglobulina Sérica en aquellos pacientes que la presentaran elevada con rastreo negativo, ya que confirmaría la presencia de enfermedad en el caso de ser positivo e indicaría la necesidad de hacer pruebas de localización de la enfermedad residual. La negatividad de esta técnica, sobre todo en el caso de niveles bajos de Tiroglobulina sérica podrían hablar de un falso positivo de la misma.

Comparación de los resultados de la detección de ARNm de Tiroglobulina en situación de hipo y eutiroidismo

A diferencia de otras series, en las que se evalúan los pacientes sólo en situación de eutiroidismo, nosotros evaluamos un elevado número de pacientes en 2 situaciones: hipotiroidismo y eutiroidismo. La primera determinación se produjo simultáneamente al rastreo y la comparamos con la Tiroglobulina Sérica extraída en ese mismo acto. La determinación en eutiroidismo se realizó unos meses tras la primera, una vez se había restaurado el nivel de TSH. El rastreo tomado como referencia en este caso fue el anterior si no había recibido I^{131} , y el siguiente rastreo, si en el primero se realizó tratamiento. La referencia de la que partíamos era el primer trabajo de Ringel¹³⁴ en el que se evaluó en situación de hipotiroidismo a 7 pacientes que previamente se habían estudiado en eutiroidismo y apreció que todas las determinaciones de ARNm de Tiroglobulina fueron positivas, tanto en los pacientes con rastreos negativos como en los que presentaban captación.

Analizamos un total de 47 pacientes con CDT en ambas situaciones, hipotiroidismo y eutiroidismo. Con TSH elevada un total de 34 pacientes (72%) presentaron positividad para la determinación de ARNm de Tiroglobulina, mientras

que sólo 22 pacientes (47%) la presentaron con TSH normal o suprimida, es decir que en 12 pacientes la detección de ARNm de Tiroglobulina se negativizó al evaluarlos en eutiroidismo. Otro dato de relevancia desde el punto de vista general es que ningún paciente presentó detección de ARNm de Tiroglobulina en eutiroidismo y negatividad en hipotiroidismo, lo que a nuestro entender le da validez interna al ensayo.

Un total de 13 pacientes presentaron determinación de ARNm de Tiroglobulina en sangre periférica negativa en situación de hipotiroidismo, manteniéndola en eutiroidismo. Nueve de ellos eran pacientes sin apariencia de enfermedad, en los que los 3 tests: rastreo, tiroglobulina sérica y ARNm de Tiroglobulina resultaron reiteradamente negativos. En principio este sería un grupo de bajo riesgo de recidiva, ya que sólo 3 de los 9 pacientes habían presentado alguna vez metastasis a distancia y actualmente estaban ya en situación de aparente remisión clínica. El seguimiento en este grupo de pacientes podría ser menos intenso, dado el resultado de esta técnica. Los otros 4 pacientes con ARNm de Tiroglobulina negativo en dos ocasiones eran diferentes. 2 de ellos presentaban ambos rastreos, el previo al tratamiento y el posterior, positivos, por lo que en principio se trata de pacientes no detectables por este método. Los otros 2 pacientes negativizaron su rastreo tras la administración de I^{131} a pesar de que en uno de ellos la Tiroglobulina permaneció elevada.

Un total de 34 pacientes presentaron ARNm de Tiroglobulina positivo en situación de hipotiroidismo. De estos 34 pacientes, 12 se negativizaron cuando se evaluaron con TSH frenada. Siete de ellos no se sometieron a tratamiento con I^{131} entre ambas determinaciones, por lo que fue la sola normalización de la TSH la que determinó la negativización de la prueba. En uno de los casos la Tiroglobulina sérica estaba elevada en situación de hipotiroidismo y también se negativizó en eutiroidismo.

Estos resultados globales son concordantes con lo expresado por Savagner¹⁴⁶, quien cuantificó el ARNm de Tiroglobulina no sólo en pacientes, también en controles, observando claramente como aquellos sometidos a terapia

supresora con Levotiroxina, generalmente por procesos nodulares, tenían menor cantidad de ARNm de Tiroglobulina en sangre que los que no hacían tratamiento. Los otros 5 pacientes negativizaron la determinación tras recibir I^{131} , negativizándose también el rastreo y la Tiroglobulina sérica en 4 de ellos. En este último grupo la negativización de la determinación de ARNm de Tiroglobulina predijo el resultado del siguiente rastreo en un 80% de los casos.

En el grupo de pacientes con ambas determinaciones de ARNm de Tiroglobulina elevado (n=22), podemos establecer 4 grupos diferenciados. Un primer grupo de pacientes con rastreo y Tiroglobulina sérica positivos antes y después del tratamiento, en los que la determinación de ARNm de Tiroglobulina no hace sino confirmar la existencia de metastasis (n=5).

Un segundo grupo lo formarían aquellos pacientes con rastreo y Tiroglobulina sérica negativos en ambas situaciones, en los que la determinación de ARNm de Tiroglobulina es positiva (n=3). En este grupo la presencia de enfermedad residual no ha podido ser evidenciada por los métodos habituales y sólo la evolución a largo plazo nos podrá aclarar si la determinación de ARNm de Tiroglobulina fue la detección precoz de la misma, o un falso positivo de la técnica

El tercer grupo lo forman los pacientes que presentaron captación el primer rastreo y tras la administración de I^{131} no presentaron captación en el siguiente (n=10). En 3 de ellos la Tiroglobulina sérica permaneció elevada con TSH normal, al igual que el ARNm de Tiroglobulina, mientras que en los otros 7 pacientes, la Tiroglobulina sérica se normalizó al medirla en eutiroidismo a diferencia del ARNm. Al igual que ocurre en el caso anterior, tras varios años de seguimiento podremos conocer cual de los dos métodos, Tiroglobulina sérica o ARNm de Tiroglobulina pronostico es más útil en cuanto a decidir el pronóstico.

