

**EVALUACION DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MEDIANTE
RT-PCR PARA RNAm DE TIROGLOBULINA COMO MARCADOR
TUMORAL EN EL CANCER BIEN DIFERENCIADO DE TIROIDES**

GLORIA GARAVITO GONZALEZ

**TESIS DE GRADO
MAESTRIA EN BIOLOGIA
AREA DE BIOLOGIA MOLECULAR**

**Director de Tesis: Dr. GONZALO GUEVARA. M.D. MSc
Codirector de Tesis: Dr. CARLOS JARAMILLO. MSc**

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ
2003**

AGRADECIMIENTOS

A:

Dr. Gonzalo Guevara, Jefe Laboratorio de Genética - INC
Dina Pabón, Laboratorio de Genética y Oncología Molecular- INC
Consuelo García, Laboratorio Clínico - INC
Teresa Martínez, Grupo de Epidemiología - IMC
Dr. Carlos Jaramillo, Departamento de Ciencias Biológicas - Universidad de los Andes

y a la

Fundación Terry Fox

El apoyo de cada uno fue definitivo en el desarrollo del trabajo.

GRACIAS!

INDICE

INTRODUCCION	1
1. MARCO TEORICO	3
1.1. CANCER DE TIROIDES DE ORIGEN FOLICULAR	3
1.1.1 Generalidades	3
1.1.2 Tratamiento del cáncer de tiroides de origen folicular	4
1.1.3 Seguimiento de pacientes con cáncer de tiroides	5
1.1.4 Marcadores utilizados en el seguimiento	5
1.2 TIROGLOBULINA	9
1.2.1 Generalidades	9
1.2.2 Utilidad como marcador tumoral	10
1.2.3 Métodos de medición de tiroglobulina e interferencia	12
1.3 ANTICUERPOS ANTITIROGLOBULINA	14
1.3.1 Generalidades	14
1.3.2 Tipos de anticuerpos antitiroglobulina	14
1.3.3 Utilidad como marcador tumoral	16
1.4 ENFERMEDAD RESIDUAL MINIMA	17
1.4.1 Generalidades	17
1.4.2 Estadiaje TNM por patología	18
1.4.3 Estadiaje molecular	18
1.4.4 Marcadores de enfermedad residual mínima	19
1.4.5 Implicaciones clínicas de la enfermedad residual	22
1. OBJETIVOS	24
2. SUJETOS Y METODOS	25
3.1. Sujetos	25
3.2. Métodos	26
3.2.1 Evaluación Bioquímica	26
3.2.2 Evaluación molecular	26

3. ANLISIS ESTADISTICO	29
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSION	39
6. CONCLUSIONES	44
7. PERSPECTIVAS	45
8. BIBLIOGRAFIA	46
9. ANEXO	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias nucleotidas de los iniciadores	27
Tabla 2. Clasificación de pacientes de acuerdo a PCR	30
Tabla 3. Tiroglobulina como prueba diagnóstica	33
Tabla 4. RT-PCR para RNAm como prueba diagnóstica	33
Tabla 5. Relación tiroglobulina y PCR en enfermedad residual	34
Tabla 6. PCR en pacientes con anticuerpos antitiroglobulina	35
Tabla 7. PCR en carcinoma papilar	35
Tabla 8. PCR en carcinoma folicular	36
Tabla 9. PCR en pacientes libres de enfermedad	36
Tabla 10. PCR en grupo control	37
Tabla 11. Cuadro resumen de autores	40

GRAFICAS Y FOTOGRAFIAS

Gráfica 1 Localización de recaída	31
Gráfica 2 Relación tiroglobulina-PCR en pacientes en recaída	32
Fotografía 1. Visualización de los productos de PCR	28

INTRODUCCION

En la oncología, la evaluación de la enfermedad residual mínima se constituye en un punto primordial para la clasificación pronóstica del paciente y para la decisión de una terapia adicional complementaria al tratamiento inicial o durante una recaída temprana. La neoplasia maligna que con mayor frecuencia afecta las glándulas endocrinas, es el cáncer de tiroides. Debido a su excelente sobrevida, estos pacientes llegan a constituir el 90% de la consulta rutinaria de seguimiento en un servicio de endocrinología oncológica. Sin embargo, hasta un 30% de los pacientes evidencian recaída en algún momento de su seguimiento, siendo fundamental una detección temprana de la misma, que permita un tratamiento de baja morbilidad con yodo radioactivo o con cirugías limitadas. Aunque actualmente se cuenta con la medición sérica de tiroglobulina como un marcador específico del cáncer de tiroides. Su sensibilidad es muy alta solo cuando se suspende el aporte de hormona tiroidea exógena, para permitir el aumento fisiológico de la hormona estimulante del tiroides (TSH) la que estimula la producción de la tiroglobulina. Sin embargo, esto conlleva a que el paciente entre en un estado de hipotiroidismo franco, con la morbilidad consecuente y con el posible estímulo de crecimiento tumoral. En otros países, para evitar este inconveniente, se utiliza la TSH recombinante humana con obvios beneficios **(67, 68)**. Desafortunadamente el alto costo de esta hormona impide ser usado en nuestro medio obligando al seguimiento de los pacientes mediante la medición sérica de la tiroglobulina durante la supresión con hormona tiroidea con la conseguinte pérdida de sensibilidad del marcador. Por otra parte, la medición de la tiroglobulina en un grupo importante de casos se ve limitada ante la producción aumentada en pacientes con cáncer tiroideo de anticuerpos contra esta proteína, invalidando los resultados de su medición.

El desarrollo actual de técnicas moleculares basadas en la PCR, que permiten la detección de cantidades mínimas de células tumorales circulantes, ya ha sido evaluado en otras entidades malignas como próstata, seno y melanoma, con buenos resultados.

En cáncer de tiroides se han efectuado algunos estudios que evalúan la utilidad de esta técnica. En este trabajo, se pretende evaluar la detección de RNAm para tiroglobulina, por medio de RT-PCR de RNAm de tiroglobulina, como marcador tumoral en pacientes en seguimiento de cáncer bien diferenciado de tiroides para valorar su utilidad, bajo la hipótesis de que siendo una técnica de extrema sensibilidad, podría dar información más temprana sobre la presencia de enfermedad residual mínima en cáncer de tiroides, sin el inconveniente de la

suspender el aporte de hormona tiroidea. Igualmente esta técnica puede ser especialmente valiosa en los pacientes que presentan anticuerpos antitiroglobulina.

1. MARCO TEORICO

1.1 CANCER DE TIROIDES DE ORIGEN FOLICULAR

1.1.1. Generalidades

El cáncer de tiroides es el tumor que más frecuentemente afecta las glándulas endocrinas. A nivel mundial representa más o menos el 1% de los tumores diagnosticados cada año. Aunque en Colombia no contamos con estadísticas a nivel nacional, en los reportes del Instituto Nacional de Cancerología, ocupa el séptimo lugar en incidencia con aproximadamente 120 casos nuevos diagnosticados por año. Las neoplasias tiroideas se originan en cualquiera de los 2 tipos celulares que son componentes fundamentales de este tejido. Así, los tumores originados en las células C parafoliculares, dan origen a los carcinomas medulares de tiroides, que ocasionan el 15 – 20% de los tumores tiroideos.

El 85% restante, corresponde a tumores derivados de la célula folicular. De acuerdo al subtipo histológico y grado de diferenciación celular, estos tumores son clasificados en carcinomas bien diferenciados, que incluyen carcinoma papilar y carcinoma folicular bien diferenciado, que conforman el 90% de los tumores de origen folicular, teniendo un excelente pronóstico de sobrevida como se discutirá posteriormente. El 10% restante, está compuesto por carcinomas foliculares mal diferenciados y carcinomas anaplásicos, los cuales, a pesar de su origen celular común con los tumores bien diferenciados, muestran un comportamiento muy agresivo, con una mortalidad a un año cercana al 90% (especialmente el anaplásico), constituyéndose así en una de las neoplasias más agresivas en el humano.

Aunque la incidencia de casos nuevos por año de cáncer de tiroides es baja, la mayoría de pacientes pertenecen al subgrupo de carcinomas de origen folicular bien diferenciado, con una sobrevida que se ve poco afectada por tumor, de tal forma que la población que queda bajo seguimiento clínico para controlar la recurrencia es mucho más alta. Esta necesidad de un control cercano y de por vida, está dada por la alta frecuencia de recurrencia clínica, hasta un 30% aún después de una terapia aparentemente exitosa. **(1, 2)**. Mientras la mayoría de recurrencias se presentan en los 5 primeros años de seguimiento, estas pueden ocurrir tan tardíamente como décadas después del tratamiento inicial, dadas generalmente por metástasis a ganglios regionales del cuello, (diseminación

linfática) y menos frecuentemente por metástasis de diseminación hematológica a distancia **(1, 2, 3)** especialmente a pulmon y hueso.

Los factores de riesgo para recaída y muerte, considerados al momento inicial de la cirugía, usualmente ayudan en la selección de los grupos de alto riesgo que requieren un seguimiento más agresivo y terapia complementaria. **(3)**. Las variables para la clasificación, están dadas por las características tanto del paciente como del propio tumor. Siendo la variable independiente más importante para recaída es la edad mayor de 45 años al momento del diagnóstico. Las características dadas por el tumor incluyen: a) el grado de diferenciación, b) tamaño y compromiso peritiroideo (T1 a T4), c) el compromiso de ganglios regionales (N0 o N1) y d) presencia de metástasis a distancia (M0 o M1). Basados en estos factores, la “Unión Internationale Contre le Cancer” (UICC) clasifica a los pacientes en estadios I a IV de acuerdo al menor o mayor riesgo para recaída y muerte. **(71)**

1.1.2. Tratamiento del cáncer de tiroides de origen folicular bien diferenciado.

El tratamiento del cáncer de tiroides incluye la resección quirúrgica del tiroides y de los tejidos peritiroideos comprometidos, de los ganglios afectados y de las metástasis a distancia, cuando estas sean resecables. Posterior a la cirugía, el paciente recibe terapia con yodo radioactivo (I 131) con un doble objetivo :

- a. Destruir micrometástasis que puedan existir a nivel de ganglios regionales o a distancia , y
- b. Destruir tejido tiroideo residual normal que haya quedado después de la cirugía y así facilitar el seguimiento por medio de la tiroglobulina. Igualmente, la ausencia de tejido tiroideo residual normal, incrementa la sensibilidad para posteriores rastreos con yodo, y maximiza el efecto de dosis altas en el manejo de las recaídas. **(4)**

Después de estas intervenciones, el paciente recibirá de por vida hormona tiroidea exógena a altas dosis, con el objeto de suprimir la producción fisiológica de TSH (hormona estimulante del tiroides - tirotropina), y evitar su acción estimulante sobre el tumor. **(5, 6)**. La radioterapia externa está indicada solo cuando queda tumor macroscópico no resecable quirúrgicamente, ya sea local o a distancia. La quimioterapia no ha mostrado beneficio en este tipo de tumores.

1.1.3. Seguimiento de Pacientes con cáncer de tiroides

Dado que la mayoría de las recurrencias pueden manejarse con éxito por medio de tratamientos de baja morbilidad como I131 o tratamiento quirúrgico limitado, el desarrollo de métodos para detección temprana de la recída o de la enfermedad residual es prioritario. **(7)**. La evaluación de los pacientes en seguimiento por cáncer del tiroides de origen folicular se focaliza en la evaluación clínica y en la apropiada aplicación de las ayudas de diagnósticas de laboratorio, de imágenes y ocasionalmente exámenes citológicos. Entre estos procedimientos hay dos pruebas que tienen la mayor sensibilidad y especificidad, basados en las características propias de la célula folicular **(6)**:

- a. Su habilidad de producir tiroglobulina (Tg) que puede ser detectada en sangre
- b. Su habilidad para concentrar yodo permitiendo la detección por imágenes después de la administración de I 131.

Estas características son dependientes del adecuado estímulo del receptor de TSH por parte de la TSH circulante.

1.1.4. Marcadores utilizados para el seguimiento de cáncer de tiroides de origen folicular.

A. Tiroglobulina: (Tg)

Después de la tiroidectomía total y de la ablación exitosa del remanente, los mediciones de Tg sérica deben permanecer en niveles indetectables. Por consiguiente, una elevación de la Tg será una evidencia indirecta de la presencia de tejido tiroideo residual normal o tumoral. Dado el alto grado de diferenciación celular en estos tumores, la célula neoplásica folicular conserva las características funcionales de la célula original, de forma tal que al mantener la TSH suprimida, eventualmente no liberará Tg. Así, para lograr máxima sensibilidad en la detección de cáncer residual por la determinación de Tg, se requiere elevar la TSH, suspendiendo el aporte de hormona tiroidea exógena. La especificidad de la Tg como marcador tumoral, también se ve reducida si existe tejido tiroideo residual normal después de una cirugía incompleta o ablación no exitosa. La sensibilidad para detectar enfermedad midiendo la Tg durante el retiro de la hormona tiroidea y liberación de la TSH, es del 85 al 95%, pero puede disminuir hasta un 50% si los niveles son medidos bajo supresión de TSH. Sin embargo, el retiro de la hormona tiroidea, aunque aumenta la sensibilidad de los métodos diagnósticos, resulta en un hipotiroidismo sintomático y en eventual crecimiento del tumor. **(8)**.

El uso de la TSH recombinante humana (rhTSH) ha sido aprobado por la FDA (US Food and Drug Administration) para lograr niveles séricos elevados de TSH previo a la medición de Tg (maximizando así su sensibilidad), y al rastreo con yodo radioactivo en pacientes en seguimiento por cáncer de tiroides. La rhTSH es una forma de TSH altamente purificada, sintetizada en una línea celular de ovario de hamster chino. Un patrón de glicosilación diferente de la TSH humana nativa explica su vida media prolongada. **(67, 68)**. La rhTSH permite la detección de un 22% más de enfermedad residual que cuando la medición de Tg se hace con TSH suprimida. **(9)**. Es importante anotar que en nuestro medio, no disponemos de rhTSH y la disponibilidad de la misma está limitada por su alto costo, por lo que usualmente es necesario suspender el aporte de hormona tiroidea exógena por 4 semanas llevando al paciente a un hipotiroidismo franco, con la morbilidad que esto conlleva, y con el riesgo adicional de favorecer el crecimiento tumoral al permitir TSH elevadas por tiempo prolongado.

B. Anticuerpos Antitiroglobulina: (ATG)

Entre un 20 a 30% de pacientes con cáncer de tiroides presenta elevación de anticuerpos antitiroglobulina en suero. La presencia de estos compromete el uso de la tiroglobulina sérica como marcador, al impedir la adecuada medición por factores técnicos. Los niveles séricos de estos anticuerpos tienden a disminuir con el tiempo en pacientes que no presentan enfermedad residual. Por otro lado, su nivel tiende a incrementarse o a permanecer sin cambios en aquellos pacientes con enfermedad persistente. De esta forma, algunos autores han propuesto que las mediciones seriadas de los anticuerpos antitiroglobulina pueden por sí mismas tener algún valor diagnóstico, y podrían ser usadas como marcadores tumorales.

Sin embargo, hay considerable variación y al menos 10% de los pacientes que están libres de enfermedad, pueden tener anticuerpos antitiroglobulina estables o en incremento a causa de una enfermedad microscópica estable o debido a la existencia de células linfocíticas de memoria, las cuales continúan produciendo anticuerpos a lo largo del tiempo. **(10)**. Así, este grupo importante de pacientes en seguimiento, carece en la actualidad de un marcador tumoral específico que permita su adecuado seguimiento.

C. Rastreo corporal con yodo radioactivo: (^{131}I)

Como se mencionó previamente, el buen grado de diferenciación de la célula tumoral de origen folicular, permite aprovechar sus características para facilitar el seguimiento en los pacientes. El rastreo corporal total, posterior a la administración oral de una dosis de yodo radioactivo de 3 a 5 milicurios (Mci) permite la visualización de focos tumorales que hayan alcanzado un tamaño

suficiente en cuello o en un sitio distante. La sensibilidad del I 131 para detectar tumor, es más baja que la de la tiroglobulina, ocurriendo falsos negativos en pacientes que presentan evidencia de enfermedad por otros medios. Varios factores pueden contribuir a los rastreos negativos en la presencia de metástasis sospechadas o definitivas:

- Contaminación por yodo,
- Inadecuada elevación de TSH,
- Metástasis muy pequeñas para ser visibles
- Pérdida de la habilidad de captar yodo por las células tumorales tiroideas, relacionada con pérdida del cotransportador yodo-sodio.

