



THE NATIONAL ACADEMY  
OF CLINICAL BIOCHEMISTRY

# Guía de consenso para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tiroidea\*

## Parte III

---

### EDITORES

Liliana M. Bergoglio. Bioquímica. Endocrinóloga.

Jorge H. Mestman. Médico. Endocrinólogo.

\* Reproducido con permiso de la National Academy of Clinical Biochemistry, Washington, D.C.

### ÍNDICE

Presentación de la edición en idioma español

Prefacio

Traducción de la edición en idioma inglés

Sección 1. Prólogo e Introducción

Sección 2. Factores pre-analíticos

Sección 3. Ensayos tiroideos para el bioquímico y el médico

A. Tiroxina Total (T4T) y Triyodotironina Total (T3T)

B. Tiroxina Libre (T4L) y Triyodotironina Libre (T3L)

C. Tirotrófina (TSH)

D. Anticuerpos Antitiroideos:

- Anticuerpos anti-Peroxidasa Tiroidea (TPOAb)

- Anticuerpos anti-Tiroglobulina (TgAb)

- Anticuerpos anti-Receptor de TSH (TRAb)

E. Tiroglobulina (Tg)

F. Calcitonina (CT) y Proto-oncogen RET

G. Yodo urinario

H. Punción Aspirativa con Aguja Fina (PAAF) y Citología Tiroidea

I. Screening de Hipotiroidismo Congénito

Sección 4. Importancia del contacto entre el Laboratorio y los Médicos

Apéndices y Glosario

Referencia

### Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

#### D. AUTOANTICUERPOS ANTITIROIDEOS (TPOAB, TGAB Y TRAB)

La enfermedad tiroidea autoinmune (AITD) causa daño celular y altera la función tiroidea por mecanismos humorales y celulares. Se produce daño celular cuando los linfocitos-T sensibilizados o los autoanticuerpos se fijan a las membranas celulares tiroideas provocando lisis celular y reacciones inflamatorias. Las alteraciones en la función tiroidea se producen por acción de los autoanticuerpos estimulantes o bloqueantes sobre los receptores de membrana de las células. Tres autoantígenos principales participan en la AITD: Tiroperoxidasa (TPO), Tiroglobulina (Tg) y Receptor de TSH. También se han descrito otros autoantígenos, como el co-transportador Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>(NIS), pero todavía no tienen un rol diagnóstico en la enfermedad tiroidea autoinmune (248). Los anticuerpos anti-receptor de TSH (TRAb) son heterogéneos y pueden simular la acción de TSH y causar hipertiroidismo, como se observa en la enfermedad de Graves, o pueden antagonizar la acción de TSH y causar hipotiroidismo. Esta segunda posibilidad se produce en el neonato como resultado del pasaje trasplacentario de los anticuerpos de la madre con AITD. Los anticuerpos anti TPO (TPOAb) parecen participar en los procesos tisulares destructivos asociados con el hipotiroidismo que se observan en la tiroiditis de Hashimoto y en la tiroiditis atrófica. La aparición de TPOAb generalmente precede al desarrollo de disfunción tiroidea. Algunos estudios sugieren que los TPOAb pueden ser citotóxicos para la tiroides (249) (250). El rol patológico de los TgAb no está aún del todo claro. En áreas suficientes de yodo, los TgAb se determinan principalmente como ensayo adjunto a la determinación de Tg sérica, porque la presencia de estos anticuerpos puede interferir con los métodos de Tg [Sección-3 E6]. En áreas deficientes de yodo, las determinaciones de TgAb pueden resultar útiles para la detección de enfermedad tiroidea autoinmune en pacientes con bocio nodular y para el control del tratamiento con yodo en el bocio endémico.

Los métodos de laboratorio que determinan los procesos autoinmunes mediados por células no están disponibles por el momento. Sin embargo, en la mayoría de los laboratorios clínicos se dispone de ensayos para evaluar la respuesta humoral, por ejemplo los anticuerpos antitiroideos. Lamentablemente, el uso diagnóstico y pronóstico de las determinaciones de anticuerpos antitiroideos está afectado por los problemas técnicos que se discutirán. Si bien los ensayos de autoanticuerpos tienen utilidad clínica en una serie de patologías, se los debe emplear selectivamente.