Por último el grupo de pacientes (n=4) que presentaba Tiroglobulina sérica elevada en situación de hipotiroidismo, junto con ARNm de Tiroglobulina elevado y rastreo negativo. La determinación de Tiroglobulina sérica sólo se mantuvo elevada en un caso, mientras que el ARNm de Tiroglobulina se mantuvo

detectable en el 100% de los mismos. La sensibilidad del ARNm de tiroglobulina para detectar células circulantes en este grupo parece mayor, pues no se ve afectada por la supresión con TSH.

En cuanto a la capacidad de predecir el resultado del rastreo una vez se ha tratado con I¹³¹ al paciente, encontramos 9 pacientes en los que el ARNm de Tiroglobulina resultó no detectable tras el tratamiento. Seis no presentaron captación en el rastreo postratamiento, mientras que en 3 casos si hubo captación. En este sentido la determinación de Tiroglobulina sérica resultó negativa en 14 ocasiones, 11 de las cuales se refrendaron con ausencia de captación en el rastreo postratamiento y 3 si presentaron captación. La positividad del ARNm de Tiroglobulina se produjo en 16 ocasiones, presentando rastreo positivo posteriormente 6 pacientes y 10 ausencia de captación. La Tiroglobulina sérica resultó positiva en 7 ocasiones, de las cuales en 3 el rastreo no presentó captación y en 4 casos si que la presentó.

No parece que, al menos hasta ver lo que ocurre con los individuos que tienen ARNm de Tiroglobulina positivo y rastreos negativos, la técnica sirva para predecir que paciente va a precisar tratamiento y cual no.

CONCLUSIONES

1- La detección de ARNm de Tiroglobulina en sangre periférica, realizada mediante RT-PCR e hibridación con sonda interna en nuestro laboratorio tiene sensibilidad para detectar hasta una sola célula tiroidea circulante en un mililitro de sangre, resultados similares a los de otros métodos incluidos los cuantitativos.

2- La sensibilidad de la determinación de ARNm de Tiroglobulina para diagnosticar existencia de enfermedad residual en CDT, es de un 80% en hipotiroidismo y algo menor, del 69% en eutiroidismo.

3- La especificidad de la técnica, siempre comparada con los métodos actuales es muy escasa, del 49%, aunque está por demostrar si este elevado número de positivos se tratan de falsos positivos de la técnica o de verdaderos positivos no detectables actualmente.

4- De manera retrospectiva parece existir una mayor asociación a la presencia de metastasis en el grupo con ARNm de Tiroglobulina positivo que en el grupo en el que la técnica es negativa

5- La concordancia de la determinación de ARNm de Tiroglobulina con la determinación de Tiroglobulina sérica es elevada en pacientes que presentan captación en el rastreo, y esta concordancia es más acusada en situación de eutiroidismo. Sin embargo en los pacientes que no presentan captación en el rastreo, la discordancia es muy elevada entre ambas técnicas.

6- En el grupo de pacientes con rastreos negativos y Tiroglobulina sérica elevada, la determinación de ARNm de Tiroglobulina puede ser de utilidad para confirmar que no se trata de un falso positivo de la tiroglobulina, y en situación de eutiroidismo, puede resultar incluso más sensible en estos pacientes que la Tiroglobulina sérica.

7- El tratamiento con Levotiroxina consigue disminuir el número de células tiroideas circulantes en los pacientes con CDT, llegando a negativizar la detección de ARNm de Tiroglobulina en un grupo de pacientes.

8- En pacientes con CDT que presentan anticuerpos Anti-Tiroglobulina circulantes, la determinación de ARNm de Tiroglobulina parece un método eficaz para el seguimiento de la enfermedad

9- Dado que se trata de una técnica cara y laboriosa comparada con la determinación de Tiroglobulina sérica, no recomendamos su utilización de forma generalizada, salvo en el grupo de pacientes con Anticuerpos anti-Tiroglobulina elevados, hasta que en ensayos controlados, se demuestre si tiene una elevada capacidad de predecir enfermedad residual clínicamente detectable o se trata de un método con elevado número de falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Wingo PA, Tong T, Bolden S. "Cancer Statistic", 1995 *CA Cancer J Clin*; 45(1): 8-30
- ² Hundahl SA, Fleming ID, Frengen AM, Menck HR. "A National Cancer Data Base Report on 53856 cases of thyroid carcinoma treated in the US 1985-1995", 1998 *Cancer*; 83: 2638-2648
- ³ Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. "Cancer statistics" 1997 *Cancer J Clin*; 47: 5-12
- ⁴ The European Comision, In: Eurostat Yearbook. "The Statistical Guide to Europe", Brussels: The European Comision, 2001.
- ⁵ Mazzaferri EL, Jhiang SM. "long term impact of initial surgical and medical therapy on Papillary and Follicular Thyroid Cancer", 1994 *Am J Med*; 97: 418-428
- ⁶ Schlumberger MJ. "Diagnostic follow-up of well-differentiated thyroid carcinoma: Historical perspective and current status", 1999 *J Endocrinol Invest*; 22: 3-7
- ⁷ Lundell M, Hakulinen T, Holm LE. "Thyroid cancer after radiotherapy for skin hemangioma in infancy", 1994 *Radiat Res*; 40: 3343-339
- ⁸ Potterm LM, Kaplan MM, Larsen PR, Silva JE, Koenig RJ, Lubin JH, Stoval M, Boice JD. "Thyroid nodularity after childhood irradiation for lymphoid hiperplasia: a comparison of questionnaire and clinical findings". 1990 *J Clin Epidemil*; 43: 449-460
- ⁹ Ron E, Modan B, Preston D, Alfandary E, Stovall M, Boice JD. "Thyroid Neoplasia following low-dose radiation in chilhood", 1989 *Radiat Res*; 120: 516-531
- ¹⁰ Schneider AB, Recant V, Pinsky SM, Ryo UI, Bekerman C, Shore-Freedman E. "Radiation induced thyroid carcinoma: Clinical course and result of therapy in 296 patients", 1986 *Ann Inter Med*; 105: 405-412
- ¹¹ Shore RE, Hildreth N, Dvoretzky P, Andresen E, Moseson M, pasternack B. "Thyroid cancer among persons given X-Ray tretment in infancy for an enlarged timus gland" 1993 *Am J Epidemiol*; 137: 1068-1080
- ¹² Winship T, Rosvoll RV. " Thyroid carcinoma in chilhood: Final report on a 20 years study". 1970 *Clinical proceeding of the children's hospital of Washington DC*; 26: 327-348
- ¹³ Schlumberger M, De vathaire F, Travagli JP, Vassal G, Lemerle J, Parmentier C, Tubiana M. "Differentiated Thyroid carcinoma in chilhood: Long tern follow up of 72 patients". 1987 *J Clin Endocrinol Metab*; 65: 1088-1094