Estos falsos negativos pueden ser disminuidos usando dosis terapéuticas mucho más altas de 100 milicurios o más. Sherman **(4)** reporta 10% más de posibilidades de visualizar nuevos focos de captación en rastreos posteriores con dosis de terapia alta. **(3)**. Sin embargo, un porcentaje importante de pacientes sigue siendo negativo al rastreo a pesar de tener enfermedad comprobada por otros métodos. **(69)**.

El I 131 suministrado sigue exactamente el mismo curso del yodo inorgánico utilizado por la célula tiroidea para producir la hormona tiroidea. Cruza a través de la superficie basal de la célula, posteriormente es excretado dentro del lumen folicular para ser oxidado y organificado por la peroxidasa tiroidea, uniéndose a la tiroglobulina en la interfase entre la membrana celular y el coloide. El yodo retorna dentro de la célula como resultado de pinocitosis del coloide conteniendo tiroglobulina, seguida por clivaje lisosomal de la tiroglobulina para producir hormonas tiroideas. Cuando el I 131 es administrado a pacientes, la cantidad del isótopo que es tomada por las células tiroideas y la cinética de liberación del yodo de estas células, contribuye a la absorción de una dosis de radiación instantánea y acumulativa en las células foliculares. **(4)**. El yodo 131 acumulado en la célula folicular libera electrones de alta energía que inducen a radiación beta localizada, produciendo citotoxicidad, así como también liberando rayos gamma que son los que permiten los procedimientos de detección por rastreo.

La agresividad de las evaluaciones de seguimiento debe estar relacionada con la clasificación de riesgo del paciente. Aunque faltan estudios definitivos conclusivos que indiquen que la detección temprana y ablación del tumor residual prolongan la vida o curan el cáncer, es difícil negar esta posibilidad basados en la naturaleza biológica de las malignidades. **(11)**. Por otro lado, es más probable que un tratamiento sea exitoso y tenga mayor repercusión en el pronóstico cuando la masa tumoral es pequeña y descubierta en forma temprana, particularmente en el

caso de metástasis pulmonar. Las recurrencias tardías, incluyendo metástasis pulmonares, que son vistas tanto en el carcinoma folicular como en el papilar, probablemente son casos de enfermedad persistente que ha estado por debajo de los límites de detección en los test usuales en pacientes que clínicamente aparentan estar libres de enfermedad, algunas veces por muchos años. **(12)**.

Actualmente, se vienen desarrollando técnicas muy sensibles para la identificación de células tiroideas circulantes usando amplificación del RNA mensajero por medio de RT-PCR, que pueden ser un sistema de seguimiento promisorio. **(1)**.

1.2. TIROGLOBULINA

1.2.1. Generalidades

La tiroglobulina (Tg) es una glicoproteína secretada exclusivamente por la célula folicular tiroidea, bajo el control de la TSH de producción hipofisiaria. La estructura cuaternaria de la proteína está compuesta por dos subunidades idénticas de 300 kd, codificadas por un gen simple de más de 300 kb, el cual incluye más de 42 exones con intrones tan largos como de 64 kb y posee una secuencia codificante de 8.300 pb. El gen se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 8 (8q24), distal al locus c-myc. **(2, 13)**. A pesar de alguna evidencia de procesamiento diferencial del RNAm, la expresión del gen de la Tg en tejido tiroideo normal y neoplásico resulta en un simple RNA mensajero de 8.5 kb **(2, 13)**. Algunos factores de transcripción como TTS-1, TTS2 y PAX8 controlados por la TSH, modulan la expresión del gen de la Tg, por unión a su porción promotora.

La proteína posee un total de 134 residuos tirosil, de los cuales, menos de 1/5 están yodinados. De estos, tan solo 6 a 8 llegan a producir yodotironinas. Las reacciones de iodización de los residuos tirosil, ocurren a nivel de los 4 mayores sitios de hormonogénesis conocidos como A-D.

La formación de Tg madura requiere un proceso complejo de glicosilación, doblaje y dimerización de las dos subunidades. **(13)**. El polipéptido de la Tg, sintetizado en la superficie del retículo endoplásmico es traslocado al lumen reticular. Allí la síntesis de cadenas de carbohidratos es efectuada a medida que el polipéptido sufre una serie de cambios conformacionales ayudados por moléculas chaperonas. Una vez que se han formado los dímeros estables, la proteína naciente entra al complejo de Golgi, donde las unidades de carbohidratos son completadas y ocurre sulfatación. **(14)**.

Una vez formado el péptido es exportado al lumen del folículo para iodinación por las peroxidasas tiroideas y para almacenamiento. Allí permanece hasta que por necesidades del organismo, la Tg es retomada a la célula folicular mediante micropinocitosis. La Tg internalizada sufre clivaje proteolítico en los lisosomas, un proceso por medio del cual libera las hormonas tiroideas T3 y T4 y posteriormente degrada la mayoría de la molécula de Tg restante. Una pequeña cantidad de Tg intacta alcanza la circulación por medio de mecanismos que aún son poco entendidos. **(15)**.

Puentes disulfuro mantienen la estructura espacial de la Tg aún después de proteólisis parcial. La Tg permanece mayoritariamente dentro de los folículos siendo impedida su salida por la pared folicular la cual está formada por células tiroideas conectadas unas a otras por uniones cercanas. La vida media de la tiroglobulina circulante es aproximadamente de 65 horas. Su depuración está influida por su tamaño molecular y su contenido de ácido siálico.

No se conoce un papel fisiológico para la Tg circulante. En un tiroides sano, solo una mínima cantidad de Tg integra y péptidos degradados alcanzan la circulación general. Sin embargo, en casos patológicos como inflamación y cáncer tiroideo, altas concentraciones de tg pueden alcanzar la circulación general por destrucción de la pared folicular. **(15)**.

La Tg circulante es recapturada por el tirocito y por células no tiroideas como los macrófagos en hígado y otros tejidos. Una comparación de Tg proveniente del tiroides normal y del tiroides enfermo, muestra que hay heterogenicidad en la glicosilación y en la iodinación de la proteína. Esta heterogenicidad tiene el potencial de cambiar la conformación molecular de la Tg y por consiguiente, enmascarar o exponer epítopes que podrían influenciar la inmunoreactividad de la molécula. **(15)**.

1.2.2. Utilidad como marcador tumoral

La Tg es reconocida como una proteína tejido-específica, de producción exclusiva de la célula folicular tiroidea. En sujetos sanos, con tejido tiroideo normal, se deben detectar niveles séricos de la proteína. En contraposición, todo sujeto en quien se haya retirado quirúrgicamente el tiroides o se haya destruido el tejido por radiación, no debe evidenciar Tg en suero. Es así, como en pacientes en seguimiento por carcinoma de tiroides de origen folicular, ya operados y tratados con yodo radioactivo, los niveles de Tg son interpretados como marcador tumoral específico.

El término recurrencia en cáncer es un nombre erróneo a luz de los exámenes sensitivos como tiroglobulina que pueden documentar que muchos, sino todos, los pacientes con cáncer tiroideo ya tratado y que persisten con niveles de Tg elevada, tienen enfermedad residual en progresión, la cual llegará a ser evidente como recurrencia clínica en seguimiento posterior. **(16)**.

Los niveles de Tg sérica, se consideradan como el marcador tumoral que brinda mayor información en el seguimiento de pacientes con cáncer bien diferenciado de tiroides de origen folicular. Lubin **(17)** en su serie de 261 pacientes en seguimiento, (58 pacientes en recaída), informa una sensibilidad de 88% y una especificidad del 99%, en pacientes con muestras tomadas mientras tenían TSH elevada y tomando como punto de corte de Tg 10 ng/ ml. Van den Bergh, en su serie informa una sensibilidad de 100% y una especificidad de 83%, cuando la Tg es medida con TSH no suprimida. En esta misma serie, las mediciones hechas con TSH suprimida, informan una especificidad y sensibilidad de 92% y 88% respectivamente. Mazzaferri **(12)** en su serie de 107 pacientes (11 pacientes en recaída) informa una sensibilidad de 100%, una especificidad del 91%, un valor predictivo positivo de 55% y un valor predictivo negativo de 100%, cuando las mediciones de Tg se hicieron después de estímulo con rhTSH. Así, la Tg es considerada un marcador confiable de enfermedad persistente, recurrente o metastásica después de una tiroidectomía total y destrucción del tejido tiroideo residual (normal y/o tumoral) por radioablación con I 131.

Como se mencionó previamente, en pacientes sin tiroides los niveles de tiroglobulina deben ser indetectables. Una elevación de Tg durante el monitoreo de un paciente con cáncer ya tratado se debe principalmente a un incremento en la masa tumoral (en caso de estar la TSH estable) o un incremento en la TSH (cuando la masa tiroidea es estable). Si el paciente permanece con TSH suprimida y se supone que no existe tejido tiroideo, los niveles de Tg deben ser indetectables. Después de la estimulación de TSH el tejido tiroideo bien diferenciado normal o tumoral típicamente muestra un incremento de Tg de 3 a 20 veces. Tumores menos diferenciados, muestran una respuesta disminuida usualmente menor de 3 veces en el incremento de Tg en respuesta al estímulo, sugiriendo que ellos tienen probablemente disminución de los receptores de TSH. **(1)**. De esta forma, en el paciente con cáncer bien diferenciado de tiroides, la determinación sérica de tiroglobulina estará afectada por:

- a. La estimulación de TSH endógena y/o exógena **(70)**
- b. La capacidad del tumor de sintetizar y secretar tiroglobulina inmunológicamente activa, capaz de ser reconocida por el ensayo.
- c. La cantidad de tejido tumoral presente. **(2)**

Los niveles de producción de tiroglobulina sérica no predicen la capacidad de captación del yodo. Igualmente lo contrario también es cierto. Estas dos actividades reflejan dos funciones diferentes: a) La de síntesis de tiroglobulina y b) La de captación de yodo por la célula tiroidea.

A pesar de su excelente desempeño como marcador tumoral, la medición de Tg sérica presenta un serio inconveniente, que impide su utilización. De los pacientes con cáncer de tiroides bien diferenciado, 15 a 30% presentan anticuerpos antitiroglobulina circulantes **(18, 19, 20, 21, 22, 66)**; y en ellos, no existe un método de medición de Tg que esté libre de interferencia. Así, este grupo de pacientes carece de un marcador adecuado.

1.2.3. Métodos de medición de Tiroglobulina e interferencia

Los métodos actuales de medición de Tg se basan en inmunoanálisis y son de dos tipos:

- a. Métodos de radioinmunoanálisis: (RIA) con anticuerpo simple o doble.
- b. Métodos inmunométricos (IMA) de doble anticuerpo, los cuales pueden ser: IRMA (Inmuno Radio Métrico) e ICMA (Inmuno Químico Luminiscente).

De estos métodos, los IMA son más precisos y sensitivos.

Los niveles de Tg pueden aparecer falsamente disminuidos en suero en pacientes con cáncer de tiroides y que presentan evidencia de enfermedad por otros métodos diagnósticos. Esto se puede deber a:

- a. Producción de moléculas de Tg anormal, inmunológicamente no activa, que no es identificada por los anticuerpos usados en el inmunoensayo.
- b. Tumores tiroideos en los que la capacidad biosíntesis es mantenida pero no conservan la capacidad secretoria; (hay evidencia inmunohistoquímica de Tg intracelular en ausencia de detectable concentración en suero) **(23)**.
- c. La causa principal comprobada de no elevación de la Tg en pacientes con evidencia de enfermedad, es la presencia de ATG. La mayoría de métodos disponibles subestiman o sobrestiman las concentraciones de Tg, cuando están presentes los anticuerpos, y no hay en la actualidad un método confiable para medir Tg en presencia de ATG. **(19)**.

Los métodos de medición de moléculas por inmunoensayo, se basan en reacciones de 3 pasos consecutivos. En un primer paso, un anticuerpo policlonal, dirigido a la molécula en estudio y unido a una fase sólida, reacciona con el suero del paciente, atrapando la molécula blanco (anticuerpo de captura). En un segundo paso, se adiciona un segundo anticuerpo monoclonal, marcado radioactiva o enzimáticamente, dirigido contra la misma molécula blanco, pero a un epítoto diferente al del primer anticuerpo (anticuerpo de reconocimiento). Al entrar en contacto el segundo anticuerpo con la molécula blanco previamente inmovilizada en la fase sólida, queda adherido a ella. La sustancia a estudio

queda así localizada entre los 2 anticuerpos. Todo segundo anticuerpo que no encontró sitio de unión a una molécula inmovilizada es posteriormente eliminado. En un último paso, se mide la radioactividad o la actividad enzimática del segundo anticuerpo, permitiendo así la dosificación de la molécula estudiada.

Si se va a llevar a cabo una medición de Tg en un paciente que tiene Atg presente en suero, es evidente que se presentará una interferencia en la medición de la Tg. La magnitud de la interferencia se relaciona con la afinidad del primer anticuerpo del ensayo o sea del anticuerpo unido a fase sólida, (Anticuerpo de Captura). Se relaciona también con la especificidad del segundo anticuerpo del ensayo (Anticuerpo de Reconocimiento) y con las características de los anticuerpos presentes en el suero dado por el paciente. La subestimación de la concentración de Tg en presencia de anticuerpos que interfieren es característico de los métodos inmunométricos, en los que el complejo formado por la Tg y el anticuerpo del paciente, parece estar inhibido para participar en forma completa en la reacción de dos sitios. En este caso, el valor de Tg sérica puede estar inapropiadamente bajo en un paciente con ATG en suero aún en presencia de enfermedad residual o metastásica. **(19)**.

1.3. ANTICUERPOS ANTITIROGLOBULINA

1.3.1. Generalidades

La tiroglobulina está presente en pequeñas cantidades en el suero de sujetos normales. Estas concentraciones son mayores en una variedad de condiciones patológicas. Su presencia en el suero indica claramente que la tiroglobulina no puede ser considerada como un antígeno secuestrado. Aunque previamente se consideró que la tiroglobulina no era inmunogénica a menos que la tolerancia hubiera sido alterada, la evidencia disponible en la actualidad demuestra que esta proteína es capaz de inducir presencia de anticuerpos aún en sujetos sanos. **(24)**

En términos generales, los anticuerpos antitiroglobulina presentes en el humano pertenecen a dos grupos diferentes:

- a) Autoanticuerpos naturales (NAA)
- b) Autoanticuerpos patológicos con actividad autoinmune.

El mapeo de epítopes de la tiroglobulina humana ha revelado 6 dominios antigenicos diferentes (Regiones I a VI). La especificidad de anticuerpos antitiroglobulina naturales y patológicos difiere para estas regiones. En las patologías tiroideas autoinmunes y en el cáncer tiroideo de origen folicular, se encuentran anticuerpos con actividad autoinmune, de alta afinidad por la región II, mientras una respuesta policlonal de baja afinidad contra regiones hormonogénicas evolutivamente conservadas (III, IV y V), parece ser característica de los anticuerpos antitiroglobulina naturales vistos en individuos normales. **(24)**.

La presencia de anticuerpos ATG en pacientes con cáncer de tiroides ha sido reportada hasta en un 30% de los casos. Esta antigenicidad aumentada con respecto a la población sana, que del 15%, y parece deberse a exposición de epítopes críticos, cuando la tiroglobulina es liberada a la circulación general en forma de péptidos parcialmente digeridos por la célula tiroidea tumoral.

1.3.2. Tipos de anticuerpos antitiroglobulina

La tiroglobulina induce producción de anticuerpos de dos tipos:

- a. Autoanticuerpos Naturales (NAA). Este tipo de anticuerpos, tienen un repertorio extremadamente conservado y van dirigidos contra autoantígenos conservados evolutivamente, característica que indica una fuerte selección. **(25)**. Estas observaciones dan apoyo a la noción de que los autoanticuerpos naturales son una manifestación fisiológica de autorreactividad expresada en individuos sanos y representa la respuesta normal a antígenos propios. Los autoanticuerpos naturales no son producidos en ausencia de estimulación antigénica, ya que ellos son estimulados por antígenos autólogos que están constantemente presentes. Como característica son multirreactivos a una variedad de antígenos propios y exógenos. Estos autoanticuerpos naturales son codificados por genes que no han sufrido mutaciones somáticas extensas ni maduración de afinidad, lo que les da su característica de ser de baja afinidad y de ser multirreactivos. **(25)**.