##### 1. Significado clínico de los autoanticuerpos antitiroideos

Los TPOAb y/o TgAb están presentes frecuentemente en el suero de pacientes con AITD (251). Sin

embargo, a veces los pacientes con AITD tienen anticuerpos negativos. Los TRAb están presentes en la mayoría de los pacientes con enfermedad de Graves pasada o presente. Durante el embarazo, la presencia de TRAb es un factor de riesgo de disfunción tiroidea fetal o neonatal a causa del pasaje trasplacentario de los mismos (252) (253). La prevalencia de autoanticuerpos tiroideos aumenta cuando los pacientes tienen enfermedades autoinmunes no tiroideas, como diabetes tipo 1 y anemia perniciosa (254). El envejecimiento también se asocia con la aparición de anticuerpos antitiroideos y con un aumento en la prevalencia de AITD (255). El significado de los valores bajos de anticuerpos antitiroideos en individuos clínicamente eutiroideos no se conoce (256). Sin embargo, estudios longitudinales sugieren que los TPOAb pueden ser un factor de riesgo de futura disfunción tiroidea incluyendo tiroiditis post parto (TPP) y complicaciones autoinmunes después del tratamiento con algunos agentes terapéuticos (50) (257) (258). Estos incluyen amiodarona para las cardiopatías, interferón-alfa para la hepatitis C crónica, y litio para los trastornos psiquiátricos (75) (259-262). Generalmente no se recomienda el uso de los anticuerpos antitiroideos para el control del tratamiento de la AITD (263), ya que éste se dirige a la consecuencia (disfunción tiroidea) y no a la causa (autoinmunidad) de la enfermedad. Sin embargo, en las concentraciones de los autoanticuerpos reflejan con frecuencia una modificación en la actividad de la enfermedad.

##### 2. Nomenclatura de los ensayos de anticuerpos antitiroideos

La nomenclatura utilizada para los autoanticuerpos antitiroideos ha sido muy variada, en particular en el caso de los anticuerpos anti-receptor de TSH (LATS, TSI, TBII, TSH-R y TRAb). Los términos incluidos en esta monografía, TgAb, TPOAb y TRAb son los recomendados internacionalmente. Estos términos corresponden a las entidades moleculares (inmunoglobulinas) que reaccionan con los autoantígenos específicos reconocidos por la prueba de laboratorio. Las diferencias entre métodos pueden sesgar la medición de estas entidades moleculares; por ejemplo: los métodos pueden detectar sólo IgG o IgG más IgM; TPOAb o anticuerpos dirigidos contra TPO y otros autoantígenos de membrana; TRAb inhibidores de la unión de TSH y/o estimulantes del receptor de TSH.

##### 3. Especificidad de los ensayos de anticuerpos antitiroideos

Ciertos problemas específicos han obstaculizado el uso de los ensayos para anticuerpos antitiroideos. Los estudios muestran que los resultados varían amplia-

mente dependiendo del método utilizado. Esto se debe a diferencias tanto en la sensibilidad como en la especificidad, y a la ausencia de una estandarización adecuada. En los últimos años, los estudios a nivel molecular han demostrado que los autoanticuerpos reaccionan con sus autoantígenos blanco, uniéndose a dominios o epitopes “conformacionales”. El término “conformacional” se refiere al requisito de una estructura tridimensional específica para cada epitope reconocido por los autoanticuerpos. En consecuencia, los resultados de los ensayos dependen fundamentalmente de la estructura molecular del antígeno utilizado en el mismo. Los pequeños cambios en la estructura de un determinado epitope pueden resultar en una disminución o pérdida de reconocimiento del autoantígeno por parte del anticuerpo dirigido hacia ese epitope. Últimamente, se ha demostrado la especificidad doble de los anticuerpos TGPO, que reconocen tanto Tg como TPO en el suero de pacientes con AITD (264).

---

**Recomendación N° 29. Diferencias de sensibilidad y especificidad entre métodos para determinación de anticuerpos antitiroideos**

- Conocer que los resultados de los anticuerpos anti tiroideos son dependientes del método.
  - Los anticuerpos antitiroideos presentes en suero son heterogéneos (reconocen diferentes epitopes antigénicos), y diferentes métodos reconocen diferentes poblaciones de anticuerpos.
  - Las diferencias entre ensayos de anticuerpos antitiroideos reflejan diferentes preparaciones de receptores (ensayos de radiorreceptor) o de células (bioensayos) usadas en el ensayo.
  - Las diferencias entre ensayos pueden ser el resultado de contaminación del reactivo que contiene el antígeno con otros autoantígenos.
  - Las diferencias entre ensayos pueden provenir del diseño del ensayo (por ejemplo, inmunoensayo competitivo *versus* no-competitivo) así como de la señal utilizada.
  - Las diferencias entre ensayos pueden ser el resultado del uso de diferentes estándares secundarios.
- 