-
- ¹⁴ Bell B, Mazzaferri EL. "Familial Adenomatous Polyposis (Gadner's Syndrome and Thyroid Carcinoma. A case report and review of the literature", 1993 *Dig Dis sc*; 38:185-90
- ¹⁵ Michaels Rd, Shakir KMM. "Asociation of multinodular goiter with breast carcinoma: Cowden Disease", 1993 *J Endocrinol Invest*; 16: 909-911
- ¹⁶ Behar R, Arganini M, Wu TC, Mc Kormick M, Straus FH, De Groot LJ, Kaplan EL. "Grave's disease and thyroid cancer". 1996 *Sugery*; 100: 1121-1127
- ¹⁷ Franceschy S, Boyle P, Maisonneuve P, La Vecchia C, Burt Ad, Kerr DJ, Mc Farlane GJ. "The epidemiology of thyroid carcinoma". 1993 *Critical reviews in oncogenesis*; 44, 25-52
- ¹⁸ Singh B, Shaha AR, Trivedi H, Carew JF, Poluri A, Shah JP. "Coexistent Hashimoto's Thyroiditis wwith papillary thyroid carcinoma: Impact on presentation, management, and outcome", 1999 *Thyroid*; Dec 126 (6): 1070-1076
- ¹⁹ Mck WJ, Preston-Martin S. "Epidemiology of thyroid cancer". In: *Thyroid cancer*. (ed) Kluwer academic publishers, Boston, 1998: 1-25
- ²⁰ Goodman Mt, Kolonel LN, Wilkens LR. "The association of body size, reproductive factors and thyroid cancer", 1992 *Br J Cancer*; 66: 1180-1184
- ²¹ Belfiore A, La rosa GL, La Porta GA, Giuffrida D, Milazzo G, Lupo L, Regalbuto C, Vignery R. "Cancer risk in patients with cold Thyroid nodules: Relevance of iodine intake, sex, age and multinodularity", 1992 *Am J Med*; 93: 363-369
- ²² Breslow NE, EnstronJE. "Geographic correlations between cancer mortality ratesand alcohol tobacco consumption in the United States", 1974 *J Natl Cancer Inst*; 53: 631-639
- ²³ Hedinger C, Willians Ed, Sobin LH. "Histologycal typing of thyroid tumors", *International histological clasification of thyroid tumours*. World Health Organization, Vol 11, Second Edition, Springer-Verlag, Berlin: 1988.
- ²⁴ Rosay J, Carcangiu ML, De Lellis RA. " Tumours of the thyroid gland", 1992 *Atlas of tumor Pathology*. Washington DC, AFIP, third series fascicle 5
- ²⁵ Hay ID, Grant CS, Van Heerden JA, Goellner JR, Ebersold JR, Bergstralh EJ. "Papillary thyroid Microcarcinoma: A study of 535 cases observed in a 50 year-period", 1992 *Surgery*; 112: 1139-46
- ²⁶ Hubert JP jr, Kiernan PD, Beahrs OH Mc Conahey WM, Woolner LB. "Ocult papillary carcinoma of the thyroid", 1980 *Arch Surg*; 115(4): 394-398
- ²⁷ Kenneth B, Ain MD. "Papillary Thyroid Carcinoma: Etiology, Assesment and therapy". 1995 *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*: 711-760

-
- ²⁸ Pacini F, Cetani F, Miccoli P, Mancusi F, Caccarelli C, Lippi F, Martino E, Pinchera A. "Outcome of 309 patients with metastatic differentiated thyroid carcinoma treated with radioiodine", 1994 *World J Surg*; 18(4): 600-604
- ²⁹ Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. "Prognostic factors for thyroid carcinoma: a population-based study of 15698 cases for the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program 1973-1991. 1997 *Cancer*; 79: 564-573
- ³⁰ Carcangiu MI, Bianchi S. "Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: Clinicopathologic study of 15 cases", 1989 *Am J Surg Pathol*; 13: 1041-1049
- ³¹ Soares J, Limbert Esobrinho-Simoes M. "Diffuse sclerosis variant of papillary thyroid carcinoma: A clinico-pathologic study of 10 cases". 1989 *Pathol Res Pract*; 185: 200-206
- ³² Johnson TI, Lloyd RV, Thompson NW, Beierwaltes WH, Sisson JC. "Prognostic implications of the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma". 1988 *Am J Surg Pathol*; 12: 22-27
- ³³ Evans HL. "Columnar cell carcinoma of the thyroid: a report of two cases of an aggressive variant of thyroid carcinoma". 1986 *Am J Surg Pathol*; 85: 77-80
- ³⁴ Evans HL. "Encapsulated papillary neoplasms of the thyroid: A study of 14 followed a minimum of ten years". 1987 *Am J Surg Pathol*; 11: 592-597
- ³⁵ De Micco C, Ruff J, Carayon P, Christian MA, Henry JF, Toga F. "Immunohistochemical study of thyroglobulin in thyroid carcinomas with monoclonal antibodies", 1987 *Cancer*; 59: 471-476
- ³⁶ Fisher ER, Kim WS, "Primary clear cell thyroid carcinoma with scamous features". 1997 *Cancer*; 39: 2497- 2502
- ³⁷ Herrera MF, Hay ID, Wu PSC. "Hurthle cell (eosinophilic) papillary thyroid carcinoma: A variant with more aggressive biologic behavior", 1992 *World J Surg*; 16: 669-675
- ³⁸ Carcangiu ML, Zampi G, Rosai J. "Poorly differentiated "insular" thyroid carcinoma. A reinterpretation of Langhans "wuchende struma"". 1984 *Am J Surg Pathol*; 8: 665-668
- ³⁹ Werk EE Jr, Vernon BM, Gonzalez JJ, Húngaro PC, Mc Coy RC. "Cancer in Thyroid nodules. A community hospital survey". 1984 *Arc Internal Med*; 144(3): 474-476
- ⁴⁰ Belfiore A, Giuffrida D, La rosa GL, Ippolito O, Russo G, Fiumara A, Vigneri R, Filletti S." High frequency of cancer in cold Thyroid nodules occurring at young age". 1989 *Acta Endocrinologica (Copenh)*; 121(2): 197-202