Su característica de reacción cruzada con antígenos no propios sugiere que los anticuerpos autorreactivos pueden jugar un papel en la inmunidad natural contra la infección e igualmente contribuyen a la depuración de productos catabólicos, ya que se unen a los tejidos propios degradados o dañados para facilitar la opsonización y fagocitosis y, de esta forma, ayudar a la eliminación de células senescentes del organismo. **(26)**.

Los anticuerpos antitiroglobulina naturales **(63)**, están dirigidos a los dominios hormonogénicos de la molécula y se ha demostrado que los linfocitos T, responden *in vitro* más vigorosamente a la tiroglobulina yodada, que a la no yodada. **(24)**. La yodación de la molécula de tiroglobulina cambia sus características antigénicas, ya que la inserción de yodo puede alterar la configuración estereoquímica de la molécula de tiroglobulina y así afectar la manera por la que el sistema inmune la reconoce, induciendo ganancia de algunos epitopes ocultos y pérdida de otros. **(24)**. Está comprobado que la tiroglobulina producida por el tejido tiroideo tumoral es pobremente iodada, y probablemente no induce presencia de anticuerpos naturales.

- b. Autoanticuerpos con actividad inmunológica.
Los autoanticuerpos “inmunes” muestran reactividad específica y han pasado los estadios de maduración de la afinidad, mutación somática y selección antigénica. A diferencia de los NAA, están relacionados con los procesos de enfermedad autoinmune. Típicamente estos anticuerpos han pasado el proceso de maduración y muestran mayor afinidad antigénica. **(25)**. Esta característica permite diferenciar la autoinmunidad fisiológica de la autoinmunidad patológica. Su presencia indica una pérdida de tolerancia inmunológica a las moléculas propias por una alteración en los sistemas de tolerancia (delección) inmunológica.

Previamente se consideraba que la selección tímica negativa, con delección de linfocitos que mostraran autoreactividad, era efectiva como mecanismo inductor de autotolerancia solo para las moléculas ampliamente expresadas, tales como proteínas circulantes o componentes de membrana, sin embargo, evidencia reciente sugiere que las moléculas con expresión tisular restringida (también conocidas como proteínas periféricas), son expresadas en el timo y en tejido linfóide extratímico a través de un mecanismo de transcripción ectópica, **(27)** para mantener la autotolerancia. Así, la autoinmunidad patológica desarrollada contra proteínas propias de expresión tisular específica, estaría relacionada con la baja expresión de genes ectópicos a nivel de los tejidos del timo y tejidos linfoides extra tímicos que no permitirían un reconocimiento de lo propio. **(27)**

Los anticuerpos antitiroglobulina están dirigidos a epítopes conformacionales ya que el clivaje tríptico destruye los mayores dominios antigénicos de la molécula nativa, **(24)** y están restringidos a áreas específicas llamadas regiones inmunodominantes. Es posible que la liberación a circulación general de tiroglobulina parcialmente fragmentada, esté incrementada por alteración del epitelio folicular alterada como consecuencia de la pérdida de adhesión intercelular. Esta Tg parcialmente fragmentada es altamente inmunogénica al exponer epítopes crípticos o escondidos **(61, 62)** que desencadenan el fenómeno autoinmune y que sea este el factor predominante que cause incremento de anticuerpos en pacientes con cáncer tiroideo de origen folicular.

1.3.3. Utilidad como marcador tumoral

Algunos autores han sugerido y estudiado la posibilidad de utilizar la presencia de dichos anticuerpos y su comportamiento en el tiempo, como marcadores de persistencia de enfermedad ya que su presencia indicaría la producción sostenida del antígeno por parte de la célula tumoral. **(20, 21, 22)**. Sin embargo, la utilidad de los ATG debe ser críticamente evaluada, ante la evidencia actual de la persistencia de anticuerpos circulantes, aún en ausencia del antígeno estimulante.

1.4. ENFERMEDAD RESIDUAL MINIMA

1.4.1. Generalidades

Se define como enfermedad residual mínima las células tumorales viables que quedan en el organismo después que ha finalizado un tratamiento oncológico y que por su mínimo volumen no son detectables por imágenes de alta resolución o por los exámenes histopatológicos convencionales. **(30)**.

De acuerdo a la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer), la enfermedad tumoral residual incluye **(31, 40)** :

- a. Micrometástasis: Definida como una acumulación de células tumorales menor de 2 mm (correspondiente a una concentración de 1.000.000 células), independiente del tumor primario, sin suplencia vascular propia y que se encuentra usualmente en los ganglios regionales o en la médula ósea.
- b. Células cancerosas diseminadas (DCC), definidas como células tumorales viables, encontradas a nivel de médula ósea o en sangre periférica, con potencial de producir metástasis.

Estas células tumorales ocultas pueden permanecer en un estado biológico "dormido" en estado G 0 del ciclo celular durante años, o aún por toda la vida; o pueden en un momento dado reactivarse, entrar a ciclo celular y reiniciar su expansión. El estado de actividad biológica de una célula, puede ser determinado de acuerdo a la presencia o ausencia de expresión de antígenos asociados a proliferación. Los antígenos nucleares Ki-67 y p120, son expresados en todas las células cuyo ciclo celular ha sobrepasado el estado G1, demostrando que la célula ha entrado en ciclo celular. **(60)**

Una micrometástasis por su tamaño, no requiere de la neoformación de vasos sanguíneos, dado que los capilares previamente presentes en el tejido donde se ha localizado le permiten tener un aporte suficiente de nutrientes y de oxígeno. Sin embargo, si el crecimiento celular persiste, comienza a ocurrir necrosis a nivel de las células localizadas en el centro de la micrometástasis por hipoxia. Esta misma hipoxia es el estímulo (tanto en el tejido normal como en el tejido tumoral) para la formación de nuevos capilares, proceso conocido como angiogénesis. Una vez la micrometástasis ha logrado sobrepasar esta limitante, continua el crecimiento pudiendo evolucionar a macrometástasis.

1.4.2. Estadiaje TNM por patología

Por medio de la clasificación TNM, un tumor se estadia de acuerdo a:

- Su invasión local (T),
- El compromiso de ganglio (N)
- La presencia o ausencia de metástasis (M)

En la actualidad esta clasificación se basa en la extensión anatómica, evaluable por imágenes de alta resolución, las cuales detectan enfermedad metastásica si el tamaño del agregado de células tumorales permite su visualización y es comprobable por estudios de anatomía patológica bajo microscopía convencional **(32)**. A la luz de estos conceptos, se considera que los pacientes con tumores sólidos clasificados en un estadio temprano (N0, M0), tienen un mínimo riesgo para la recaída y reciben tratamiento local, (resección quirúrgica del tumor). Por otra parte, si hay evidencia patológica de extensión local y de compromiso a distancia, el paciente es programado para recibir tratamiento complementario. En el estudio patológico, los linfáticos regionales son evaluados cuidadosamente. El compromiso de nódulos linfáticos regionales positivos durante el proceso de clasificación es un indicador pronóstico significativo, dado que denota enfermedad sistémica al igual que las metástasis a distancia.

1.4.3. Estadiaje molecular

De acuerdo a la clasificación TNM, ni la médula ósea ni la sangre periférica, son evaluadas en forma rutinaria buscando la presencia de células tumorales, las cuales informan sobre presencia de enfermedad sistémica y representan un episodio importante en el proceso de metástasis. La falta de este tipo de evaluación es la que explica porque del 20 a 30% de pacientes con tumores sólidos declarados en algún momento como libres de enfermedad, presentan recaídas posteriores indicando claramente que desde el tratamiento inicial quedó enfermedad oculta **(33-34)**. La importancia de detectar la enfermedad mínima radica en que este grupo de pacientes se beneficiaría de una terapia inicial más agresiva evitando la recaída tardía. Los recientes análisis clínicos multivariados han demostrado que el primer factor pronóstico para recaída tardía es precisamente la presencia de células tumorales circulantes o de micrometástasis no identificadas.

1.4.4. Marcadores de enfermedad residual mínima

Dada la aceptación de la enfermedad residual mínima como la causante de recaídas tardías, se comenzaron a desarrollar diferentes técnicas que permitieran su detección con el objeto de decidir que pacientes requerían de un tratamiento complementario. Es así como se han desarrollado diferentes técnicas con el fin de detectar la enfermedad. En la práctica clínica actual este objetivo se logra mediante el uso de marcadores tumorales.

A. Marcadores Tumorales Proteícos

Son proteínas medidas en suero o plasma, que tienen algún grado de especificidad por un tumor particular. Estos marcadores son detectados gracias a que las concentraciones encontradas en suero permiten ser cuantificadas por métodos inmunológicos como IMA (Análisis Inmunométrico); sin embargo estos marcadores usualmente tienen una limitada sensibilidad y especificidad. **(35)**

B. Inmonocitoquímica

En los tumores sólidos, esta técnica se ha utilizado desde hace más de 20 años, permitiendo la localización de células epiteliales en médula ósea y ganglio linfático mediante la utilización de anticuerpos monoclonales marcados, dirigidos a antígenos de superficie epitelial específicos, **(36, 34)**. Dado que las citokeratinas (CK) son componentes integrales del citoesqueleto de las células epiteliales, están regularmente expresadas en tumores de origen epitelial. El patrón de citoqueratinas expresadas, indica el epitelio del cual la célula tumoral es derivada, permitiendo así la localización de estas células cuando se encuentran en médula ósea o en sangre. **(30)**. Aunque es posible desarrollar esta técnica a nivel de sangre periférica requiere del enriquecimiento de la muestra por medio de separación inmunomagnética. Así, aunque la técnica da una adecuada sensibilidad, es de alto costo y requiere un tiempo largo de procesamiento y análisis.

C. Técnicas Moleculares

El interés por las células tumorales circulantes se remonta al año 1869 cuando Ashworth reportó el caso de un paciente con cáncer en quien se encontró células tumorales similares al tumor, en la sangre después de la muerte. **(34, 37)**. Posteriores estudios buscando células tumorales bajo microscopía de luz, demostraron tener muy baja sensibilidad, siendo abandonados los estudios citológicos en sangre.

En la pasada década, la biología molecular ha demostrado importantes aplicaciones en patología oncológica. El estadiaje molecular puede determinar el verdadero pronóstico del paciente a la luz de la presencia o ausencia de enfermedad residual mínima en el momento del diagnóstico inicial o durante el seguimiento **(32, 33)**. Se basa en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos de células o tejidos de interés. **(38)** Mencionaremos aquí algunas de estas técnicas actualmente en uso:

C.1. FISH: (hibridación *in situ* con fluorescencia). En esta técnica, una sonda con la secuencia complementaria al DNA bajo investigación, es aplicada sobre una sección de tejido o una preparación celular. El DNA *in situ*, ha sido previamente denaturado para permitir el anillaje de la sonda. Se puede usar una o más sondas marcadas con diferentes fluorocromos. El análisis permite la visualización de alteraciones cromosómicas amplias tales como traslocaciones, duplicaciones y deleciones.

C.2. PCR: (reacción en cadena polimerasa).

Esta técnica permite la amplificación de una secuencia específica de ácidos nucleicos para su posterior análisis. Se basa en la amplificación selectiva *in vitro* de una región particular de DNA, definida por la posición de iniciadores específicos y llevada a cabo por una serie de ciclos compuestos por tres pasos.

- El primer paso es la denaturación de la doble cadena de DNA por medio de altas temperaturas, permitiendo generar templados de DNA.
- El segundo paso: a menor temperatura permite que los iniciadores previamente sintetizados se hibridicen, específicamente en el sitio complementario del templado (anillaje).
- En el tercer paso (extensión), la taq polimerasa permite la extensión de los iniciadores en sus extremos 3'OH por la sucesiva adición de dNTPs. De esta forma, se simula el fenómeno de replicación de DNA *in vivo* **(34,37)**. Este proceso llevado a cabo en un termociclador permite que la secuencia de interés sea doblada en cada ciclo produciendo una amplificación de tipo exponencial.

Los iniciadores usados deben tener un tamaño adecuado (15-25bp) para que así anillen específicamente en la región de DNA que se desea amplificar. Las secuencias a amplificar pueden ser de DNA genómico o de DNA copia, obtenido este último a partir del RT-RNA.

La presencia de ácidos nucleicos, DNA y RNA en el plasma de sujetos sanos y enfermos ha sido reconocida desde hace más de 50 años, y específicamente

en pacientes con cáncer, desde 1970. Sin embargo no fue sino hasta 1989 que en base a los estudios de Stroun et al, las características neoplásicas del DNA circulante en pacientes con cáncer fueron reconocidos. **(35)**

C.2.1. PCR de DNA

El DNA es notablemente más estable que el RNA. Su obtención es relativamente fácil ya que las DNAasas inevitablemente presentes en los tejidos, pueden ser inactivadas por medio del calor o agentes químicos como EDTA. **(30)** En el estudio de células circulantes provenientes de tumores sólidos, se pueden amplificar mutaciones específicas en secuencias definidas de DNA, por ejemplo en protooncogenes (*Kras*), en genes supresores de tumores (*P53*) o en inestabilidad de microsatélites y ser usados como marcadores tumorales. **(32)**.

C.2.2. PCR de RT-RNA

Esta técnica permite la amplificación de genes tumorales expresados o de genes tejido específicos expresados. A diferencia de la estabilidad del DNA, el RNA es inestable. Las enzimas con actividad RNAasa son muy estables y difíciles de remover, adicionalmente fácilmente ocurre contaminación con RNAasas presentes en la piel del operador durante la manipulación de la muestra.

Dado que el RNA no puede servir como templado para PCR, se requiere la transcripción reversa del RNA mensajero para formar DNA copia. Este DNA copia es posteriormente amplificado por PCR, dando la combinación RT-PCR. Su sensibilidad es tan alta que permite la detección de una sola célula tumoral sobre un fondo de hasta 100 millones de células en médula ósea o en sangre periférica.

Los iniciadores seleccionados, idealmente deben anillar en exones diferentes. Esto permite la diferenciación del segmento amplificado de DNAC con respecto al amplificado a partir del DNA genómico, el cual tendrá mucho mayor tamaño al tener incluido un intrón.

El RT-PCR permite detectar diferencias en la expresión génica y es usado en forma dirigida para evaluar la expresión de RNAm específico de los tejidos. Células diferentes expresan grupos específicos de RNAm (1A), los cuales se han propuesto para detección de metástasis, ya que no debe existir en las células de ganglio linfático, médula ósea, o sangre. Se asume así, que la detección de la expresión del RNA blanco, es indicativa de presencia de células tumorales.

El análisis por RT-PCR puede mejorar su sensibilidad usando técnicas de separación inmunomagnéticas, por medio de las cuales la muestra es enriquecida usando partículas magnéticas cubiertas con anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de las células epiteliales **(37)**.

La metodología del PCR-RNA viene siendo usada desde 1987 y ha sido empleada en la detección de células tumorales circulantes en diferentes neoplasias como la detección de RNA de tirosinasa en melanoma, tirosinhidroxilasa en neuroblastoma y citoqueratina en cáncer de seno. En 1996 Ditkoff, describe por primera vez el uso de RNAm para tiroglobulina como marcador tumoral en cáncer de tiroides.