Se conoce desde hace mucho tiempo que los autoanticuerpos están dirigidos contra unos pocos epitopes en comparación con los anticuerpos heterólogos. Los métodos actuales presentan amplias diferencias en cuanto al reconocimiento de epitopes. Específicamente, que pueden provenir de un reconocimiento erróneo de un epitope que introduce un sesgo en la población de autoanticuerpos analizada. Esto genera intervalos de referencia muy diferentes, incluso cuando los métodos están estandarizados contra la misma preparación de referencia internacional. Cualquiera sea el autoantígeno, los anticuerpos antitiroideos claramente no son entidades moleculares únicas sino

más bien mezclas de inmunoglobulinas que solamente tienen en común su capacidad de interactuar con Tg, TPO o el receptor de TSH.

Las diferencias en la sensibilidad de los métodos para autoanticuerpos pueden derivar del diseño del ensayo (por ejemplo RIA (competitivo) *versus* IMA de dos sitios (no competitivo), como del tipo de señal (por ejemplo radioisotópica *versus* quimioluminiscente). Las diferencias en especificidad pueden ocurrir como resultado de la contaminación de la preparación del autoantígeno con otros autoantígenos (por ejemplo, microsomas tiroideos *versus* TPO purificada). Además, el error en el reconocimiento de un epitope puede llevar a la subestimación de la cantidad total de autoanticuerpos circulantes presentes, y a una disminución en la sensibilidad.

---

**Recomendación N° 30. Sensibilidad funcional de los ensayos de anticuerpos antitiroideos**

*La sensibilidad funcional de los ensayos de autoanticuerpos antitiroideos debería:*

- Determinarse con mezclas de suero humano que contengan una concentración baja de autoanticuerpos.
  - Determinarse utilizando el mismo protocolo descrito para TSH (Recomendación N° 20) pero analizando la precisión entre ensayos durante un lapso entre 6 a 12 meses que represente una adecuada frecuencia clínica de evaluación.
- 

La sensibilidad funcional se debería determinar con mezclas de suero humano que contengan una concentración baja de autoanticuerpos. El protocolo para la sensibilidad funcional debería ser el mismo que se describió para TSH (Recomendación N° 20). La precisión inter-ensayo de los ensayos de TgAb utilizados para el seguimiento de los pacientes con CDT y TgAb positivos se debería evaluar durante un lapso más prolongado (entre 6 y 12 meses) acorde con la frecuencia con que se los solicita para el control seriado en la práctica clínica.

*4. Estandarización de los ensayos de anticuerpos antitiroideos*

La estandarización de los ensayos de anticuerpos antitiroideos no ha alcanzado todavía un nivel óptimo. Se dispone de las Preparaciones Internacionales de Referencia MRC 65/93 para TgAb, y MRC 66/387 para TPOAb) del National Council for Biological Standards and Control en Londres, Reino Unido ([www.mrc.ac.uk](http://www.mrc.ac.uk)). Estos Estándares de Referencia se prepararon y se liofilizaron a partir de una mezcla de suero de pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune ¡hace 40 años!

---

**Recomendación N° 31. Para la estandarización de los Ensayos de Anticuerpos Antitiroideos por los fabricantes.**

- Los ensayos se deberían estandarizar contra las Preparaciones Internacionales de Referencia MRC.
  - MRC 65/93 para TgAb, MRC 66/387 para TPOAb y MRC 90/672 para TRAb
  - Se deberían elaborar nuevas Preparaciones Internacionales de Referencia para TgAb y TPOAb.
  - Los estándares secundarios se deberían caracterizar completamente para evitar el desvío entre diferentes métodos.
  - Cuando fuera posible se deberían utilizar preparaciones de referencia o preparaciones con antígeno recombinante.
- 

Se sabe que los anticuerpos liofilizados tienden a degradarse con el tiempo. Esta degradación puede introducir un sesgo en la capacidad de unión de estas preparaciones de referencia hacia anticuerpos más estables, de importancia clínica desconocida. Debido a la escasez de estas preparaciones, sólo se las utiliza como estándares primarios para calibrar los métodos de ensayo. Los equipos comerciales contienen estándares secundarios que difieren para cada método. Con las calibraciones actuales, los ensayos varían según las condiciones experimentales y la preparación antigénica usada por el fabricante. Esto puede introducir un sesgo adicional en la detección de anticuerpos heterogéneos presentes en las muestras de pacientes. En el caso de los TRAb, la preparación de referencia MRC 90/672 es más reciente (1990) pero actualmente es usada por unos pocos fabricantes.