-
- ⁴¹ AACE/AAES "Medical/Surgical guidelines for clinical practice: Management of Thyroid Carcinoma". 2001 *Endocrine Practice*; Vol 7: No. 3203-220
- ⁴² Sampson RJ, Woolner LB, Banh RC, Kurland LT. "Occult thyroid carcinoma in Olmsted county, Minesota: Prevelence at autopsy compared with that in Hiroshima and Nagasaki", Japon. 1974 *Cancer*; 34: 2072-2076
- ⁴³ Ludwig G, Nishiyama RH. "The prevelence of occult papillary thyroid cancer in 100 consecutive autopsies in an American population", 1976 *Lab Invest*; 34: 320-325
- ⁴⁴ Katoh R, Sasaki J, Kuriara H, Suzuki K, Lida Y, Kawaoi A, "Múltiple Thyroid involvement (intraglandular metastasis) in papillary Thyroid carcinoma: A clinicopathologic study of 105 consecutive patients", 1992 *Cancer*; 70(6): 1985-1990
- ⁴⁵ Silvelberg SG, Hutter RVP, Foote FW, "Fatal carcinoma of the thyroid", 1970 *Cancer*; 25: 792
- ⁴⁶ Grebe SK, Hay ID. "The role of surgery in the management of differentiated thyroid cancer". 1997 *Journal Endocrinol Invest*; 20 32-35
- ⁴⁷ Udelsman R, Lakatos E, Ladenson P. "Optimal Surgery for Papillary Throid Carcinoma". 1996 *World J Surg*. 20: 88-93
- ⁴⁸ Wanaba H, Coburn M, Teates D, Cole B. "Total thyroidectomy does not enhances disease control or survival event in hight-risk patients with differentiated thyroid cancer", 1998 *ANN Surg*; 227(6): 912-921
- ⁴⁹ Steven I Sherman. "Surgical treatment of well-differentiated thyroid cancer", *UpToDate* 2000. Vol 8: N° 3
- ⁵⁰ Samaan Na, Schultz PN, Hickey R, Goepfer H, Haynie TP, Johnston DA, Ordonez NG. "The results of varies modalities of treatment of well differentiated thyrooid carcinoma: a retrospective review of 1599 patients", 1992 *J Clin Endocrinol Metab*; 75(3): 714-720
- ⁵¹ Loevinger R, Budinger Tf, Watson EE. "Mird primer for absorbed dose calculations". 1988, *The Society of Nuclear Medicine*, New-York
- ⁵² De Groot LJ, Kaplan MM, Mc Kormic, Straus SH. "Natural history, tratment and course of papillary Thyroid carcinoma". 1990 *J Clin Endocrin Metab*; 71(2): 414-424
- ⁵³ Beierwaltes WH, Rabbani R, Dmuchowsky, Lloyd RV, Eyre P, Mallette S. "An analisis of "ablation of thyroidremnants"with I-131 in 51 patients from 1947 to 1984: Experience at University of Mishigan", 1984 *J Nucl Med*; 25: 1287-1293
- ⁵⁴ De Groot LJ, Reilly M. "Comparison of 30- and 50- mCi doses of Iodine-131 for thyroid ablation", 1982 *Ann Intern Med*; 9: 51-53

-
- ⁵⁵ Gharib H, Mazzaferri EL. "Thyroxine suppressive therapy in patients with nodular Thyroid disease", 1998 *Ann Intern Med*; 128: 386-394
- ⁵⁹ Schlumberger MJ "Papillary and Follicular thyroid carcinoma" 1998 *N Engl J Med*; 338(5):297-306
- ⁵⁷ Dulgeroff AJ, Hershman JM. "Medical therapy for differentiated thyroid carcinoma", 1994 *Endocr Rev*; 15: 500-515
- ⁵⁸ Burman KD. "How serious are the risk of thyroid hormone over-replacement?", 1995 *Thyroid Today*; 18: 1-9.
- ⁵⁹ Cobin RH. "Thyroid hormone excess and bone-a clinical review". 1995 *Endocr Pract*; 1: 404-409
- ⁶⁰ Sawin CT, Geller A, Wolf PA, Belanger ag, Baker E, Bacharach P, Wilson PW, Benjamin EJ, D'Agostino RB. "Low serum thyrotropine concentrations as a risk factor for atrial fibrillation in older persons", 1994 *N Engl J Med*; 331(19): 1249-1252
- ⁶¹ Fazio S, Biondi B, Carella C, Sabatini D, Cittadini A, Panza N, Lombardi G, Sacca L. "Diastolic dysfunction in patients on Thyroid-stimulating hormone suppressive therapy with levothyroxine: Beneficial effects of b-blockade". 1995 *J Clin Endocrinol Metab*; 80(7): 2222-2226
- ⁶² Pujol P, Daures JP, Nsakala N, Baldet L, Bringer j, Jffiol C. "Degree of thyrotropin suppression as a prognostic determinat in differentiated thyroid cancer", 1996 *J Clin Endocrinol Metab*; 81: 4318-4323
- ⁶³ Cooper DS, Specker B, Ho M, Sperling M, Ladenson PW, Ross DS, Ain KB, Bigos ST, Brierley JD, Haugen BR, Klein I, Robbins J, Sherman SL, Taylor T, Maxon HR. "Thyrotropin suppression and disease progression in patients with differentiated thyroid cancer: Result from the National Thyroid Cancer Treatment cooperative registry", 1999 *Thyroid*; 8(9): 733-744
- ⁶⁴ Schlumberger M, Pacini F "Thyroid tumors" Ediciones Nucléon. Paris 1999 Capitulo 9:167-180
- ⁶⁵ Simpson WJ, McKinney SE, Carruthers JS, Gospodarowicz MK, Sutcliffe FB, Panzarella T. "Papillary and follicular Thyroid cancer: prognostic factors in 1578 patients", 1987 *Am J MED*; 83, 479-48
- ⁶⁶ Tubiana M, Schlumberger M, Rougier P, Laplanche A, Benhamou E, Gardet P, Caillou B, Travagli JP, Parmentier C. "Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma", 1985 *Cancer*; 55: 794-804