1.4.5. Implicaciones clínicas de la enfermedad residual mínima

Un tumor maligno continuamente está liberando células tumorales. La liberación de células se relaciona con la angiogénesis del tumor, la capacidad de invasión vascular, el tamaño tumoral y la rata de proliferación. **(39)**

La mayoría de células tumorales liberadas entran inicialmente a lechos capilares, llegando a nódulos linfáticos, pulmones e hígado. Las células tumorales aisladas encontradas en los ganglios linfáticos, la sangre o la médula ósea son el resultados de esta continua liberación de células a partir del tumor primario aunque muchas de ellas nunca evolucionarán a enfermedad metastásica macroscópica. Concordante con el concepto de célula tumoral “dormida” o en reposo, se observa baja expresión de marcadores de proliferación en las células tumorales detectadas en la médula ósea. Las metástasis se desarrollarán solamente con la aparición de clones tumorales con características competentes para formar metástasis, sobrevivir y proliferar a distancia del tumor primario. **(39)**

En conclusión, la detección de enfermedad residual mínima está informando sobre una alta posibilidad de desarrollar metástasis a distancia. Su eficacia como marcador de riesgo en tumores como seno, colon, recto, esófago, estómago y melanoma ya ha sido comprobada por estudios clínicos. Sin embargo, el impacto en el pronóstico de otros cánceres como ovario, cervix, tumor de células germinales y tiroides, debe ser evaluado en futuros estudios clínicos **(32, 34, 36, 37)**.

2. OBJETIVOS

2.1.General

Evaluar la efectividad del RNAm de tiroglobulina en sangre como marcador tumoral.

2.2.Específicos

Analizar la sensibilidad y la especificidad de la prueba.
Evaluar comparativamente los resultados obtenidos frente a la tiroglobulina, el marcador tumoral usado en la actualidad.

3. SUJETOS Y METODOS

En el anexo 1 se detallan las características de los pacientes y los resultados bioquímicos y moleculares.

3.1. Sujetos:

Grupo de estudio: 158 pacientes:

Se incluyeron en el estudio todos los pacientes en seguimiento por cáncer bien diferenciado de tiroides de origen folicular, que asistieron a la consulta de seguimiento al servicio de endocrinología del Instituto Nacional de Cancerología, durante el periodo de estudio. Todos los pacientes habían sido sometidos a tiroidectomía total o casi total con un seguimiento promedio a partir del tratamiento inicial de 6 años, con un valor máximo de 30 años y un valor mínimo de 3 meses.

El promedio de edad fue de 43 años, con un máximo de 86 años y un mínimo de 11 años de edad. La relación hombre: mujer fue de 1: 5. El 94% de los pacientes fue clasificado como carcinoma papilar y el 6% restante como carcinoma folicular. En un 18% de los pacientes se reportó por patología tiroiditis de Hashimoto concomitante con el tumor. 59% de los pacientes fueron clasificados como estadio I, 17% estadio II, 20% estadio III y 4% estadio IV. 76% de los pacientes habían recibido yodo en dosis de 30 a 150 milicurios, como parte del tratamiento inicial o por posterior recaída.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica del INC y se obtuvo consentimiento verbal informado de cada paciente. La investigación de laboratorio fue ciega para el estado clínico de los pacientes.

Grupo Control: 23 sujetos:

Cinco de ellos atireosicos (por patología diferente a cáncer tiroideo de origen folicular) y 18 sujetos normales. Una muestra de tejido tiroideo normal fue usado como control positivo en el análisis de PCR.

3.2.1. Evaluación Bioquímica

Se obtuvieron muestras simultaneas de sangre para determinación sérica de TSH (Inmulite, medición por inmunoquimio luminiscencia de tercera generación, DPC, Los Angeles CA), con sensibilidad de 0,002 microIU/ml, tiroglobulina sérica (Inmulite inmunoquimio luminiscencia, DPC, Los Angeles CA) con una sensibilidad de 0,2 ng/ml. Todas las muestras fueron estudiadas para evaluar la presencia de anticuerpos antitiroglobulina (inmunoquimio luminiscencia, DPC, Los Angeles CA) con una sensibilidad de 10 IU/ml y valores esperados en sujetos normales eutiroideos de hasta 40 IU/ml.

3.2.2. Evaluación Molecular

a. Toma de muestras y aislamiento de mononucleares.

Se recolectó en tubos heparinizados, 15 ml de sangre periférica de cada uno de los individuos seleccionados. Se separó la capa de mononucleares mediante un gradiente de densidad de Ficoll Hypaque y se almacenaron a -20 °C en Trizol LS Reagent (Gibco BRL, New York, USA) hasta la extracción de RNA.

b. Extracción de RNAm.

El aislamiento de RNA se hizo a partir de mononucleares utilizando Trizol Reagent de acuerdo al protocolo establecido por la casa comercial: Se homogenizó la muestra por 15 segundos y por cada 500 ul de Trisol se adicionó 100 ul de cloroformo. La mezcla se homogenizó por 5 segundos y se centrifugó a 4 °C por 12.000rpm durante 15 minutos, con el fin de separar la fase orgánica de la fase acuosa que contiene el RNA. El RNA se recuperó sacando a un nuevo tubo la fase acuosa (superior) y adicionando 300 ul de isopropanol por cada 500 ul de Trizol. Se incubó a -20 °C por 10 minutos y se centrifugó a 4 °C a 12000rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El RNA precipitado se trató con 1 mL etanol al 75%, con el fin de limpiarlo y finalmente el producto se resuspendió en 20 ul de agua.

c. Caracterización de los productos de extracción.

El RNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando 2 ul del producto y 3 ul de buffer de corrida. La presencia e integridad del RNA se visualizó en un transiluminador bajo fluorescencia utilizando bromuro de etidio.

d. Transcripción Reversa y Amplificación por PCR.

10. Transcripción reversa.

Utilizando la transcriptasa reversa "SuperScript TM II" (Gibco BRL, New York, USA) se sintetizó el cDNA a partir del RNA aislado.

La reacción de la síntesis de cDNA se efectuó en un volúmen final de 20 ul que contenía aproximadamente 1 ugm de RNA, 4 ul de buffer 5X first strand (Tris-HCl 20 mM pH 8.3) 100 ng de random hexámeros, 1 ul de una solución 10 mM de dNTPs, 2 ul de una solución 0.1m de DTT y 200 U de Superscript II. La mezcla fue incubada a una temperatura de 42 °C por 50 minutos, tiempo y temperatura en los que se maximiza la síntesis de cDNA. Posteriormente se incubó a 99 °C por 3 minutos para inactivar la enzima y finalmente se conservó a -20 °C hasta su uso. El cDNA obtenido se evaluó detectando la presencia de un exón del gen RAR (Receptor del ácido retinoico) usando iniciadores específicos mencionados en la Tabla 1.

e. Iniciadores

Los iniciadores utilizados en este trabajo fueron los mismos escogidos por Bicolla y col (45) y son detallados en la tabla 1.

TABLA 1. Secuencias Nucleotidas de los Iniciadores usados para determinar la presencia de :

Detec ción	Cód.	Secuencia	Exón	Ciclos	(pb) **
RAR	R2	5'GCT CTG ACC ACT CTC CAG CA 3'	2	40	190
	R5	5'CCA CTA GTG GTA GCC TGA CT 3'	3		
TIR 1	Tg1	5' GCC TCC ATC TGC TGG TGT C 3'	1	30	529
	Tg2	5' CTC CCT CCG CAG AAC ACT GGG GT 3'	5		
TIR 2	Tg1a	5' TGC CCA GCC CCT TCG TCC CT 3'	2	30	448
	Tg2a	5' CCC ACC CCG TGG AGA AGA CG 3'	5		

** Tamaño producto amplificado en pares de bases.

Los iniciadores están diseñados sobre diferentes exónes para impedir la amplificación del ADN genómico.

f. Amplificación por PCR nested.

Las muestras se amplificaron en un termociclador MJ Research PTC-200, con las siguientes condiciones de PCR:

- Primera Amplificación: La reacción se llevó a cabo en un volúmen final de 27 ul que contenía 2.5 ul de buffer PCR 10X (20mM Tris HCL, 50 mM KCL, pH 8.3), 2.5 mM de MgCL₂, 1ul de una solución 10 mM de dNTPs, 400 nM de cada uno de los iniciadores, 1 U de Taq polimerasa y 5 ul del cDNA sintetizado. Condiciones de PCR: Un paso de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C y 30 ciclos de amplificación conformados por una temperatura de desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, una temperatura de alineamiento específico para los iniciadores de 62 °C por 1 minuto y una temperatura de extensión de 72 °C por 1 minuto. Al finalizar los ciclos se programó uno adicional de extensión de 5 minutos a 72 °C.
- Segunda Amplificación: Se realizó bajo las mismas condiciones de la primera excepto que se utilizaron 5 ul de la primera reacción.

g. Visualización de los productos de PCR.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, empleando 5 ul del producto amplificado y 2 ul de buffer de carga y observados bajo fluorescencia con bromuro de etidio. La medición de los productos amplificados se hizo con un marcador de 50 pb.

Se presentan las fotografías de las electroforesis obtenidas con la amplificación de:

1. RNA
2. Fragmento del gen del receptor de ácido retinoico
3. Amplificación de PCR en primera ronda para la muestra de tejido tiroideo
4. Ejemplos de amplificación negativa en primera ronda
5. Ejemplos de amplificación positiva en segunda ronda
6. Ejemplos de bandas inespecíficas

4. ANALISIS ESTADISTICCO

Se realizaron análisis para pruebas diagnósticas obteniéndose los valores operativos de sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la tiroglobulina y del RT-PCR de RNAm de tiroglobulina.

Se tomó como patrón oro de comparación la presencia de tumor evidente al exámen físico, a la capatación ectópica de yodo radiactivo o a la visualización de metástasis por imagen.

Se llevaron a cabo cálculos de:

1. Sensibilidad = $VP / VP + FN$
2. Especificidad = $VN / VN + FP$
3. VPP = $VP / VP + FP$
4. VPN = $VN / VN + FN$

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

VP: Verdadero positivo

VN: Verdadero negativo

FP: Falso positivo

FN: Falso negativo

5. RESULTADOS

De los 158 pacientes en seguimiento, 37 presentaban en el momento de la evaluación, evidencia clara de recaída local y/o metástasis a distancia comprobada por estudios histopatológicos, imágenes o rastreos con yodo. Para fines de los análisis estadísticos, este grupo fue comparado con 86 pacientes que no demostraron ninguna evidencia de enfermedad al examen físico con imágenes negativas y niveles de Tg y ATG en límites normales, de acuerdo al protocolo de seguimiento de la institución. Entre los 2 grupos, se evaluaron comparativamente los niveles de tiroglobulina y la amplificación cualitativa, positiva o negativa del PCR para RNAm de Tg, con el fin de evaluar la sensibilidad y especificidad, alcanzadas por cada una de las pruebas.

Dieciocho pacientes presentaron evidencia bioquímica de enfermedad (sin compromiso anatómico demostrable) solo por elevación de tiroglobulina, indicando probable enfermedad residual mínima. Un grupo diferente de 17 pacientes presentaron anticuerpos antitiroglobulina (ATG) elevados invalidando las mediciones de Tg, sin ninguna otra evidencia de enfermedad. Estos 2 últimos grupos se analizaron por aparte.

Tabla 2: Clasificación de pacientes de acuerdo al PCR

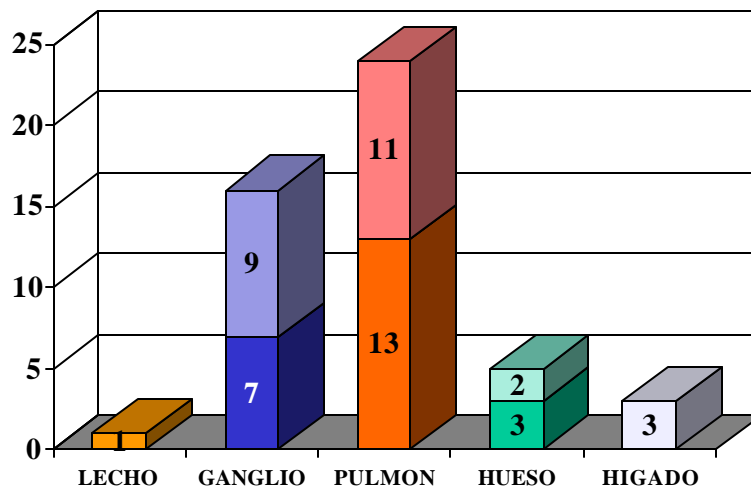
		PCR				TOTAL	
		+	++	+++	-		
Evidencia Clínica	Lecho				1	1	
	Ganglio		1	4	2	7	
	Pulmón	4	2	15	3	24	29/37
	Hueso		2	1	2	5	(78%)
Evidencia Bioquímica	TG	4	3	8	3	18	15/18
	ATG?	3	1	9	4	17	13/17
Libres	Libres	13	18	20	35	86	51/86
	TOTAL	24	27	57	50	158	

Con el fin de optimizar la detección de bajos niveles de RNAm de Tg, se efectuaron 2 rondas de amplificación de 30 ciclos cada una. La amplificación mostró diferentes grados de intensidad desde el punto de vista cualitativo, siendo

graduados como: (-), (+), (++) y (+++) según la intensidad de la banda. Cualquier amplificación que produjese una banda del tamaño esperado para el amplicón de Tg, fue interpretada como positiva, independiente de su intensidad. Se consideró que si se producía transcripción ilícita, esta amplificación estaría probablemente en el grupo de baja intensidad (+).

PCR y localización recaída

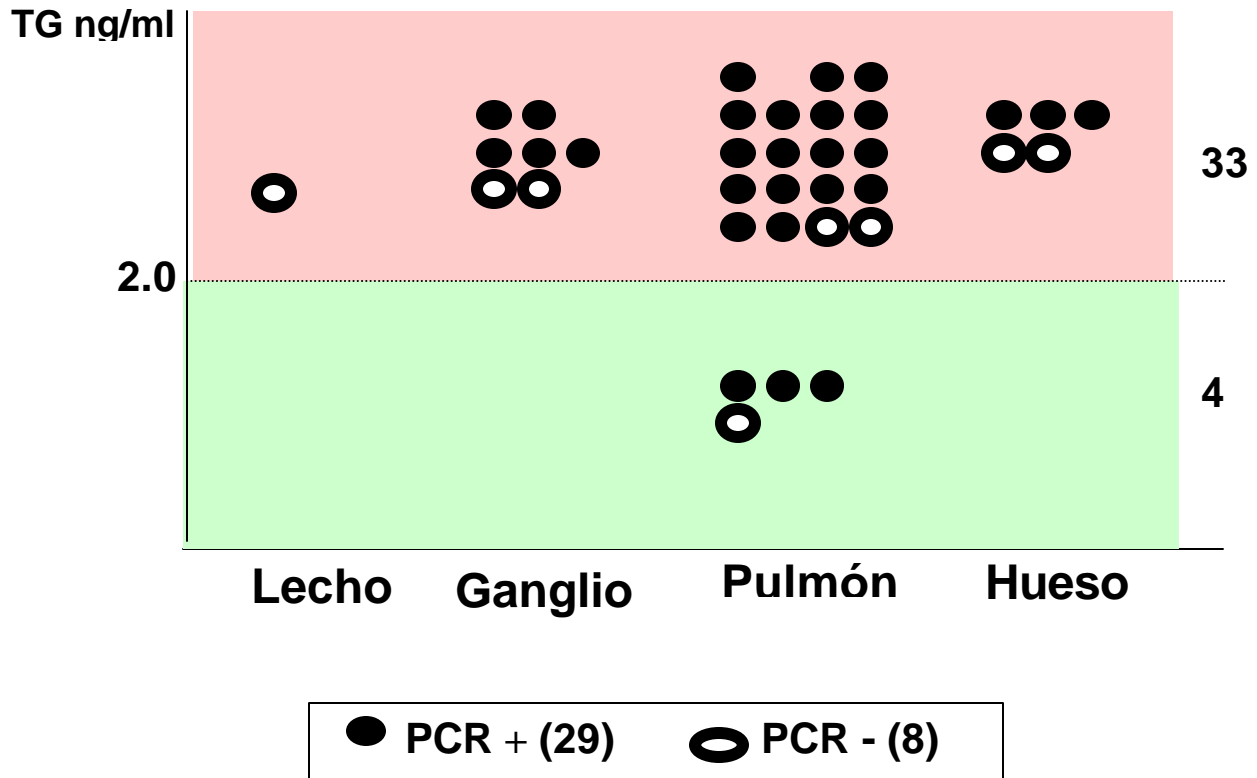
El grupo de 37 pacientes con recaída comprobada se clasificó de acuerdo a la localización de la misma: Ocho de ellos presentaban exclusivamente recaída local (1 en lecho y 7 en ganglios cervicales), y los otros 29 presentaban metástasis a distancia pura, (13 con compromiso pulmonar, y 3 con compromiso óseo) o en combinación con compromiso local ganglionar (**13**).