#### 5. Determinaciones de TPOAb

La Peroxidasa tiroidea (TPO), de 110 kD es una hemoglobuloproteína unida a membrana, con un gran dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular corto. La TPO participa de la síntesis de hormonas tiroideas en el polo apical de la célula folicular. Se han descrito varias isoformas relacionadas con empalmes alternativos del mRNA de TPO. Las moléculas de TPO también pueden diferir en su estructura tridimensional, grado de glucosilación y unión a grupos hemo. La mayoría de las moléculas de TPO no alcanzan la membrana apical y son degradadas intracelularmente.

Los anticuerpos anti TPO se describieron inicialmente como autoanticuerpos anti-microsomales (AMA) ya que se encontró que reaccionaban con preparaciones crudas de membranas de células tiroideas. Más tarde, el antígeno microsomal se identificó como TPO (265). Los antiguos métodos inmunofluorescentes para AMA así como los métodos de aglutinación pasiva con glóbulos rojos tanados, o micropartículas de gel sensibilizadas, todavía se utilizan en la actuali-

dad, además de los nuevos inmunoensayos de TPOAb, más sensibles, tanto competitivos como no competitivos. Estos nuevos inmunoensayos para TPOAb han venido reemplazando en gran medida a los antiguos métodos de aglutinación para AMA porque son cuantitativos, más sensibles y se los puede automatizar con facilidad. Sin embargo, su variabilidad en cuanto a sensibilidad y especificidad es muy amplia. Parte de esta variabilidad proviene de las diferencias en las preparaciones de TPO utilizadas en los diversos equipos de reactivos. Cuando se extrae la TPO de tejido tiroideo humano, se puede usar como preparación de membrana cruda o puede ser purificada por diferentes métodos. La especificidad de los ensayos también puede diferir debido a la contaminación con otros antígenos tiroideos, en especial Tg y/o por variaciones en la estructura tridimensional de la TPO. El uso de TPO humana recombinante (rhTPO), elimina el riesgo de contaminación pero no soluciona el problema de las diferencias en la estructura de la TPO que dependen de la técnica utilizada para aislarla. La mayoría de los ensayos actuales para TPOAb se cuantifican en unidades internacionales usando la preparación de referencia MRC 66/387. Lamentablemente, el uso de este estándar primario no disminuye las variaciones entre métodos, como resulta evidente al observar la amplia variabilidad en los límites de sensibilidad que declaran los diferentes fabricantes de reactivos (rango < 0,3 a < 20 kUI/L), como así también las diferencias en los intervalos de referencia.

---

**Recomendación N° 32: Metodología que se prefiere para TPOAb**

- Los inmunoensayos de TPOAb sensibles y específicos, que utilizan como antígeno preparaciones adecuadas de TPO humana nativa o recombinante altamente purificada deberían reemplazar a los antiguos métodos de aglutinación, insensibles y semicuantitativos, para determinar anticuerpos anti-microsomales (AMA).  
(Nivel de consenso 90%)
  - El significado clínico de las concentraciones bajas de TPOAb requiere más estudio.
- 

#### (a) Prevalencia e intervalos de referencia de los TPOAb

La estimación de la prevalencia de los TPOAb depende de la sensibilidad y especificidad del método utilizado. El reciente estudio NHANES III en EE.UU de ~17,000 individuos sin enfermedad tiroidea aparente, informó niveles detectables de TPOAb en el 12% de los individuos utilizando un inmunoensayo competitivo (18). Aún no está claro si los valores bajos de TPOAb detectados en individuos sanos o en pacientes con enfermedades autoinmunes no tiroideas reflejan

la fisiología normal, preceden a la enfermedad tiroidea autoinmune o son un problema de especificidad del ensayo.

Los valores de referencia para los ensayos de TPOAb son altamente variables y a menudo se establecen arbitrariamente, de modo se obtengan resultados positivos en una amplia mayoría de pacientes con AITD y negativos en la mayoría de individuos sin evidencia clínica de AITD. El límite inferior normal parece estar relacionado con factores técnicos. Específicamente, los ensayos que tienen un límite de detección bajo ( $< 10$  kUI/L) informan valores no detectables de TPOAb en individuos normales estrictamente seleccionados. Estos métodos sugieren que la presencia de TPOAb es un hallazgo patológico. Por el contrario, los ensayos de TPOAb que reportan límites de detección más altos ( $> 10$  kUI/L) citan un "rango normal de referencia". Como estos últimos, no parecen tener una mayor sensibilidad para detectar AITD, estos valores del "rango normal" pueden representar "ruido" inespecífico del ensayo y es posible que no tengan significado patológico.