-
- ⁶⁷ Loh KC, Greenspan FS, Gee L, Miller TR, Yeo PPB. "Pathological Tumor-Node-Metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: A retrospective analysis of 700 patients", 1997 *J Clin Endocrinol Metab*; 82: 3553-3562
- ⁶⁸ Pellegriti G, Belfiore A, Giuffrida D, Lupo L, Vigneri R. "Outcome of differentiated Thyroid carcinoma in Grave's patients", 1998 *J Clin Endocrinol Metab*; 83: 2805-2809
- ⁶⁹ Spencer Ca, Takeuchi M, Kazarosyan M, Wang CC, Gutler RB, Singer PA, Fatemi S, Lopresti JS, Nicoloff JT. "Serum thyroglobulin autoantibodies: Prevalence, influence on serum thyroglobulin measurement and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma, 1998 *J Clin Endocrinol Metab*; 83: 1121-1127
- ⁷⁰ Mazzaferri E. *Thyroid cancer: Impact of therapeutic modalities on prognostic*. In: *Thyroid cancer*. Kluwer academic publishers, Boston, 1998; 255-284
- ⁷¹ Hay ID. "Papillary thyroid carcinoma", 1990 *Endocrinol Metabol Clin North Am* 19: 545-576
- ⁷² De Groot LJ, Kaplan EL, Shukla MS, Salti G, Straus FH. "Morbidity and mortality in follicular thyroid cancer", 1995 *J Clin Endocrinol Metab*; 80: 2946-2953
- ⁷³ Baudin E, Travagli JP, Ropers J, Mancusi F, Bruno-Bossio G, Cailloru B, Lumbroso J, Parmentier C, Schlumberger M. "Microcarcinoma of the thyroid gland: The Gustave-Roussiy institute experience", 1998 *Cancer*; 83: 553-559
- ⁷⁴ De Groot LJ, Kaplan EL, Mc Kormic M, Straus FH. "Natural history, treatment and course of papillary Thyroid carcinoma", 1990 *J Clin Endocrinol Metab*; 71: 4414-4424
- ⁷⁵ Grebe SKG Hay ID. "Thyroid cancer nodal metastasis: Biologic significance and therapeutic considerations", 1996 *Surg Oncol Clin N Amer*; 5: 43-63
- ⁷⁶ Casara D, Rubello D, Saladini G, Masarotto G, Favero A, Girelli ME, Busnardo D "Different features of pulmonary metastases in differentiated thyroid cancer: natural history and multivariate statistical analysis of prognosis variables" *J Nucl Med* 1993 34:1626-1631
- ⁷⁷ Bohm J, Kosma VM, Eskelinen N, Hollmen SE, Niskanen M, Tulla H, Alhaba E, Niskanen L. "Non suppressed thyrotropin and elevated thyroglobulin are independent predictors of recurrence in differentiated thyroid carcinoma", 1999 *Eur J Endocrinol*; 141(5): 460-467
- ⁷⁸ Harvey RD, Matheson NA, Grabowski PS, Rodger AB. "Measurement of serum thyroglobulin levels is of value in detecting tumor recurrence following tratment of differentiated thyroid carcinoma by lobectomy", 1990 *Br J Surg*; 77(3): 324-326
- ⁷⁹ Fraker DI, Skarulis M, Livolsi V. *Thyroids*, American Joint Comission of Cancer, 3rd Edition, Lippincot, Philadelphia: 1998