Gráfica 1: Localización de recaída

En la gráfica, se muestra el compromiso de la recaída en fondo único, cuando solo se afecta el tejido señalado, y en fondo rayado, cuando el compromiso afecta este tejido simultáneamente con otros.

Gráfica 2. Relación TG - PCR en pacientes en recaída



Los niveles de Tg en el grupo de recaídas, y tomando como punto de corte 2 ng/ml, bajo supresión de TSH, fueron positivos en 33 de los 37 casos, y negativos en 4 pacientes con metástasis pulmonares. En este mismo grupo 29 mostraron amplificación de PCR y 8 no la presentaron. Se evidencia así concordancia en 26 casos con los dos marcadores positivos. Un paciente es negativo para los dos marcadores, los 10 casos restantes son positivos para alguno de los dos marcadores.

Al analizar la amplificación por PCR de RNAm de Tg, de acuerdo a la localización de la recaída, se encontró que de los 8 pacientes con recaída local (lecho y ganglio), tres (37%) no mostraron amplificación, correspondiendo uno de los casos a la recaída en lecho. De los 29 pacientes con metástasis a distancia por diseminación hematológica, 24 (83%) mostraron amplificación positiva.

SENSIBILIDAD - ESPECIFICIDAD DE MARCADORES

Tomando como punto de corte 2ng/ml, la tiroglobulina mostró una sensibilidad de 89.2 con una especificidad de 76.6. Haciendose énfasis en que los niveles de tiroglobulina se tomaron bajo supresión de TSH. El valor predictivo negativo fue de 95%.

Tabla 3: Tiroglobulina como prueba diagnóstica

	TG 2.0 y Menos	TG 2.1 y Más		%
LIBRES	92	29	121	Sensibilidad 89.2
RECAIDA	4	33	37	Especificidad 76.6
TOTAL	96	62	158	VPP 53.2
				VPN 95.8

La sensibilidad y especificidad para los PCR para Tg en este grupo de pacientes fueron: 78.4 y 34.7% respectivamente

Tabla 4. PCR- RNAm Tg como prueba diagnóstica

	PCR - RNAm TG		TOTAL		
	Negativa	Positiva			
LIBRES	42	79	121	Sensibilidad 78.4	
RECAIDA	8	29	37	Especificidad 34.7	
TOTAL	50	108	158	VPP 26.9	
				VPN 84.0	

Enfermedad residual mínima

Cuando se tomó la tiroglobulina como marcador de enfermedad residual mínima, en base a los pacientes que no mostraban otra evidencia de enfermedad excepto elevación de TG por encima de 2 ng/ml (18 casos), se encontró amplificación positiva en 15 de ellos.

Tabla 5. Relación Tg y PCR en enfermedad residual mínima

	PCR-RNAm TG		
	Negativo	Positivo	TOTAL
Sin Yodo Previo	1	6	7
Con Yodo Previo	2	9	11
TOTAL	3 (17%)	15 (83%)	18 (100%)

Ante la duda de que dicha tiroglobulina estuviera siendo producida por tejido tiroideo residual, se evaluó el uso previo de yodo en dosis ablativa en estos pacientes, encontrando que entre los 7 pacientes que no habían recibido ablación, 6 (85%) presentaron amplificación positiva, mientras entre los 11 pacientes que habían recibido ablación 9 (81%) presentaron amplificación, sin encontrarse diferencia significativa.

PCR EN PACIENTES ATG POSITIVOS

Tabla 6. PCR en pacientes con ATG positivo

	PCR +	PCR -	TOTAL
En recaída	6 (85%)	1 (15%)	7
Sin evidencia de enfermedad	13 (76%)	4 (21%)	17
TOTAL	19	5	24

Del total de los 153 pacientes en seguimiento, 24 presentaban títulos positivos de anticuerpos antitiroglobulina (16%), 7 con evidencia anatómica de enfermedad y 17 sin ella. En 13 (76%) de estos últimos se encontró amplificación positiva.

MARCADORES TUMORALES SEGÚN TIPO HISTOLOGICO

Se evaluaron los marcadores de acuerdo al tipo de diseminación tumoral esperada para cada subgrupo: linfático para el papilar y hematógeno para el folicular.

Tabla 7. PCR en carcinoma papilar

	PAPILAR		
	TG 2.1 y Más	TG 2.0 y Menos	TOTAL
PCR +	25	2	27 (82%)
PCR -	5	1	6 (18%)
TOTAL	30	3	33

De los 33 casos de carcinoma papilar con evidencia de enfermedad 27 (82%) mostraron amplificación positiva. Los 6 casos que no amplificaron estaban distribuidos en 3 pacientes con metástasis pulmonar, 2 con metástasis ganglionar local y 1 paciente con recaída en lecho.

Tabla 8. PCR en carcinoma folicular

	FOLICULAR		
	TG 2.1 y Más	TG 2.0 y Menos	TOTAL
PCR +	1	1	2 (50%)
PCR -	2	0	2 (50%)
TOTAL	3	1	4

De los 4 casos de carcinoma folicular con enfermedad evidente 2 (50%) mostraron amplificación positiva. Los otros 2 casos que no amplificaron correspondían a metástasis a hueso.

Pacientes libres de enfermedad

De los 86 pacientes considerados libres de enfermedad en el momento de la evaluación, 51 (59%) mostraron amplificación positiva arrojando una especificidad del 34%.

Tabla 9. PCR en pacientes libres de enfermedad

	PCR				TOTAL	
	+	++	+++	-		
Libres	13	18	20	35	86	51/86 (59%)

En la tabla 10 se observa la distribución en cuanto a intensidad de amplificación en los 51 pacientes con prueba positiva.

Bandas inespecíficas

Del total de muestras examinadas correspondientes a pacientes (158), 12 evidenciaron bandas extras, 9 como bandas únicas y 3 acompañadas de la banda esperada. Dentro de las 9 bandas que aparecían como únicas pero que se localizan en lugar diferente a la banda esperada, se encontraron 7 que se ubicaron en forma constante aproximadamente entre 350-400 pb. y que llamamos banda "D"; y 2 se localizaron aproximadamente en 500 pb que llamamos banda "U". Dichas bandas no fueron secuenciadas y los test fueron interpretados como negativos en caso de no evidenciarse la banda esperada en forma concomitante. Dos de los pacientes en recaída comprobada mostraron bandas entre 350 y 400 pb. pero no evidenciaron presencia de la banda de 448 pb y por lo tanto fueron interpretadas como negativos. Dos de las muestras con banda de amplificación en "D" y que no mostraban amplificación de la banda esperada correspondieron a 2 pacientes con evidencia de enfermedad, (1 paciente con metástasis a hueso y 1 paciente con metástasis a ganglio). Las otras bandas de amplificación fueron vistas en pacientes sin evidencia de recaída. (Ver foto 6).

Resultados grupo control

Con el objeto de evaluar la veracidad de la amplificación por PCR de RNAm de TG se tomaron muestras de sangre de 23 sujetos. Cinco correspondían a pacientes a quienes se les había practicado tiroidectomía total por causas diferentes a carcinoma folicular de tiroides (un carcinoma de laringe, tres carcinomas medulares de tiroides y bocio multinodular). Las 18 muestras restantes correspondían a sujetos sanos con tiroides *in situ*. Sólo 1 de los 23 controles presentó amplificación del RNAm de TG.

Tabla 10. Amplificación de PCR en grupo control

	PCR -	PCR +	Total
CONTROLES	17	1	18
ATIREODEOS	5	0	5

Sólo 1 de los 23 controles correspondiente a un sujeto sano presentó amplificación del RNAm de TG. (Ver foto 4).

La tiroglobulina en los 4 de los 5 pacientes atiroideos fue de 0 y en 1 paciente de 1 ng/ml. En los sujetos sanos con tiroides *in situ* la tiroglobulina registró valores dentro de los límites normales, por debajo de 65 ng/ml. El valor más alto fue de 23 ng/ml y correspondió al control número 1, quien fue el único en presentar una amplificación positiva débil en la segunda ronda.

El tejido tiroideo normal usado como control positivo presentó amplificación desde el primer round.

6. DISCUSION

El cáncer de tiroides de origen folicular es una neoplasia bien diferenciada con buen pronóstico y una supervivencia no afectada usualmente por el antecedente tumoral. Sin embargo, la frecuencia de recaídas después de que el paciente ha sido considerado libre de enfermedad es tan alta como un 30%. Estas recaídas ocurren más frecuentemente en los 5 primeros años pero pueden ser tan tardías como dos o tres décadas después. El período de latencia lleva implícita la presencia de enfermedad residual oculta con un mínimo volumen de células tumorales viables, que pueden permanecer en estado "dormido" por muchos años **(60)** y eventualmente reactivar su crecimiento evidenciándose como franca recaída. De esta forma, el factor más importante que predice recaída es la presencia de enfermedad residual.

Ya que en este tumor disponemos de terapias poco mórbidas y altamente efectivas cuando actúan sobre volúmenes tumorales pequeños, se hace indispensable contar con métodos de detección de muy alta sensibilidad que permitan registrar su presencia en forma muy temprana.

Actualmente contamos con la tiroglobulina sérica como marcador tumoral, cuya sensibilidad está condicionada al retiro de la terapia de hormona tiroidea con el objeto de elevar la TSH endógena. Esto lleva a un estado de hipotiroidismo franco, muy mal tolerado por el paciente y por ser un factor mitogénico para la célula tiroidea, aumenta el riesgo de crecimiento tumoral **(8)**. El uso de la TSH recombinante humana, usado en otros países, y que evitaría estos problemas **(12)**, es difícil en nuestro medio por su alto costo y dificultad de consecución. Los cambios conformacionales que puede sufrir la proteína producida en la célula tumoral disminuyen también la sensibilidad del examen e impiden su reconocimiento.

Adicionalmente, hasta un 20% de los pacientes presentan anticuerpos antitiroglobulina circulante originando interferencia con los métodos inmunométricos utilizados en la medición de tiroglobulina y llevando a falsos negativos en el test. **(1, 19)**.

Igualmente, existen factores que alteran la especificidad del exámen, produciendo falsos positivos. En pacientes sin enfermedad, los niveles elevados de tiroglobulina pueden ser debidos a la persistencia de tejido tiroideo residual después de una ablación no exitosa. Ya que la tiroglobulina, es un marcador tisular específico y no un marcador tumoral, su producción procede tanto de las células tumorales como de las células tiroideas normales que hayan quedado en el lecho tiroideo.

Por lo anterior hemos querido evaluar la expresión de la tiroglobulina a nivel de RNAm en sangre mediante una técnica altamente sensible y específica como es el RT-PCR, en búsqueda de células tiroideas circulantes en un grupo de pacientes en seguimiento por cáncer de tiroides bien diferenciado.

De 158 pacientes en seguimiento con cáncer de tiroides bien diferenciado, encontramos 108 con amplificación positiva para RNAm de tiroglobulina, mientras los 50 restantes no mostraron amplificación. En un grupo de 37 pacientes con evidencia clínica de enfermedad comprobada por patología, por imagen o por capatación ectópica de yodo, encontramos amplificación positiva en 29 de ellos (78%). Al analizar comparativamente nuestra sensibilidad con la reportada por otros autores (ver Tabla A), encontramos que los mejores resultados fueron obtenidos por Ringel y Ditzkoff quienes detectaron el 100% de los enfermos utilizando sangre total para el análisis de PCR. Sin embargo los diferentes autores obtienen sensibilidades adecuadas entre el 80 y el 90%, independiente de la capa de células utilizadas para el análisis.

Al analizar en nuestro grupo los 8 pacientes con evidencia de enfermedad y sin amplificación, encontramos que 3 de ellos presentaban recaída local (1 en lecho comprobado por patología y 2 en ganglios regionales) sin presentar metástasis a distancia. Sugerimos como explicación a la no amplificación, la ausencia de células tumorales en circulación sistémica. Esto quiere decir que el RT-PCR sería un buen método para detectar la diseminación hematógica, pero no así la diseminación linfática local.

Los otros 5 pacientes con enfermedad comprobada y sin amplificación tenían enfermedad metastásica a distancia; en 3 de ellos se encontraba localizada en pulmón. Dos de estos 3 pacientes mostraron una banda bien definida por debajo de la esperada, (Ringel informa igualmente la presencia de bandas adicionales en 2 de sus pacientes).

Si esta banda correspondiera a un procesamiento diferencial del RNAm del Tg concluiríamos que solo 1 caso con metástasis pulmonar no fue detectado por el método. Este último caso corresponde a un paciente que tampoco mostró elevación de la tiroglobulina sérica, lo cual sugiere un probable estado de dediferenciación tumoral (paciente 151).

Los otros 2 pacientes que no aplicaron tenían exclusivamente metástasis óseas. La ausencia de positividad en ellos puede ser la consecuencia de una liberación intermitente de las células tumorales, o menos probablemente, de la pérdida de anillaje de los "primer", secundaria a polimorfismo o mutación en la región complementaria como lo sugiere Biscolla (45).

En el análisis de especificidad de la prueba, encontramos que de 86 casos sin evidencia de enfermedad y con niveles séricos de tiroglobulina por debajo de 2 ng/ml, 51 presentaron amplificación positiva para RT-PCR (59%) sugiriendo una baja especificidad. Sin embargo, esta baja especificidad puede ser consecuencia de que estamos evaluando un test de muy alta sensibilidad como es el RT-PCR, contra patrones de baja sensibilidad como son la evidencia anatómica de enfermedad, el rastreo con yodo a dosis bajas y los niveles de tiroglobulina utilizados bajo nuestras condiciones (TSH suprimida), por lo que nosotros preferimos referirnos a estos casos como "positivos no esperados" y no como falsos positivos. Otros autores han encontrado igualmente, un porcentaje elevado de amplificación en su grupo de pacientes considerados libres de enfermedad (ver Tabla A), que varía ampliamente entre los diferentes autores (de 9 a 81%). Cuando analizamos estas diferencias encontramos que la sensibilidad del patrón oro está influyendo en forma importante. Así, Ringel reporta 7 positivos no esperados (20%) en su grupo de 35 pacientes considerados libres de enfermedad pero teniendo como corte de tiroglobulina 1 ng/ml. En forma similar Biscolla, con igual punto de corte encuentra positivos no esperados en 8 de 28 (29%) de sus pacientes libres de enfermedad.

Nosotros encontramos positivos no esperados en 59% de los pacientes, tomando como corte de tiroglobulina 2 ng/ml. Al estar este punto de corte por encima del de otros autores, es probable que un grupo de pacientes considerado por nosotros libre, cayera en el grupo de enfermos para aquellos que consideran el punto de corte en 1ng/ml. Apoyando esta apreciación Tallini, con punto de corte de 5 ng/ml, evidencia el más alto porcentaje de positivos no esperados.

Diferencias significativas también se pueden encontrar al analizar las variantes utilizadas en el PCR. Bojunga encuentra, con un round de amplificación de 30 ciclos, 63 positivos no esperados de 137 pacientes sin evidencia de enfermedad, (46%). Cuando este autor varía el número de ciclos a 40 en un round, los positivos no esperados suben a 111, (81%).

Estas diferencias en la amplificación de acuerdo al número de ciclos han sido atribuidas por muchos autores a la presencia de transcripción ilícita, entendida como la expresión basal no específica en un tejido, de transcritos considerados específicos de otros tejidos. Esta transcripción ilícita o ectópica fue reportada por primera vez en 1989 por Chelly **(51)**, quien demostró que transcritos del gen de la distrofia muscular de Duchenne podían ser detectados no solamente en músculo y cerebro como era esperado, sino también y a muy bajo nivel en fibroblastos, linfoblastos y líneas celulares de hepatoma. Bojunga logra la amplificación de RNAm de tiroglobulina en diferentes muestras de tejido no tiroideo en PCR de 40 ciclos (timo, glándula adrenal, hipófisis, pulmón, testículo); sin embargo no obtiene amplificación en PCR de 30 ciclos. Esta expresión ectópica ha sido confirmada en los linfocitos circulantes **(27)**, donde desempeñaría un papel primordial en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica a las proteínas de expresión tisular restringida (como es el caso de la tiroglobulina). Estos linfocitos serían así una posible fuente de falsos positivos.