El estudio de seguimiento de la cohorte de Whickham realizado durante 20 años informó que la presencia de títulos detectables de TPOAb (medidos como AMA) no sólo era un factor de riesgo para hipotiroidismo sino que la detección de AMA precedía el desarrollo de un aumento en la TSH (Figura 5) (35). Esto sugiere que TPOAb detectables constituyen un factor de riesgo para AITD (Recomendación N° 34). Sin embargo, individuos con niveles bajos de TPOAb hubieran tenido AMA no detectables con los métodos más antiguos utilizados en este estudio (35). De hecho, los individuos AMA negativos con valores de TSH  $> 2$  mUI/L tuvieron un aumento en el riesgo a largo plazo de hipotiroidismo, lo que sugiere que niveles bajos de TPOAb pueden ser clínicamente significativos (35). En consecuencia, todavía sigue debatiéndose si los individuos con niveles bajos de TPOAb y/o TgAb deberían considerarse normales hasta que estudios de seguimiento a largo plazo de estos individuos demuestren que no tienen un riesgo incrementado de desarrollar disfunción tiroidea.

Recientes estudios sugieren que un número significativo de individuos con TSH entre 2,6 y 4,0 mUI/mL tienen un perfil hipoecoico al ultrasonido, sugestivo de infiltración linfocítica (Figura 5) (496) (497), por lo cual el examen morfológico de la tiroides por ultrasonido es actualmente el modo más sensible de determinar de manera temprana AITD (496) (497). Sin embargo, el TPOAb es el marcador de riesgo de AITD más fácilmente accesible, aunque la especificidad y sensibilidad de los inmunoensayos actuales sean aún subóptimas para detectar enfermedad temprana en individuos con hipoecogenicidad (497).

### Recomendación N° 33. Intervalos de Referencia para Ensayos de Anticuerpos Antitiroideos

*Los intervalos de referencia para los ensayos de anticuerpos antitiroideos se deberían establecer a partir de 120 individuos "normales" sin antecedentes de enfermedad tiroidea: La selección de los individuos debería minimizar la inclusión de personas con predisposición a enfermedad tiroidea autoinmune. Los individuos normales deberían ser:*

- Varones
- Jóvenes ( $< 30$  años de edad)
- Tener niveles de TSH sérica entre 0,5 y 2,0 mUI/L
- Sin bocio
- Sin antecedentes personales ni familiares de enfermedad tiroidea
- Sin enfermedad autoinmune no tiroidea (por ejemplo: lupus o diabetes)

El criterio empleado para seleccionar sujetos para la cohorte normal utilizada para establecer el rango de referencia para autoanticuerpos es crítico. Dicha cohorte debería estar constituida por varones jóvenes, bioquímicamente eutiroideos (TSH 0,5 a 2,0 mUI/L) sin bocio ni antecedentes familiares de AITD. Este riguroso proceso de selección tendría mínimas probabilidades de incluir individuos con predisposición a enfermedad tiroidea autoinmune.

#### *(b) Usos clínicos de las determinaciones de TPOAb*

La determinación de TPOAb es el método más sensible para la detección de enfermedad tiroidea autoinmune (266). Como se muestra en la figura 5, los TPOAb habitualmente son la primera anomalía bioquímica que aparece en la evolución del desarrollo de hipotiroidismo secundario a la tiroiditis de Hashimoto. De hecho, cuando se determinan los TPOAb mediante un inmunoensayo sensible, más del 95% de los individuos con tiroiditis de Hashimoto tienen valores detectables de TPOAb. Estos métodos también detectan TPOAb en la mayoría de los pacientes con enfermedad de Graves (~85%) (254). Los pacientes con TPOAb detectados a comienzos del embarazo presentan riesgo de desarrollar tiroiditis post parto (50). Los pacientes con síndrome de Down tienen un mayor riesgo de desarrollar disfunción tiroidea debido a enfermedad tiroidea autoinmune y es importante que se sometan a una evaluación anual de TSH y TPOAb (267) (268).

Informes recientes sugieren que puede existir compromiso del coeficiente intelectual en niños nacidos de madres con TSH alta o TPOAb detectables durante el embarazo (63) (65). Este hallazgo ha llevado a la recomendación de que todas las embarazadas se reali-