-
- ⁸⁰ Byar DP, Green SB, Dor P, Williams Ed, Colom J, Van Gilse AH, Mayer M, Sylvester RJ, Van Glabbeke M. "A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the E.O.R.T.C thyroid cancer cooperative group". 1979 *Eur J Cancer*; 5(8): 1033-1041
- ⁸¹ Cady B, Rossi R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. 1988 *Surgery*; 104: 947-954
- ⁸² Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM. "Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobal resection in papillary thyroid carcinoma; A retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognosis scoring system", 1987 *Surgery*; 102: 1088-1095
- ⁸³ Hay ID, Bergstrahl EH, Goelner J, Ebersold JR, Grant CS. "Predictin outcome in papillary carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients treated surgically at one institution during 1940 through 1989", 1993 *Surgery*; 114(6): 1050-1057
- ⁸⁴ Pacini F, Fugazzola L, Lippi F, Cecarelli C, Centoni R, Miccoli P, Elisei R, Pinchera A "Detection of thyroglobulin in fine needle aspirates of nonthyroidal neck masses: a clue to the diagnosis of metastatic differentiated thyroid cancer" 1992 *J Clin Endoc Metab* 74:1401-404
- ⁸⁵ Schlumberger M, Arcangioli O, Piekarski JD, Tubiana M, Parmentier C " Detection and treatment of lung metastases of differentiated thyroid carcinoma in patients with normal chest X-ray" 1988 *J Nucl Med* 29:1790-94
- ⁸⁶ Park Hm, Perkins OW, Edmonson JW, Schute RB, Manatunga A. "Influences of diagnostics radioiodine on the uptake of the ablative dose of iodine-131". 1994 *Thyroid*; 4: 49-54
- ⁸⁷ Ladenson PW, Braverman LE, Mazzaferri EL, Brucker-Davis F, Cooper DS, Garber JR, Wondisfor FE, Davies TF, Degroot LJ, Daniels GH, Ross DS, Weintraub BD. "Comparison of administration of recombinant human thyrotropin with withdrawal of thyroid hormone for radioactive iodine scanning in patients with thyroid carcinoma" 1997 *N Engl J Med*; 337: 888-896
- ⁸⁸ Haugen BR, Pacini F, Reiners C, Schlumberger M, Ladenson PW, Sherman SL, Cooper DS, Grahan KE, Braverman L, Skarukis MC, Davies TF, De Groot LJ, Mazzaferri EL, Daniels GH, Ross DS, Luster M, Samuels MH, Becker DW, Maxon HR, Cavalieri RR, Spencer CA, McEllin K, Weintraub BD, Ridgway E. "A comparison of recombinant human thyrotropin and thyroid hormone withdrawal for the detection of thyroid remant or cancer" 1999 *J Clin Endocrinol Metab*; 84: 3877-388
- ⁸⁹ Lerman J: Iodine componets of the blood: "Circulatin thyroglobulin in normal persons and in persons with thyroid disease". 1940 *J Clin Invest*; 19: 555-559

-
- ⁹⁰ Spencer Ca, Lopresti JS, fatemi S, Nicolof JT. "Detection of residual and recurrent differentiated thyroid carcinoma by serum thyroglobuline measurement", 1999 *Thyroid*; 9: 435-441
- ⁹¹ Mariotti S, barbesino G, Caturegli P, Marino M, Manetti L, Paccini F, Centoni R, Pinchera A et al. "Assay in thyroglobuline in serum with thyroglobulin autoantibodies. An unobteined goal?", 1995 *J Clin Endocrinol Metab*; 80: 468-472
- ⁹² Schlumberger MJ, Baudin E "Serum thyroglobulin determination in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma" 1998 *Eur J Endocrinol*; 138:249-252
- ⁹³ Mueller-Gaertner HW, Schneider C. "Clinical evaluation of tumor characteristics predisposing serum thyroglobulin to be undetectable in patienrts with differentiated thyroid cancer" 1988 *Cancer*; 61: 966-972
- ⁹⁴ Torrens Ji, Bursh Hb. "Serum thyroglobulin measurement: Utility in clinical practice", 2001 *Endocrinol Metab Clin North Am*; 30(2): 429-469
- ⁹⁵ Maxon H "Detection of residual and recurrent thyroid cancer by radionuclide imaging", 1999 *Thyroid*; 9: 443-6
- ⁹⁶ Hooff L, Hoekstra O, Deville W, Lips P, Gerrit J, Teule J. "Diagnostic accuracy of 18F-Flourodeoxyglucose positron emission tomography in the follow-up of papillary or follicular thyroid cancer", 2001 *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 3779-3787
- ⁹⁷ Solomon B, Wartofsky L, Burman K, "Current trends in the management of well differentiated papillary thyroid carcinoma", *J Clin Endocrinol Metab*; 1996 81(1): 333-339
- ⁹⁸ Pacini F, Lippi F, Formica N, Elisei R, Anelli S, Ceccarelli C, Pinchera A. "Therapeutic doses of iodide 131 reveal undiagnoses metastases in thyroid cancer patients with detectable serum thyroglobulin levels", 1987 *J Nucl Med*; 28(12): 1881-91
- ⁹⁹ Pacini F, Agate L, Elisei R, Capezzone M, Ceccarelli C, Lippi F, Molinaro E, Pinchara A. "Outcome of differentiated thyroid cancer with detectable serum Tg and negative diagnostic I131 wholw body scan: Comparison of patients treated with high activities versus untreated patients", 2001 *J Clin Endocrinol Metab*; 86(9):4092-4097
- ¹⁰⁰ Pineda JD, Lee T, Ain K, Reybolds JC, Robbins J. "Iodide 131 therapy for thyroid cancer patients with elevated thyroglobulin and negative diagnostic scan", 1995 *J Clin Endocrinol Metab*; 80:1488-1492
- ¹⁰¹ Wartofsky L, Sherman S, Gopal J, Schlumberger M, Hay I. "The use of radioactive iodide in patients with papillary and follicular thyroid cancer", 1988 *J Clin Endocrinol Metab*; 83(12): 4195-4203