Sin embargo, no creemos que este sea el origen de nuestros positivos no esperados, porque si esta fuera la explicación, con nuestro método nested de 2 round y 60 ciclos, habríamos encontrado amplificación significativa en el grupo control que incluía 18 sujetos normales y 5 pacientes con tiroidectomía total por causa diferente a cáncer folicular de tiroides. Solo encontramos una amplificación débil en el segundo round para un sujeto sano.

Ringel y Fugazzola encontraron amplificación del RNAm de tiroglobulina en sangre periférica en sus controles normales y lo atribuyeron a la presencia de células tiroideas circulantes. Como apoyo a su teoría, Ringel logra aislar en sangre de 2 sujetos normales, células tiroideas circulantes mediante "cell sorting", utilizando anticuerpos antirreceptor de TSH y perlas magnéticas. Sin embargo para nosotros esta afirmación es difícil de aceptar por nuestros hallazgos de no amplificación en sujetos normales. Adicionalmente, Matola **(52)** demuestra la inducción de apoptosis en cualquier célula normal de origen epitelial que se desprenda de su matriz extracelular.

Si consideramos en conjunto, la evaluación de la tiroglobulina sérica y del RT-RNA mensajero para Tg en nuestro grupo de 37 pacientes con evidencia de enfermedad, encontramos que 26 fueron positivos para ambos marcadores, 10 registraron positividad para uno de los dos y solo uno fue negativo en las dos evaluaciones, indicando una gran sensibilidad en la combinación de los dos exámenes.

Un problema fundamental en el seguimiento del cáncer de tiroides se presenta en los pacientes con anticuerpos antitiroglobulina circulantes, lo que impide la utilización de tiroglobulina sérica como marcador tumoral por interferencia en el inmunoanálisis. Entre nuestros pacientes en seguimiento, 24 presentaban anticuerpos antitiroglobulina circulantes, 7 de ellos tenían evidencia clara de enfermedad macroscópica. En los 17 restantes la presencia de estos anticuerpos podía ser interpretada como evidencia de enfermedad residual mínima, indicando indirectamente la presencia de la tiroglobulina como antígeno estimulante de su producción. Trece de estos 17 pacientes presentaron amplificación clara (76%), porcentaje significativamente más elevado que en el grupo de pacientes libres de enfermedad. Este resultado puede tomarse como un punto de apoyo de la existencia real de la tiroglobulina como antígeno inductor de estos anticuerpos en oposición a lo sugerido por algunos autores, quienes consideran la presencia de estos anticuerpos como el producto de una memoria inmunológica sostenida **(64, 65)**. Los anticuerpos serían así la respuesta a una tiroglobulina altamente inmunogénica y parcialmente clivada, que expondría epítopes normalmente ocultos y que sería liberada por células foliculares tumorales que permiten su paso a circulación general por la alteración de la pared folicular en las células tumorales.

La mayoría de autores excluyen los pacientes con anticuerpos antitiroglobulina positivos de los análisis finales. Nosotros consideramos que la técnica del RT-PCR es una excelente alternativa para el seguimiento en este grupo de pacientes.

Analizando los resultados según el tipo histológico encontramos que de los 4 con carcinoma folicular en recaída, 2 mostraron amplificación positiva (50%). De los 33 pacientes con carcinoma papilar en recaída, 27 amplificaron (81%). Estos resultados son concordantes con Bellantone, quien encuentra amplificación en los pacientes con carcinoma papilar, pero no en los foliculares. Estos hallazgos son llamativos si se tiene en cuenta que la diseminación del carcinoma folicular se hace por vía hematológica, mientras que el carcinoma papilar se disemina preferiblemente por vía linfática. En base a esto esperaríamos obtener más amplificación positiva en los foliculares que en los papilares.

Una posible explicación a esta incongruencia es que siendo el carcinoma folicular más agresivo se diferencie y disminuya la expresión del gen de tiroglobulina.

7. CONCLUSIONES

1. La detección de células tiroideas circulantes por medio de amplificación de RT-PCR para RNAm de tiroglobulina en pacientes en seguimiento por cáncer de tiroides de origen folicular, brinda una adecuada sensibilidad en pacientes con enfermedad evidente.
2. Nosotros pensamos que la amplificación de RNAm de tiroglobulina en pacientes considerados libres de enfermedad se debe a enfermedad residual mínima y no a transcripción ilícita.
3. Esta prueba podría tener valor clínico en el grupo de pacientes en seguimiento con ATG positivo en quienes la tiroglobulina carece de valor.
4. La diversidad de protocolos usados por diferentes autores en:
 - Técnica: Diseño de iniciadores, número de rondas, número de ciclos de amplificación por ronda, y capa celular seleccionada para obtención del RNA.
 - Punto de corte de la tiroglobulina como patrón de oro de comparación, no permiten una comparación válida de resultados.
5. No hay claridad sobre la presencia o no de células tiroideas circulantes en sujetos sanos, dados los resultados discordantes en los grupos de control.

8. PERSPECTIVAS

1. La sensibilidad y especificidad del RT-PCR del RNAm de tiroglobulina en pacientes con enfermedad residual, sugerida por la positividad de la prueba, deberán ser evaluadas por estudios de seguimiento a largo plazo con el fin de validar los resultados.
2. Esta validación permitiría terapias tempranas de mínima morbilidad para los pacientes afectados.
3. Un estudio prospectivo comparativo de diferentes protocolos en un mismo grupo de pacientes, permitirá definir un protocolo único y adecuado de trabajo.
4. El avance en la investigación de métodos que permitan cuantificar la amplificación del PCR, permitirá discernir entre las eventuales amplificaciones por transcripción ectópica y los verdaderos positivos con mínima amplificación.
5. El PCR cuantitativo sería no solo una herramienta diagnóstica, sino también un método de seguimiento y de valoración del éxito de tratamientos instaurados.
6. Se requiere un estudio en un grupo amplio de sujetos sanos con el objeto de comprobar la existencia o no de células tiroideas circulantes.

BIBLIOGRAFIA

1. Spencer C., "Clinical utility of serum thyroglobulin measurement" *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*. 2002, 9:401-406.
2. Torrens, J., Burch, H., "Assessment of thyroid function and disease" *Endocrinology and Metabolism Clinics* 2001; 30 No. 2
3. Fatourechi, V., Hay, I., "Treating the patient with differentiated thyroid cancer with thyroglobulin-positive iodine-131 diagnostic scan-negative metastases: Including comments on the role of serum thyroglobulin monitoring in tumor surveillance", *Seminars in Nuclear Medicine* 2000; 30 No. 2: 107-114.
4. Sherman, S., "Editorial:Optimizing the outcomes of adjuvant radioiodine therapy in differentiated thyroid carcinoma", *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 87 No.9: 4059-4062.
5. Ringel, M., Balducci-Silano, P., Anderson, J., et al, "Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999, 84 No.11: 4037-4042.
6. Ladenson, W., "Recombinant thyrotropin versus thyroid hormone withdrawal in evaluating patients with thyroid carcinoma", *Seminars in Nuclear Medicine* 2000; 30 No.2: 98-106.
7. Haber, R., "Editorial: The diagnosis of recurrent thyroid cancer- A new approach" *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83 No.12: 4189-4190.
8. Sherman, S., "Seminar: Thyroid Carcinoma" *The University of Texas. M.D. Anderson Cancer Center*. 2002; 1-44.

9. Cobin, R., Gharib, H., Bergman, D., et al, "AACE/AAES Medical/Surgical guidelines for clinical practice: Management of thyroid carcinoma", *Endocrine Practice* 2001; 7 No. 3: 203-220.
10. Kinder, B., "Well differentiated thyroid cancer", Lippincott Williams & Wilkins 2003; 15: 71-77.
11. Wartofsky, L., "Management of low-risk well differentiated thyroid cancer based only on thyroglobulin Measurement after recombinant human thyrotropin", *Thyroid* 2002; 12 No.7: 583-589.
12. Mazzaferri, E., Kloos, R., "Is diagnostic iodine-131 scanning with recombinant human TSH useful in the follow-up of differentiated thyroid cancer after thyroid ablation?" *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87 No. 4: 1490-1498.
13. Vijlder, J.J., Ris-Stalpers, C., Vulsma, T., "On the origin of circulating thyroglobulin" *European Journal of Endocrinology* 1999; 140: 7-8.
14. Dunn, J., "Thyroglobulin: Chemistry, Biosynthesis and Proteolysis" En: *The Thyroid*. Brauerman. Williams and Wilkins. Philadelphia. Eighth Edition. 2000; 91-104.
15. Spencer, C., "Thyroglobulin" En: *The Thyroid*. Brauerman. Williams and Wilkins. Philadelphia. Eighth Edition. 2000; 402 - 413.
16. Pachucki, J., Burmeister, L., "Evaluation and treatment of persistent thyroglobulinemia in patients with well-differentiated thyroid cancer", *European Journal of Endocrinology* 1997; 137: 254-261.
17. Lubin, E., Mechlis-Frish, S., Zatz, S., et al, "Serum thyroglobulin and iodine-131 whole-body scan in the diagnosis and assessment of treatment for metastatic differentiated thyroid carcinoma" *The Journal of Nuclear Medicine*. 1994.;35 No 2: 257- 262.

18. Grigsby, P., Baglan, K., Siegel, B., "Surveillance of patients to detect recurrent thyroid carcinoma", American Cancer Society 1999; 945-951.
19. Spencer C., Wang Ch., "Thyroglobulin measurement, Techniques, Clinical benefits, and Pitfalls", Endocrinology and Metabolism Clinics 1995; 24 No. 4: 841-863.
20. Chung, J.K., Park, T.Y., Kim, Y.S., et al "Clinical significance of elevated level of serum antithyroglobulin antibody in patients with differentiated thyroid cancer after thyroid ablation", Clinical Endocrinology 2002; 57: 215-221.
21. Mariotti, S., Barbesino, P., Caturegli, P., et al, "Assay of thyroglobulin in serum thyroglobulin autoantibodies: An unobtainable Goal?", Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1995; 80 No.2: 468-472.
22. Spencer, C.A., Takeuchi, M., Kazarosyan, C., et al, "Serum thyroglobulin autoantibodies: Prevalence, influence on serum thyroglobulin measurement, and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma", Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1998; 83 No. 4: 1121-1127.
23. Girelli, M.E., De Vido, D., "Serum thyroglobulin measurements in differentiated thyroid cancer" Boimed & Pharmacother 2000; 54: 330-333.
24. Saboori, A.M., Rose, N.R., Bresler, H. S., et al "Iodination of human thyroglobulin (Tg) alters its immunoreactivity. Iodination alters multiple epitopes of human Tg.", Clinical and Experimental Immunology 1998; 113: 297-302.
25. Coutinho, A., Kazatchkine, M., Avrameas, S., "Natural autoantibodies", Current Opinion in Immunology 1995; 7: 812-818.
26. Gilles, J.G., Vanzieleghem, B., Saint-Remy, J.M., "Natural Autoantibodies and Anti-Idiotypes", Seminars in Thrombosis & Hemostasis 2000; 26: 151-155.

27. Pugliese, A., "Peripheral antigen-expressing cells and autoimmunity", *Endocrinology and Metabolism Clinics* 2002; 31, Number 2.
28. Saravanan, P., Dayan, C., "Assessment of thyroid function and disease", *Endocrinology and Metabolism Clinics* 2001; 30 No.2
29. Slifka, M., Ahmed, R., "Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production", *Current Opinion in Immunology* 1998; 10: 252-258.
30. Pantel, K., Von Knebel Doeberitz, M., "Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells", *Cancer Biology* (??). 2000; 12: 95-101.
31. Hermanek, P., Hutter RV., International Union Against Cancer. Classification of Isolated tumor cell and Micrometastasis. *Cancer*. 1999; 86: 2668 - 2673.
32. Kostler, W., Brodowicz, T., Hejna, M., et al, " Detection of minimal residual Disease in patients with cancer: A review of techniques, clinical implications, and emerging therapeutic consequences", *International Society for Preventive Oncology* 2000; 24: 376-403.
33. Bustin, S., Dorudi, S., "Molecular assessment of tumour stage and disease recurrence using PCR-based assays", *Molecular Medicine Today* 1998; 389-395.
34. Zippelius, A., Pantel, K., "RT-PCR Based Detection of occult Disseminated Tumor Cells in Peripheral blood and bone marrow of patients with solid tumors: An Overview", *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000; 906: 110-123.
35. Johnson, Ph., "A framework for the molecular classification of circulating tumor markers", *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001; 945: 8-21.
36. Kell, M.R., Winter, D.C., O'Sullivan, G.C., et al, "Biological behaviour and clinical implications of micrometastases", *British Journal of Surgery* 2000; 87: 1629-1739.

37. Ghossein, R., Carusone, L., Bhattacharya, S., et al, "Review: Polimerase chain Reaction detection of micrometastases and Circulating tumor cells: Application to Melanoma, Prostate, and Thyroid carcinomas", Diagnostic Molecular Pathology 1999; 8: 165-173.
38. Crocker, J., "Demystified (horizontal ellipsis) molecular pathology in oncology", British Medical Journal. 2002; 55: 337-347.
39. Goeminne, J., Guillaume, T., Symann, M., "Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells", Annals of Oncology 2000; 11: 785-792.
40. Tsavellas, G., Patel, H., Allen-Mersh, T.G., "Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer", British Journal of Surgery. 2001; 88: 1307-1320.
41. Mazzaferri, E., Kloos, R., "Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer", The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2001; 86 No.4: 1447-1463.
42. Pacini, F., Agate, L., Elisei, R., et al, "Outcome of differentiated thyroid cancer with detectable serum Tg and negative diagnostic 131I whole-body scan: Comparison of patients treated with high 131I activities versus untreated patients", The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2001; 86 No.9: 4092-4097.
43. Spencer, C., Takeuchi, M., Kazarosyan, M., "Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays" Clinical Chemistry 1996; 42 No.1: 164-173.
44. Ringel, M., Ladenson, P., Levine, M., "Molecular diagnosis of residual and recurrent thyroid cancer by amplification of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood", Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1998, 83 No. 12: 4435- 4442.

45. Biscolla, R.P., Cerutti, J., Maciel R., "Detection of recurrent thyroid cancer by sensitive nested reverse transcription-polymerase chain reaction of thyroglobulin and sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid transcripts in peripheral blood", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000, 85 No.10: 3623-3627.
46. Ditkoff, B.A., Marvin, M., Yemul, Sh., et al, "Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood", *Surgery* 1996, : 959-965
47. Tallini, G., Ghossein, R., Emanuel, J., et al, "Detection of thyroglobulin, thyroid peroxidase, and RET/PTC1 mRNA transcripts in the peripheral blood of patients with thyroid disease", *Journal of Clinical Oncology* 1998, 16 No.13: 11-58-1166.
48. Bellantone, R., Lombardi, C., Bossola, M., et al, "Validity of thyroglobulin mRNA assay in peripheral blood of postoperative thyroid carcinoma patients in predicting tumor recurrences varies according to the histologic type", *American Cancer Society* 2001, 92 No.9: 2273-2278.
49. Bojunga, J., Roddiger, S., Stanisch, M., et al, "Molecular detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease by RT-PCR", *British Journal of Cancer* 2000, 82 No. 10: 1650-1655.
50. Sarkar, G., Sommer, S., "Access to a messenger RNA sequence or its protein product is not limited by tissue or species specificity", *Cell Biology and Molecular Biology*, Mayo Clinic/Foundation 1989; 331-334.
51. Chelly, H., Concordet, J.P., Kaplan, J.C., et al, "Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type", *The National Academy of Sciences* 1989; 86: 2617-2621.
52. Di Matola, T., Mueller, F., Fenzi, G., "Serum withdrawal-induced apoptosis in Thyroid cells is caused by loss of fibronectin-integrin interaction", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000; 85: 1188-1193.