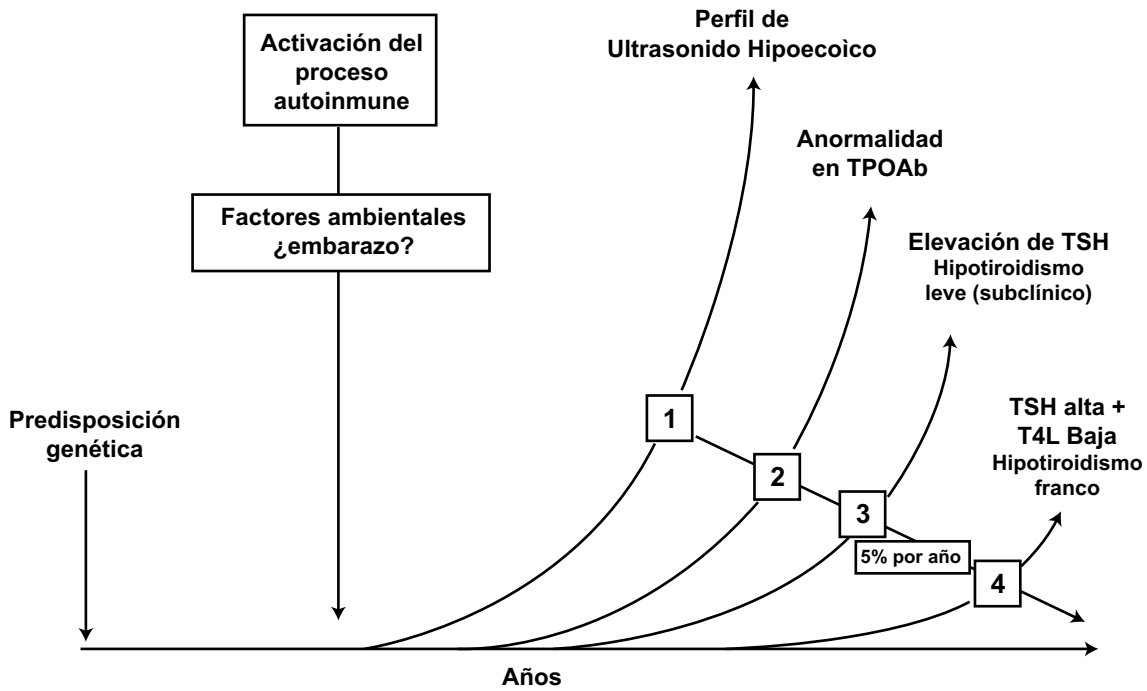


Figura 5. Etapas del desarrollo de la disfunción tiroidea autoinmune.

cen TSH y TPOAb en el primer trimestre. [Sección-2 A3 y Recomendación N° 4]. Además, los TPOAb pueden jugar un rol en la infertilidad, ya que su presencia se ha asociado con el aumento de riesgo de aborto espontáneo y de la dificultad para concebir mediante fertilización (269).

**Recomendación N° 34. Usos Recomendados para las determinaciones de TPOAb**

- Diagnóstico de Enfermedad Tiroidea Autoinmune
- Como Factor de riesgo de Enfermedad Tiroidea Autoinmune
- Como Factor de riesgo de hipotiroidismo durante el tratamiento con Interferón alfa, Interleuquina 2 o Litio
- Como Factor de riesgo de disfunción tiroidea durante el tratamiento con amiodarona (ver Recomendación N° 5)
- Como Factor de riesgo de hipotiroidismo en pacientes con síndrome de Down
- Como Factor de riesgo de aborto espontáneo y fracaso de la fertilización *in vitro*
- Factor de riesgo de disfunción tiroidea durante el embarazo y de tiroiditis post parto

La presencia de TPOAb está sólidamente establecida como factor de riesgo para la disfunción tiroidea cuando los pacientes están en tratamiento con litio, amiodarona, interleuquina 2 o interferón alfa (75) (259) (260) (261) (270). Durante el tratamiento con interferón alfa, una enfermedad tiroidea autoinmune preexistente o TPOAb detectables, son factores predisponentes para el desarrollo de enfermedad tiroidea (262). No obs-

tante, parece no haber aumento en la frecuencia de disfunción tiroidea en el tratamiento con interferón beta (271). La presencia de TPOAb previa al tratamiento presenta una sensibilidad del 20%, una especificidad del 95% y un valor predictivo positivo del 66,6% para el desarrollo de disfunción tiroidea (272).

*6. Determinaciones de anticuerpos anti tiroglobulina (TgAb)*

La tiroglobulina (Tg), globulina protiroidea, es una glucoproteína soluble de alto peso molecular (660 kDA) constituida por dos subunidades idénticas. Está presente con un alto grado de heterogeneidad debido a diferencias en las modificaciones post-translacionales (glucosilación, yodinación, sulfatación, etc.). Durante el proceso de síntesis y liberación de la hormona tiroidea, se produce polimerización y degradación de la Tg. En consecuencia, la estructura inmunológica de la Tg es extremadamente compleja. Las características de las preparaciones de Tg pueden variar ampliamente en función del tejido tiroideo humano inicial y del proceso de purificación utilizado. Esta es la primera clave para explicar el motivo por el cual los ensayos de TgAb, al igual que los de Tg [Sección-3 E2] sean tan difíciles de estandarizar.