-
- ¹⁰² Maxon HR, Smith HS. "Radioiodide 131 in the diagnosis and treatment of metastatic well differentiated thyroid cancer", *Endocrinol Metab Clin North Am*; 1990 19: 685-718
- ¹⁰³ Schlumberger M. "Is diagnostic iodide 131 scanning useful after total thyroid ablation for differentiated thyroid cancer?", 2000 *J Clin Endocrinol Metab*; 85:175-178
- ¹⁰⁴ Pacini F. "Clinical use of rhTSH in clinical practice:serum Tg stimulation" 2 *Thyroid Cancer International Symposium. Linz Octobre 2000*
- ¹⁰⁵ Haugen BR, Pacini F, Reiners C, Schlumberger M, Ladenson PW, Sherman SI, "A comparison of recombinant human thyrotropin and thyroid hormone withdrawal for the detection of thyroid remnant or cancer", 1999 *J Clin Endocrinol Metab*; 84: 3877-3885
- ¹⁰⁶ Pacini F, Molinaro E, Lippi F, Castagna MG, Agate L, Ceccarelli C, Taddei E, Elisei R, Capezzone M, Pinchera A. "Prediction of disease status by recombinant human TSH-stimulated serum Tg in the postsurgical follow-up of differentiated thyroid carcinoma" 2001 *J Clin Endocrinol Metab*; 86(12): 5686-5690
- ¹⁰⁷ Ashworth TR. "A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death", 1989 *Aust Med*; 14; 146
- ¹⁰⁸ Engell HC. "Cancer cells in the circulating blood", 1955 *Acta Chir Scand*; Suppl: 201
- ¹⁰⁹ Christopherson W. *Cancer cells in the peripheral blood: A second look*. 1965 *Acta Cytol.*; 9, 169-174
- ¹¹⁰ Moss TJ, Sanders DG. "Detection of neuroblastomacells in blood", 1990 *J Clin Oncol*; 8: 736-740
- ¹¹¹ Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, De arnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ. "Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer", 1983 *Lancet*; 2(8362): 1271-1273
- ¹¹² Stahel RA, Mabry M, Skarkin AT, Speak J, Bernal SD. "Detection of bone marrow metastasis in small-cell lung cancer by monoclonal antibody", 1985 *J Clin Oncol*; 3: 455-456
- ¹¹³ Lindemann F, Schlimock G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. "Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal patients", 1992 *Lancet*; 340: 685-689
- ¹¹⁴ Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter O, Riethmuller G. "Frequency and prognostic significance of isolated tumor cells in bone

marrow of patients with non-small cell lung cancer without overt metastases", 1996 *Lancet*; 34: 649-653

¹¹⁵ Courtemanche DJ, Worth AJ, Coupland RW, MacFarlane JK. "Detection of micrometastases from primary breast cancer", 1991 *Can J Surg*; 3: 15-19

¹¹⁶ Kirk SJ, Cooper GG, Hoper M, Watt PC, Roy Ad, Odling-Smee W. "The prognostic significance of marrow micrometastases in women with early breast cancer", 1990 *Eur J Surg Oncol*; 16: 481-485

¹¹⁷ Singletary SE, Larry L, Tucker SL, Spitzer G. "Detection of micrometastatic tumour cells in bone marrow of breast carcinoma patients", 1991 *J Surg Oncol*; 47: 32-36

¹¹⁸ Thomas P, Battifora H. "Keratins versus epithelial membrane antigen in tumor diagnosis. An immunohistochemical comparison of five monoclonal antibodies", 1987 *Hum Pathol*; 18: 728-734

¹¹⁹ Campana D, Pui CH. "Detection of minimal residual disease in acute leukemias: methodological advances and clinical significance", 1995 *Blood*; 85: 1416-1434

¹²⁰ Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. "Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction", 1994 *J Clin Oncol*; 12: 725-729

¹²¹ Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA. "Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification", 1987 *Science*; 237: 175-178

¹²² Edelstein RA, Zietman AL, De las Morenas A, Krane RJ, Babayan RK, Dallow KC, Traish A, Moreland RB. "Implications of prostatic micrometastases to the pelvic lymph nodes: An archival tissue study", 1996 *Urology*; 47(3): 370-375

¹²³ Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL, Kelly WK, Curley T, Amsterdam A, Zhang ZF, Rosai J. "Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: Clinical implications", 1995 *J Clin Oncol*; 13: 1195-1200

¹²⁴ Kaplan JC, Kahn A, Chelly J. "Illegitimate transcription: its use in the study of inherited disease", 1992 *Hum Mutat*; 1: 357-370

¹²⁵ Ghossein RA, Carusone L, Bhattacharya S. "Review: Polymerase Chain Reaction Detection of micrometastases and Circulating tumor Cells: Application to melanoma, Prostate and Thyroid Carcinomas", 1999 *Diagn Mol Pathol*; 8(4): 165-175

¹²⁶ Weiss M. "Metastatic inefficiency", 1990 *Adv Cancer Res*; 54: 159-211

¹²⁷ Gao CI, Maheshwari S, Dean R, Tamtum L, Mooneyhan R, Connelly RR, McLeod DG, Srivastava, Moul JW. "Blinded evaluation of reverse transcriptase-polymerase

chain reaction prostate-specific antigen peripheral blood assay for molecular staging of prostate cancer", 1999 *Urology*; 53(4): 714-721

¹²⁸ Wood DP, Banerjee M. "Presence of circulating prostate cells in the bone marrow of patients undergoing radical prostatectomy is predictive of disease free survival", 1997 *J Clin Oncol*; 15: 3451-3457

¹²⁹ Shivers SC, Wang X, Li W, Joseph E, Messina J, Glass LF, Deconti R, Cruse CW, Berman C, Fenske NA, Lyman GH, Reintgen DS. "Molecular staging of malignant melanoma", 1998 *JAMA*; 280(16): 1410-1415

¹³⁰ Ghossein RA, Coit D, Brennan M, Zhang ZF, Wang Y, Bhattacharya S, Houghton A, Rosay J. "Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase mRNA malignant melanoma", 1998 *Clin Cancer Res*; 4: 419-428

¹³¹ Johnson PWM, Burchill SA, Selby PJ. "The molecular detection of circulating tumor cells". 1995 *Br J Cancer*; 72: 268-276

¹³² Ditkoff BA, Marvin MR, Yemul S, Shi YJ, Chabot J, Feind c, LoGerfo P. "Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood", 1996 *Surgery*; 120: 959-965

¹³³ Tallini G, Ghossein Ra, Emanuel J, Gill J, Kinder B, Dimich AB, Costa J, Robbins R, Burrow GN, Rosai J. "Detection of thyroglobulin, thyroid peroxidase, and RET/PTC1 mRNA transcript in the peripheral blood of patients with Thyroid disease", 1998 *J Clin Oncol*; 13 (3): 1158-1166

¹³⁴ Ringel MD, Ladenson PW, Levine MA. "Molecular diagnosis of residual and recurrent thyroid cancer by amplification of thyroglobulin messenger Ribonucleid Acid in peripheral blood", 1998 *J Clin Endocrinol Metab*; 83 (12): 4435-4442