53. Mizejewski, G., "Role of integrins in cancer: Survey of expression patterns", *Society for Experimental Biology & Medicine*. 1999; 222: 124-138.
54. Fugazzola, L., Mihalich, A., Persani, L., et al, "Highly sensitive serum thyroglobulin and circulating thyroglobulin mRNA evaluations in the management of patients with differentiated thyroid cancer in apparent remission", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002, 87 No.7: 3201-3208.
55. Savagner, F., Rodien, P., Rohmer, P., et al, "Analysis of Tg transcripts by real-time RT-PCR in the blood of thyroid cancer patients", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002, 87 No. 2:635-639.
56. Fenton, C., Anderson, J., Patel, A., et al, "Thyroglobulin messenger ribonucleic acid levels in the peripheral blood of children with benign and malignant thyroid disease", *International Pediatric Research* 2001, 46 No.3: 429-434.
57. Takano, T., Miyauchi, A., Hasegawa, Y., et al, "Quantitative measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of patients after total thyroidectomy", *The British Journal of Cancer* 2001, 85: 102-106.
58. Wingo, S., Ringel, M., Anderson, J., et al, "Quantitative reverse transcription-PCR measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of healthy subjects", *Clinical Chemistry* 1997, 43: 443-452.
59. Bustin, S.A., "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays", *Journal of Molecular Endocrinology* 2000, 25: 169-193.
60. Pantel, K., Schlimok, G., Braun, S., et al, "Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells", *Journal of the National Cancer Institute* 1993; 85: 1419-1423.
61. Erregragui, K., Cheilan, F., Defoort, J.P., et al "Autoantibodies to thyroid hormones: the role of thyroglobulin", *Clin Exp Immunology*. 1996; 105: 140-147.

62. Duthoit, Ch., Estienne V., Delom, F., et al, " Production of immunoreactive thyroglobulin C-terminal fragments during thyroid hormone synthesis", The Endocrinology Society 2000; 141: 2518-2525.
63. Tien-wen, T, Shao-ling, L, Kriss, Jo., "Peripheral blood lymphocytes from normal individuals can be induced to secrete immunoglobulin G antibodies against self-antigen thyroglobulin *in vitro*", Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1985; 60: 279-282.
64. Manz, R., Lohning, M., Cassese, G., et al, "Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen", International Immunology 1998; 10 No. 11: 1703- 1711.
65. Slifka, M., Antia, R., Whitmire, K., et al, "Humoral immunity due to long-lived plasma cells", Immunity 1998; 8: 363-372.
66. Schaadt, B., Feldt-Rasmussen, U., Rasmussen, B., et al, "Assessment of the influence of thyroglobulin (Tg) autoantibodies and other interfering factors on the use of serum Tg as tumor marker in differentiated thyroid carcinoma" Thyroid 1995; 5 No.3: 165-170.
67. Haugen, B., Ridgway, E., McLaughlin, B., et al, "Clinical comparison of whole-body radioiodine scan and serum thyroglobulin after stimulation with recombinant human thyrotropin", Thyroid 2002; 12 No.1: 37-43.
68. Schlumberger, M., Ricard, M., Pacini, F., "Clinical use of recombinant human TSH in thyroid cancer patients" European Journal of Endocrinology 2000; 143: 557-563.
69. Filesi, M., Signore, A., Ventroni, G., et al, "Role of initial iodine-131 whole-body scan and serum thyroglobulin in differentiated thyroid carcinoma metastases", The Journal of Nuclear Medicine 1998; 39 No.9: 1542-1545.

70. Bachelot, A., Cailleux A., Klain, E., et al, "Relationship between tumor burden and serum thyroglobulin level in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma", *Thyroid* 2002; 12 No. 8: 707-711.
71. Mazzaferri, E., Robyn, J., "Postsurgical management of differentiated thyroid carcinoma", *Current Concepts in the Management of Thyroid and parathyroid Disorders* 1996; 29 No.4: 637-659.

EVALUACION RT-PCR DE TIROGLOBULINA RESUMEN DE AUTORES

	ENFERMO	LIBRE	CONTROL	FUENTE	PCR	PATRON ORO
DITKOFF	9 / 9 (100%)	7 / 78 (9%)	0 / 7 (0%)	Sangre Total	1 (35)	Evidencia Tg ?
TALLINI	5 / 9 (56%)	5 / 8 (63%)	0 / 11 (0%)	Mononuclear	1 (30)	Yodo/ Evidencia Tg > 5 ng/ml
			11 / 11 (100%)	Mononuclear	1 (40)	
RINGEL	14 / 14 (100%)	7 / 35 (20%)	10 / 10 (100%)	Sangre Total	1 (39)	Yodo/ Evidencia Tg > 1ng/ml
BOJUNGA	9 / 13 (69%)	63 / 137 (46%)	9 / 50 (18%)	Células Nucleadas	1 (30)	Evidencia Tg > 5ng/ml
	11 / 13 (85%)	111 / 137 (81%)	41 / 50 (82%)	Células Nucleadas	1 (40)	
BISCOLLA	5 / 6 (83%)	8 / 28 (29%)	6 / 6 (100%)	Sangre Total	1 (25)	Evidencia Tg > 1ng/ml
					1 (20)	
FUGAZZOLA	19 / 22 (86%)	10 / 16 (63%)	11 / 11 (100%)	Eritrocito Granulocito	1 (39)	Evidencia Tg > 1ng/ml
			0 / 11 (0%)	Mononuclear	1 (39)	
INC	45 / 55 (82%)	51 / 86 (59%)	1 / 23 (4%)	Mononuclear	1 (30)	Evidencia Tg > 2ng/ml
					1 (30)	

* EVIDENCIA: Comprobado por Patología, Imagen o Captación ectópica de yodo.TESIS

** PACIENTES ENFERMOS: Incluye evidencia de enfermedad y tiroglobulina positiva.

BASE DE DATOS

N	GRUPO	PCR	TSH	TG	ATG	AÑOS SEGUIMIENTO	DOSIS YODO PREVIO	EVALUACION	Mtt/MARCA-DOR	RNA	RAR	TIR 1	TIR 2	PATOLOGIA	T	N	M	E	YODO 2	YODO 2 SAPTAC.	IMAGEN EXAMEN
1	C	T192	2.9	23	9		0	C		+++	+++	(-)	+	C	C	C	C		0		
2	C	T122	4.2		0		0	C		++	++	(-)	-	C	C	C	C		0		
3	C	T058	3.8				0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
4	C	T182	1.9	8	0		0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
5	C	T173		13	0		0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
6	C	T181		14	0		0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
7	C	L365	1.15		2		0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
8	C	T180					0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
9	C	T168					0	CT		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
10	C	T120	0.23	2	20		0	C		++	++	(-)	-	C	C	C	C		0		
11	C	T165	5.09	0	0		0	CT		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
12	C	T179					0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
13	C	T189		2	0		0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
14	C	T177		10	0		0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
15	C	T190	1.4	12	85		0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
16	C	L169	23	1	0		0	CT		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
17	C	T183					0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
18	C	T191	1.4	14	0		0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
19	C	T197	1.8	9	6		0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
20	C	T114	9.4	0	69		0	CT		+++	++	(-)	-	C	C	C	C		0		
21	C	T165	0.2	0	1		0	CT		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
22	C	T194	2.9	12	6		0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
23	C	T196	1.4	6	6		0	C		+++	+++	(-)	-	C	C	C	C		0		
24	P	L211	0	300	8.950	06,7	200	E	P	+++	+++	(-)	+++	P	4	0	1	IV	0	NA	N
25	P	T003	0.08	####	2	09,3	200	E	H	+++	+++	(-)	+++	F	3	0	0	II	200	H	H
26	P	L359	1.49	0	156	10,0	141	?	ATG	+++	+++	(-)	+++	P	2	1	0	I	0	NA	P
27	P	L340	0.01	32	5	10,1	200	E	G	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	III	0	NA	L
28	P	T108	0.7	300	69	01,5	145	E	G	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	I	145	G	G
29	P	T070	0.01	4	20	04,2	150	E	TG	+++	+++	(-)	+++	P	3	1	0	I	0	NA	N
30	P	T109	0.09	37	1	06,0	198	E	TG	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	I	220	Neg	N

N	GRUPO	PCR	TSH	TG	ATG	AÑOS SEGUI- MIENTO	DOSIS YODO PREVIO	EVALUA CION	Mtt/ MARCA- DOR	RNA	RAR	TIR 1	TIR 2	PATC LO GIA	T	N	M	E	YODO 2	YODO 2	IMAGEN EXAMEN
31	P	T091	0	10	1	01,0	138	E	P	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	I	138	P	N
32	P	T077	4.7	0	71	11,2	0	?	ATG	+++	+++	(-)	+++	P	2	1	0	I	0	NA	N
33	P	T038	0	213	3	04,7	200	E	P	+++	+++	(-)	+++	P	2	1	0	II	0	NA	P
34	P	T055	0.03	0	271	02,0	0	?	ATG	+++	+++	(-)	+++	P	1	0	0	I	0	NA	N
35	P	L327	0.59	####	31	03,7	200	E	P	+++	+++	(-)	+++	P	3	1	1	II	184	P	P
36	P	T140	0	0	1.927	09,2	0	?	ATG	+++	+++	(-)	+++	P	2	0	0	I	30	L	N
37	P	L355	0.02	48	13	02,3	211	E	P	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	1	IV	211	NA	N
38	P	L348	0.07	11	3	05,1	200	E	G	+++	+++	(-)	+++	P	3	0	0	I	0	NA	N
39	P	L363	0.73	8	3	08,1	0	E	5	+++	+++	(-)	+++	P	2	0	0	I	0	NA	N
40	P	T008	0.01	11	5	02,0	0	E	G	+++	+++	(-)	+++	P	4	0	0	I	0	NA	G
41	P	T039	0.03	7	2	29,9	0	E	P	+	+	(-)	+++	P	3	1	0	I	150	P	N
42	P	L229	0	48	20	04,7	150	E	P	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	I	200	P	N
43	P	T016	0	17	16	03,0	143	E	P	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	II	0	NA	P
44	P	T050	0.05	2	3	16,0	0	L	NA	+++	+++	(-)	+++	P	2	0	0	I	0	NA	N
45	P	T068	0.75	0	1.482	02,2	170	?	ATG	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	I	0	NA	N
46	P	T054	0.1	0	70	08,1	160	?	ATG	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	I	150	Neg	N
47	P	T024	0	0	171	02,4	146	?	ATG	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	III	0	NA	N
48	P	T113	0.01	4	1	15,1	130	E	TG	+++	+	(-)	+++	P	4	1	1	II	0	NA	N
49	P	T130	0	19	29	09,2	0	E	TG	++	++	(-)	+++	P	2	1	0	I	2	L	N
50	P	T080	0.01	12	2	05,5	200	E	P	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	1	III	200	P	N
51	P	L245	0.75	96	11	01,9	144	E	P	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	1	II	0	NA	P
52	P	T052	0.01	45	20	07,8	200	E	P	+++	+++	(-)	+++	P	2	0	0	II	200	P	P
53	P	L262	0.01	4	4	04,5	120	E	P	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	I	0	NA	P
54	P	T073	0.67	0	6	04,2	143	L	NA	+++	+++	(-)	+++	P	4	0	0	I	0	NA	N
55	P	T094	0.23	0	951	02,0	183	?	ATG	++	++	(-)	+++	P	4	0	0	III	0	NA	N
56	P	T090	0.38	0	#####	02,0	150	E	P	++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	I	200	P	P
57	P	T093	0	0	153	02,8	0	?	ATG	++	+++	(-)	+++	CH	2	0	0	II	0	NA	N
58	P	L202	0	0	1.064	10,1	0	E	P	+++	+++	(-)	+++	P	3	1	0	II	200	P	P
59	P	T053	9.6	640	20	11,8	0	E	TG	+++	+++	(-)	+++	P	3	0	0	II	0	NA	N
60	P	T056	0	540	20	12,0	250	E	H	+++	+++	(-)	++	P	3	0	0	I	0	NA	P
61	P	T184	0.1	9	0	04,1	150	E	TG	+++	++	(-)	++	P	2	1	0	I	0	NA	G

N	GRUPO	PCR	TSH	TG	ATG	AÑOS SEGUI- MIENTO	DOSIS YODO PREVIO	EVALUA CION	Mtt/ MARCA- DOR	RNA	RAR	TIR 1	TIR 2	PATC LO GIA	T	N	M	E	YODO 2	YODO 2	IMAGEN EXAMEN
62	P	L347	75	35	1	01,8	130	E	TG	+++	++	(-)	++	P	4	1	0	I	130	L	N
63	P	T1630	0.09	1	188	00,6	150	?	ATG	+++	++	(-)	++	P	4	1	0	III	150	L	N
64	P	T170	0	160	12	06,4	211	E	P	+++	++	(-)	++	P	3	0	0	III	200	P	N
65	P	T0340	0.05	3	2	08,0	189	E	P	+++	++	(-)	++	P	4	1	1	II	150	P	P
66	P	T0020	0.29	224	2	04,2	226	E	P	+++	+	(-)	+	P	4	1	1	IV	0	NA	P
67	P	T139	6.2	1	60	09,2	200	?	ATG	+++	++	(-)	+	P	3	1	0	II	0	NA	N
68	P	L230	43	0	77	02,6	163	?	ATG	+++	++	(-)	+	P	4	1	0	III	0	NA	N
69	P	L313	53	####	152	12,3	200	E	P	+	++	(-)	+	P	4	1	1	II	200	P	N
70	P	T0790	0.01	12	20	05,2	150	E	TG	+++	+	(-)	+	P	4	1	0	III	0	NA	N
71	P	L3050	0.03	4	6	11,3	150	E	TG	+++	++	(-)	-	P	4	1	0	I	0	NA	N
72	P	L324	4.28	435	2	01,5	150	E	P	+++	++	(-)	+	P	1	1	0	I	150	L	P
73	P	L2890	0.02	0	215	06,1	200	?	ATG	+++	++	(-)	+	P	1	0	0	I	0	NA	N
74	P	T100	1	20	5	00,7	0	E	TG	++	++	(-)	+	P	2	0	0	II	4	L	N
75	P	T061	1.6	14	7	02,2	140	E	P	+++	++	(-)	+	P	4	1	1	II	140	P	N
76	P	L231	0	0	869	04,1	150	?	ATG	+++	++	(-)	-	P	4	1	0	I	0	NA	N
77	P	T143	0	0	996	04,1	150	?	ATG	+++	++	(-)	-	P	4	1	0	I	0	NA	N
78	P	T1200	0.02	295	3	02,0	183	E	H	+++	+	(-)	-	F	3	0	1	IV	0	NA	H
79	P	T0790	0.05	####	2	10,9	246	E	H	+++	++	(-)	++	P	4	1	0	I	0	NA	N
80	P	T0000	0.04	18	76	15,8	150	E	G	+++	++	(-)	-	P	4	0	0	III	180	L	N
81	P	L238	0	0	147	04,1	162	?	ATG	++	++	(-)	-	P	2	1	0	II	0	NA	N
82	P	T1390	0.03	3	6	05,5	200	E	P	+++	++	(-)	-	P	4	1	0	I	200	P	P
83	P	L261	75	68	3	02,1	0	E	TG	+++	++	(-)	-	P	4	1	0	I	150	L	N
84	P	L342	75	146	4	03,8	30	E	L	+++	++	(-)	-	P	2	1	0	I	150	L	G
85	P	L198	0	53	20	05,8	140	E	P	+++	++	(-)	-	P	4	1	0	III	0	NA	P
86	P	T119	5	265	20	13,9	200	E	H	+++	++	(-)	-	F	2	0	0	II	0	NA	N
87	P	T1190	0.04	11	20	15,3	174	E	G	+++	++	(-)	-	P	3	0	0	I	200	G	N
88	P	T0670	0.04	0	2	14,7	0	L	NA	++	+	(-)	+++	P	3	1	0	I	0	NA	N
89	P	L281	0	0	4	22,0	0	L	NA	+++	+	(-)	+++	P	2	0	0	I	0	NA	N
90	P	T0800	0.78	3	8	04,8	0	E	TG	+	++	(-)	+++	P	1	0	0	I	0	NA	N
91	P	L334	0	1	27	00,3	120	L	NA	+++	++	(-)	+++	P	3	0	0	I	0	NA	N
92	P	T033	1	3	5	00,6	0	L	NA	+++	++	(-)	+++	P	4	1	0	III	0	NA	N