*(a) Metodología para TgAb*

Al igual que con los métodos de TPOAb, el diseño de los ensayos de TgAb ha evolucionado desde los en-

sayos por inmunofluorescencia de secciones de tejido tiroideo, a los métodos de aglutinación pasiva de eritrocitos tanados, y en la actualidad a los inmunoensayos competitivos y no competitivos. Esta evolución técnica ha mejorado tanto la sensibilidad como la especificidad de las determinaciones de TgAb. No obstante, debido a que los métodos más antiguos y los más nuevos todavía se utilizan simultáneamente en los laboratorios clínicos, la sensibilidad y especificidad de los métodos disponibles puede variar considerablemente en función del laboratorio en donde se realicen. Los ensayos están calibrados contra preparaciones purificadas o crudas de TgAb que se obtienen de una mezcla de sueros de pacientes o de preparaciones de inmunoglobulinas de donantes de sangre. Esta diversidad de estándares secundarios a menudo, pero no siempre, se calibra contra el estándar primario (MRC 65/93). Sin embargo, la estandarización con MRC 65/93 no garantiza que los diferentes métodos guarden similitud cuantitativa ni cualitativa. Otras razones para las diferencias entre los métodos pueden estar relacionadas con la heterogeneidad de los TgAb en sí mismos. Esta heterogeneidad es restringida en pacientes con AITD comparada con otras enfermedades tiroideas como el carcinoma diferenciado (CDT) en que aparece como menos restringida (273). Este hecho refleja diferencias en la expresión de los diferentes autoanticuerpos que normalmente pueden estar presentes en niveles muy bajos en individuos sanos (274). La variabilidad inter-método en los TgAb también puede reflejar diferencias cualitativas en la afinidad y en la especificidad de epitopes de estos anticuerpos en suero de pacientes con diferentes patologías tiroideas e inmunológicas subyacentes. Otra razón para las diferencias inter-métodos es que algunos diseños de ensayos son susceptibles a interferencias por altos niveles de antígeno circulante (Tg), como ocurre generalmente en la enfermedad de Graves y en el CDT metastático (275).

**Recomendación N° 35. Para los Fabricantes que desarrollan Métodos para TgAb**

- La especificidad de epitopes de los métodos para TgAb debería ser amplia y no restringida, ya que puede ser más amplia para los pacientes con TgAb positivos con CDT en comparación con los pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune.

*(b) Prevalencia e intervalos de referencia de los TgAb*

Al igual que con los anticuerpos anti TPO, la prevalencia y los valores de corte para la normalidad de los anticuerpos anti tiroglobulina depende de la sensibilidad y especificidad del método de ensayo (276). El es-

tudio NHANES III mostró una prevalencia de TgAb del ~10% para la población en general, determinada con un inmunoensayo competitivo (18). La prevalencia de los TgAb en pacientes con CDT parece ser dos veces mayor que para la población normal (~20 versus 10%, respectivamente) (276). Al igual que con los TPOAb, aún no se ha esclarecido la importancia clínica de los niveles bajos de TgAb, que no serían detectables mediante los antiguos métodos de aglutinación. Se ha sugerido que los niveles bajos pueden representar anticuerpos “naturales” en individuos normales o una respuesta de anticuerpos “rescatadores” frente a la liberación de antígeno posterior a una cirugía tiroidea o al tratamiento con yodo radioactivo. Otra alternativa, es que los niveles bajos representen AITD silenciosa subyacente (256). Diferentes métodos de TgAb informan diferentes líneas de corte de positividad, igual que para TPOAb [Sección 3D5(a)].

Específicamente, algunos métodos informan que individuos normales deberían tener valores por debajo del límite de detección del ensayo, mientras que otros informan un “rango normal”. Cuando se usan las determinaciones de TgAb junto con la Tg sérica, la importancia de los valores bajos de TgAb se relaciona menos con la fisiopatología que con el potencial de interferir con el método de Tg sérica.

**Recomendación N° 36. Determinación de TgAb en patologías no-neoplásicas**

- En áreas suficientes en yodo, en general no es necesario ni costo-efectivo solicitar ambas determinaciones, TPOAb y TgAb, porque los pacientes con TPOAb negativos y TgAb detectables rara vez presentan disfunción tiroidea.
- En las áreas con deficiencia de yodo, las determinaciones de TgAb séricas pueden ser útiles para la detección de enfermedad tiroidea autoinmune cuando los pacientes tienen bocio nodular.
- Para control del tratamiento con yodo en casos de bocio endémico.