¹³⁵ Haber RS. "The diagnostic of thyroid cancer: A new approach", 1998 *J Clin Endocrinol Metab*; 83 (12): 4189-4190

¹³⁶ Ringel MD, Balducci-Silano PL, Anderson JS, Spencer CA, Silverman J, Sparling YH, Francis GL, Burman KD, Wartofsky L, Ladenson PW, Levine MA, Tuttle RM. "Quantitative reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction of circulating thyroglobulin messenger Ribonucleid Acid for monitoring patients with thyroid carcinoma", 1999 *J Clin Endocrinol Metab*; 84 (11): 4037-4042

¹³⁷ Biscolla RPM, Cerutti JM, Maciel RMB. "Detection of recurrent thyroid cancer by sensitive nested reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction of thyroglobulin and sodium/iodide symporter messenger ribonucleid acid transcripts in peripheral blood", 2000 *J Clin Endocrinol Metab*; 85 (10): 3623-3627

¹³⁸ Bojunga J, Roddinger S, Stanish M, Kusterer K, Kureck R, Rennenberg H, Adams S, Linhorst E, Usadel KH, Schummdraeger PM. "Molecular detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease by RT-PCR", 2000 *Br J Cancer*; 82 (10): 1650-1657

-
- ¹³⁹ Bugalho MJ, Domingues RS, Pinto Ac, Garrao A, Catariño AL, Ferreira T, Limbert E, Sobrinho L. "Detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of individuals with and without Thyroid glands: Evidence for thyroglobulin expresión by blood cells", 2001 *Eur J Endocrinol*; 145: 409-413
- ¹⁴⁰ Takano T, Miyauchi A, Yoshida H, Hasegawa Y, Kuma K, Amino M. "Quantitative measurement of thyroglobuline mRNA in peripheral blood of patients after total thiroidectomy", 2001 *British Journal of cancer*; 85 (1): 102-106
- ¹⁴¹ Bellantone R, Lombardi CP, Bossola M, Ferrante A, Prrinci P, Boscherini M, Maussier M, Salvatori M, Rufini M, Reale F, Romano L, Tallini G, Zelano G, Pontecorvi A. "Validity of thyroglobulin mRNA assay in peripheral blood of postoperative Thyroid carcinoma patients in predicting tumor recurrences varies acording to the histologic tipe". 2001 *Cancer*; 92 (9): 2273-2279
- ¹⁴² Shelby L. Berger. "Preparation and Characterization of RNA: Overview. En: Guide to molecular cloning techniques", Shelby L. Berger and Alan R Kimmel. 1987 *Academic Press Inc; San diego*: 215-296
- ¹⁴³ Chomcznski P and Sacchi N. "Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate- phenol- cloroform extracction", 1987 *Anal Biochem*; 162: 156-159
- ¹⁴⁴ Shelby L. Berger. "General methods for Isolating and Characterizing Nucleics Acid. En: Guide to molecular cloning techniques", Shelby L. Berger and Alan R Kimmel. 1987 *Academic Press Inc; San diego*: 215-296
- ¹⁴⁵ Fraker DI, Skarulis M, Livolsi V. "Thyroid tumors", In: De vita VT, Hellman S, Rossenberg SA, *Cancer Principles and practice in oncology*. Phhiladelphia-New York, Lipincott-Raven Publishers; 1997: 1269-1284
- ¹⁴⁶ Savagner F, Rodien P, Reyner P, Rohemr V, Bigorgne J-C, Malthiery Y. "Analysis of TG transcripts by Real Time RT-PCR in the blood of thyroid cancer patients", 2002 *J Clin Endocrinol Metab*; 87(2): 635-639
- ¹⁴⁷ Sourla A, Lembessis P, Mitsiades C, Dimopoulos T, Skouteris M, Metsinis M, Ntounis A, Ioannidis A, Katsoulis A, Kyragiannis V, Lambou T, Tsintavis A, Koutsilieris M. "Conversion of Nested Reverse Transcriptase polymerase chain reaction from positive to negative status at peripheral blood during androgen ablation therapy is associated with long progression free survival in stage D2 prostate cancer patients", 2001 *Anticancer Res*; 21(5): 3565-3570
- ¹⁴⁸ Park HJ, Kim JY, Park KY, Gong G, Hong SJ, Ahn IM. "Expressions of human sodium iodide symporter mRNA in primary and metastatic papillary thyroid carcinomas", 2001 *Thyroid*; 10 (3): 211-217

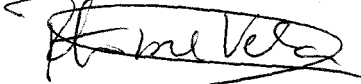
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

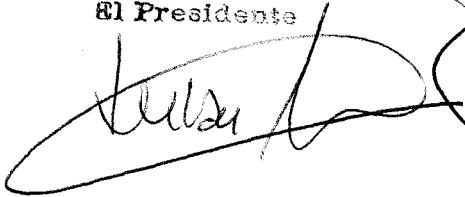
Alfonso Manuel Soto Moreno
sobre Evaluación de la amplificación del RNA de la Tiroglobulina en sangre como método para la identificación de Recidivas en el Cáncer Diferenciado del Tiroideo.
acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE CUM LAUDE
per maxima causa.

Sevilla, 31 de MAYO 2002

El Vocal,



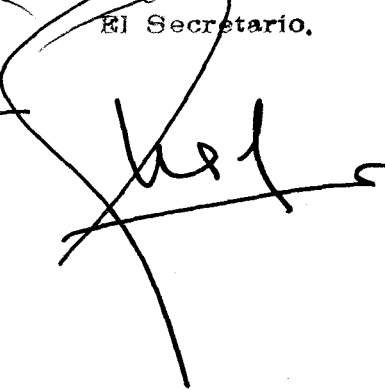
El Presidente



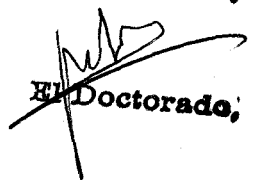
El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,