N	GRUPO	PCR	TSH	TG	ATG	AÑOS SEGUI- MIENTO	DOSIS YODO PREVIO	EVALUA CION	Mtt/ MARCA- DOR	RNA	RAR	TIR 1	TIR 2	PATC LO GIA	T	N	M	E	YODO 2	YODO 2	IMAGEN EXAMEN
93	P	L318	0.6	0	3	10,0	0	L	NA	+++	+++	(-)	+++	P	3	1	0	II	0	NA	N
94	P	T010	0.02	1	4	07,0	200	L	NA	+++	+++	(-)	+++	F	4	0	1	IV	0	NA	N
95	P	L280	23.4	9	4	02,5	0	E	TG	+++	+++	(-)	+++	P	1	0	0	I	0	NA	N
96	P	T010	0.05	0	11	01,9	100	L	NA	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	III	0	NA	N
97	P	L290	0.01	0	4	06,8	30	L	NA	+++	+++	(-)	+++	P	3	0	0	I	0	NA	N
98	P	T042	7.1	0	21	02,1	150	L	NA	+++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	I	0	NA	N
99	P	T020	0.02	1	20	02,2	150	E	P	+++	++	(-)	+++	F	4	0	0	III	200	Neg	N
100	P	L360	0.02	0	2	05,2	30	L	NA	+++	+++	(-)	+++	P	2	0	0	I	0	NA	N
101	P	L290	0	1	2	02,0	163	L	NA	+++	+++	(-)	+++	P	3	1	0	I	163	L	N
102	P	L290	0.04	0	5	14,8	30	L	NA	+++	+++	(-)	+++	P	2	0	0	I	0	NA	N
103	P	T020	0.02	0	6	10,0	0	L	NA	+++	+++	(-)	+++	P	3	0	0	II	0	NA	N
104	P	T060	0.04	0	17	07,6	150	L	NA	++	+++	(-)	+++	P	2	1	0	I	0	NA	N
105	P	L346	75	10	3	01,2	0	L	NA	+++	+++	(+)	+++	P	4	0	0	III	150	L	N
106	P	T080	43	8	4	01,7	150	L	NA	++	+++	(-)	+++	P	4	1	0	I	150	Neg	N
107	P	T070	0.01	2	8	17,1	185	L	NA	+++	+++	(-)	+++	P	3	1	0	I	0	NA	N
108	P	T004	43	2	28	01,2	0	L	NA	+++	+++	(-)	+++	P	3	0	0	II	150	L	N
109	P	L307	0.8	2	2	07,3	0	L	NA	+++	+++	(-)	++	P	4	0	0	II	0	NA	N
110	P	T080	0.02	1	2	01,5	150	L	NA	++	+++	(-)	++	P	4	1	0	I	0	NA	N
111	P	T092	0	2	2	01,8	150	E	TG	+++	+++	(-)	++	P	4	1	0	I	0	NA	N
112	P	T120	0	1	20	02,7	200	L	NA	+++	+	(-)	++	P	4	0	0	III	0	NA	N
113	P	T160	0	0	4	02,5	150	L	NA	+++	+++	(-)	++	P	4	0	0	I	0	NA	N
114	P	T046	75	8	20	02,1	0	L	NA	+++	+++	(-)	++	P	4	0	0	III	150	L	N
115	P	T061	15.7	0	8	01,4	150	L	NA	+++	+++	(-)	++	P	4	0	0	III	0	NA	N
116	P	L336	2.6	0	11	00,8	0	L	NA	+++	+++	(-)	++	P	4	0	0	I	150	Neg	N
117	P	T080	0.1	0	1	01,3	150	L	NA	+++	+++	(-)	++	P	4	1	0	I	0	NA	N
118	P	T010	0.02	0	43	04,7	194	L	NA	+++	+++	(-)	++	P	4	0	0	III	194	L	N
119	P	T060	0.1	0	3	01,8	0	L	NA	+++	+++	(-)	++	P	1	0	0	I	0	NA	N
120	P	T142	0	1	0	02,3	163	L	NA	+++	+++	(-)	++	P	3	1	0	I	0	NA	N
121	P	T064	0	0	4	07,3	0	L	NA	++	+	(-)	++	P	2	0	0	I	0	NA	N
122	P	L341	75	4	21	01,5	0	E	G	+++	+++	(-)	++	P	4	1	0	I	150	G	N
123	P	T120	12.6	1	1	01,5	150	L	NA	++	+++	(-)	++	P	4	1	0	I	0	NA	N

N	GRUPO	PCR	TSH	TG	ATG	AÑOS SEGUI- MIENTO	DOSIS YODO PREVIO	EVALUA CION	Mtt/ MARCA- DOR	RNA	RAR	TIR 1	TIR 2	PATC LO GIA	T	N	M	E	YODO 2 DOSIS	YODO 2 APTAC.	IMAGEN EXAMEN
124	P	T110	0	0	1	07,2	129	L	NA	+++	++	(-)	++	P	4	1	1	II	0	NA	N
125	P	T114	0	0	4	05,1	150	L	NA	+++	+++	(-)	++	P	4	0	0	III	0	NA	N
126	P	T117	0.2	2	20	21,1	0	L	NA	+++	+++	(-)	++	P	3	0	0	I	0	NA	N
127	P	T080	0.86	0	3	02,7	140	L	NA	++	++	(-)	++	P	4	0	0	III	0	NA	N
128	P	T005	0	1	4	02,1	200	L	NA	+++	+++	(-)	++	P	4	1	0	I	0	NA	N
129	P	T102	41	158	2	01,0	200	E	TG	++	+++	(-)	+	P	4	0	0	III	0	NA	N
130	P	T023	3.1	0	20	03,9	30	L	NA	+++	+++	(-)	+	P	4	0	0	III	0	NA	N
131	P	T000	0.01	0	1	04,0	150	L	NA	+++	+	(-)	+	P	2	1	0	II	0	NA	N
132	P	T112	75	11	1	01,4	150	E	TG	+++	++	(-)	+	P	1	0	0	I	0	NA	N
133	P	T090	0.2	0	0	12,3	30	L	NA	+++	+++	(-)	+	P	4	0	0	I	0	NA	N
134	P	T076	1.1	0	3	02,3	150	L	NA	+++	+	(-)	+	P	2	0	0	I	0	NA	N
135	P	L300	0.02	0	3	05,4	30	L	NA	+++	+++	(-)	+	P	1	0	0	I	0	NA	N
136	P	T044	0	1	4	01,2	150	L	NA	+++	++	(-)	+	P	4	0	0	III	150	L	N
137	P	T085	0.1	0	2	02,0	0	L	NA	++	++	(-)	+	P	2	0	0	I	0	NA	N
138	P	T133	0	1	0	13,6	0	L	NA	+++	+++	(-)	+	P	4	0	0	III	0	NA	N
139	P	T095	0.4	0	37	07,2	150	L	NA	+++	+++	(-)	+	P	4	0	0	I	0	NA	N
140	P	T022	0.18	0	20	06,0	210	L	NA	+++	+++	(-)	+	F	3	0	0	I	0	NA	N
141	P	T019	0	0	4	08,0	180	L	NA	+++	+++	(-)	+	P	4	0	0	III	0	NA	N
142	P	T081	0	0	12	04,2	200	L	NA	+++	+++	(-)	+	P	4	1	0	III	0	NA	N
143	P	T120	0.02	0	3	01,8	164	L	NA	++	+++	(-)	-	P	4	0	0	III	0	NA	N
144	P	T107	0.1	0	2	03,4	163	L	NA	+++	+	(-)	-	P	3	0	0	I	0	NA	N
145	P	T049	0.1	3	20	07,1	150	L	NA	+++	+++	(-)	-	P	4	1	0	I	0	NA	N
146	P	L325	2.1	0	20	10,7	50	L	NA	+++	+++	(-)	-	P	4	0	0	I	0	NA	N
147	P	T074	0	1	27	04,1	150	L	NA	++	+	(-)	-	P	4	1	0	I	0	NA	N
148	P	T041	0	0	0	05,5	150	L	NA	+++	+++	(-)	-	P	4	1	0	I	0	NA	N
149	P	T128	17.7	9	20	08,7	0	L	NA	++	+++	(-)	-	P	4	1	0	I	0	NA	N
150	P	T020	0.02	1	20	09,0	129	L	NA	+++	+++	(-)	-	P	2	1	0	I	0	NA	N
151	P	L165	0	1	29	01,5	200	E	P	+++	+++	(-)	-	P	4	1	1	IV	200	P	P
152	P	T140	0.03	0	28	11,6	0	L	NA	+++	+++	(-)	-	P	2	1	0	I	0	NA	N
153	P	T098	0	0	7	05,5	200	L	NA	++	++	(-)	-	P	4	1	0	III	0	NA	N
154	P	T130	24.5	1	0	16,4	30	L	NA	+++	+++	(-)	-	P	2	0	0	I	0	NA	N

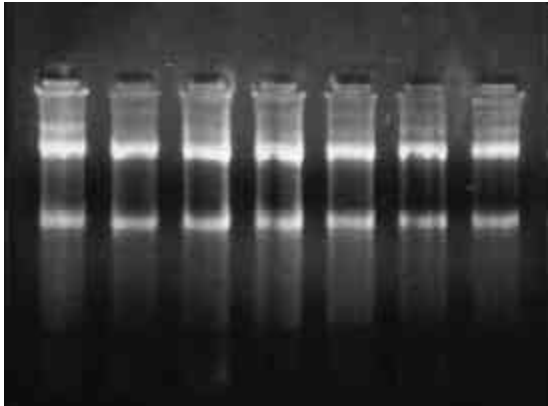
N	GRUPO	PCR	TSH	TG	ATG	AÑOS SEGUI- MIENTO	DOSIS YODO PREVIO	EVALUA CION	Mtt/ MARCA- DOR	RNA	RAR	TIR 1	TIR 2	PATC LO GIA	T	N	M	E	YODO 2	YODO 2	IMAGEN EXAMEN
155	P	L237	0.2	0	44	01,7	150	?	ATG	++	++	(-)	-	P	4	1	0	I	0	NA	N
156	P	T020	0.04	0	3	03,6	30	L	NA	+++	-	(-)	-	F	3	0	0	II	0	NA	N
157	P	T129	0.48	1	1	09,4	0	L	NA	+++	++	(-)	-	P	4	0	0	I	0	NA	N
158	P	L310	0.07	0	3	03,3	150	L	NA	+++	++	(-)	-	P	4	1	0	I	0	NA	N
159	P	T017	12	7	6	13,1	0	L	NA	+++	++	(-)	-	P	3	0	0	I	0	NA	N
160	P	L350	0.04	0	20	04,3	30	L	NA	+++	++	(-)	-	F	4	0	0	III	0	NA	N
161	P	T087	0	0	26	04,7	194	L	NA	+++	++	(-)	-	P	4	0	0	III	0	NA	N
162	P	T045	0.1	0	11	03,2	30	L	NA	+++	++	(-)	-	P	2	1	0	I	0	NA	N
163	P	T037	2.2	3	4	15,2	162	L	NA	+++	++	(-)	-	P	3	1	0	I	0	NA	N
164	P	L326	0.5	1	6	18,8	0	L	NA	+++	++	(-)	-	P	3	1	0	I	0	NA	N
165	P	T047	0.1	1	20	03,6	150	L	NA	+++	++	(-)	-	P	4	0	0	I	0	NA	N
166	P	L260	0	0	39	07,7	150	L	NA	++	++	(-)	-	P	4	1	0	III	0	NA	N
167	P	T031	0	0	1	05,1	30	L	NA	+++	++	(-)	-	P	2	0	0	I	0	NA	N
168	P	T072	8.1	1	7	15,5	30	L	NA	+++	++	(-)	-	P	2	0	0	I	0	NA	N
169	P	T124	0.01	2	0	02,0	100	E	TG	++	++	(-)	-	P	4	1	0	I	0	NA	N
170	P	T062	0.02	0	20	05,3	150	L	NA	+++	++	(-)	-	P	4	0	0	III	0	NA	N
171	P	L345	0.07	0	16	03,0	200	L	NA	+++	++	(-)	-	P	4	0	0	I	0	NA	N
172	P	T078	0.9	0	3	02,1	150	L	NA	+++	++	(-)	-	P	2	0	0	I	0	NA	N
173	P	L270	0.02	0	5	03,7	163	L	NA	+++	++	(-)	-	P	4	1	0	I	0	NA	N
174	P	L273	0.01	0	5	04,0	150	L	NA	+++	+	(-)	-	P	4	0	0	III	0	NA	N
175	P	L315	54.9	1	5	07,1	30	L	NA	+++	++	(-)	-	P	2	1	0	I	0	NA	N
176	P	T106	4.4	0	2	04,2	30	L	NA	+++	++	(-)	-	P	2	0	0	I	0	NA	N
177	P	L339	0.04	0	3	08,7	156	L	NA	+++	++	(-)	-	P	2	0	0	I	0	NA	N
178	P	T120	15	0	20	03,8	150	L	NA	+++	++	(-)	-	P	4	1	0	I	0	NA	N
179	P	T043	75	3	13	01,1	0	L	NA	+++	++	(-)	-	P	4	1	0	I	135	L	N
180	P	T130	0.03	0	9	04,2	150	L	NA	+++	++	(-)	-	P	4	1	0	III	8	Neg	N
181	P	T000	0.59	0	7	08,1	50	L	NA	+++	++	(-)	+	P	3	0	0	I	0	NA	N

GRUPO = Control o Paciente
TG = Tiroglobulina
ATG = Anticuerpos Antitiroglobulina
EVALUACION = Estado Clínico
Mtt = Metástasis
MARCADOR = TG, ATG

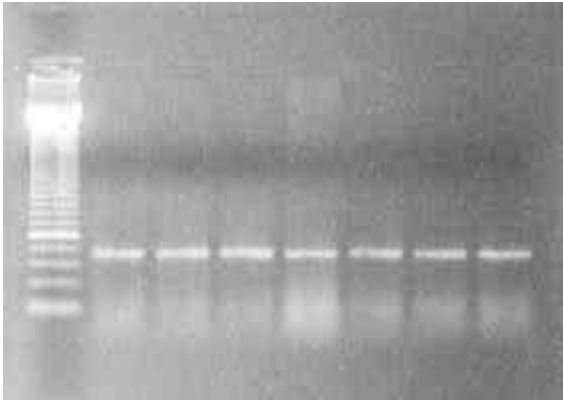
N	GRUPO	PCR	TSH	TG	ATG	AÑOS SEGUIMIENTO	DOSIS YODO PREVIO	EVALUACION	Mtt/MARCA-DOR	RNA	RAR	TIR 1	TIR 2	PATOLOGIA	T	N	M	E	YODO 2	YODO 2	IMAGEN EXAMEN
---	-------	-----	-----	----	-----	------------------	-------------------	------------	---------------	-----	-----	-------	-------	-----------	---	---	---	---	--------	--------	---------------

RAR = Receptor Acido Retinoico
TIR 1 = PCR Primera Amplificación
TIR 2 = pcr Segunda Amplificación (Nested)
U = Banda Extra Arriba
D = Banda extra abajo
PATOLOGIA = Tipo Histológico del Tumor
P = PAPILAR
F = Folicular
T = Tamaño Tumoral en Grados
N = Nódulo (Ganglio) 0= No / 1=Si
M= Metástasis 0 =No / 1 = Si
E = Estadio
IMAGEN/EXAMEN = Sitio de Metástasis
L = Lecho; G = Ganglio; P= Pulmón H = Hueso

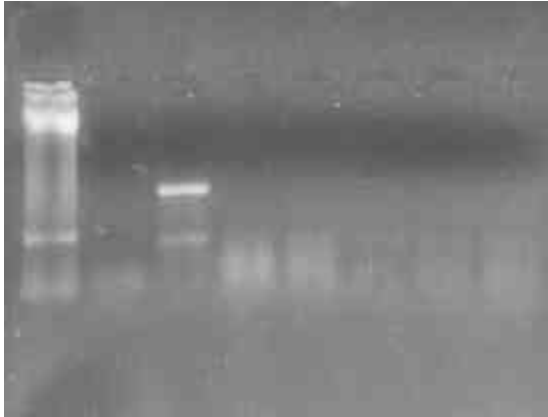
RNA



RAR



TIR1 POSITIVO



TIR 1 NEGATIVO



TIR2



TIR2 BANDAS