*(c) Sensibilidad y precisión de las determinaciones de TgAb*

Las determinaciones cuantitativas de TgAb por un método sensible constituyen un ensayo complementario esencial para la determinación de Tg sérica. Los métodos cualitativos de aglutinación no son lo suficientemente sensibles para detectar concentraciones bajas de TgAb que pueden interferir con las mediciones de Tg sérica (276). Al igual que con los ensayos de TPOAb [Sección-3 D5(a)], la amplia variabilidad en los valores absolutos informados por los diferentes inmunoensayos de TgAb excluye el uso de ensayos realizados con equipos de diferentes fabricantes para el

control seriado de pacientes con CDT. Existen dos clases de inmunoensayos para la determinación de TgAb. Una clase se caracteriza por sus bajos límites de detección (< 10 kUI/L) y un valor normal de referencia no detectable. Estos métodos sugieren que la presencia de TgAb es un hallazgo patológico. La otra clase de ensayos reporta límites de detección más elevados (> 10kUI/L) y citan un “rango normal de referencia” para los TgAb. Estos valores detectables del “rango normal” probablemente representen “ruido” no específico del ensayo provocado por la insensibilidad del mismo o por problemas de especificidad ya que estos valores bajos del “rango normal” no muestran evidencia de interferencia con las determinaciones de Tg sérica [Sección-3 E6].

#### Recomendación N° 37. Determinación de TgAb en el Carcinoma diferenciado de tiroides (CDT)

*La concentración de TgAb debería determinarse en los sueros de TODOS los pacientes antes del análisis de Tg ya que los niveles bajos de TgAb pueden interferir con las determinaciones de Tg sérica produciendo valores ya sea falsamente bajos o no detectables, o falsamente elevados según el método utilizado.*

- Los TgAb se deberían medir en cada muestra sérica enviada al laboratorio para evaluación de Tg.
- Las determinaciones seriadas de TgAb se deberían realizar en todos los pacientes con resultados positivos de TgAb con CDT utilizando un método del mismo fabricante, porque los valores seriados de TgAb tienen significado pronóstico para el control de la respuesta al tratamiento del CDT.
- Se deberían utilizar inmunoensayos y no métodos de aglutinación para determinar TgAb ya que los niveles bajos de TgAb no detectados por aglutinación pueden interferir con las determinaciones de Tg realizadas por la mayoría de los métodos, y las determinaciones seriadas deben ser cuantitativas y no cualitativas.
- Los ensayos de recuperación de Tg sérica no detectan en forma confiable la presencia de TgAb y no se debería recomendar su uso. (Recomendación N° 46).
- Antes de cambiar el método de determinación de TgAb, el laboratorio debería informar al médico solicitante, y los pacientes deberían volver a tener establecidos sus niveles basales con el método nuevo. Valores absolutos obtenidos con diferentes métodos no pueden ser usados para el control seriado de pacientes con CDT y TgAb positivos.

#### (d) Usos clínicos de las determinaciones de TgAb

Todavía se debate sobre la utilidad clínica de las determinaciones de TgAb para evaluar la presencia de autoinmunidad tiroidea. El estudio NHANES III

en EE.UU. informó que el 3% de los individuos sin factores de riesgo de enfermedad tiroidea tenían TgAb detectables sin presencia asociada de TPOAb (18). Debido a que esta cohorte no presentaba un aumento asociado de TSH, las determinaciones de TgAb no parecieran ser ensayos diagnósticos útiles para AITD en áreas suficientes en yodo (256) (279). En áreas con deficiencia de yodo, sin embargo, se cree que la determinación de TgAb es útil para detectar AITD, en especial para pacientes con bocio nodular. Las determinaciones de TgAb también son útiles para el control del tratamiento con yodo para el bocio endémico, ya que las moléculas yodadas de Tg son más inmunogénicas.

Los ensayos de TgAb se solicitan fundamentalmente junto con las determinaciones de Tg sérica. La utilidad clínica de los TgAb en los pacientes con CDT es doble. En primer lugar, la búsqueda de TgAb, por métodos sensibles y específicos en estos pacientes con cáncer es necesaria porque incluso bajas concentraciones de anticuerpos pueden interferir con las mediciones de Tg realizadas por la mayoría de los métodos [ver Sección-3 E6] (275) (276). En segundo lugar, las determinaciones de TgAb en sí pueden servir como marcadores tumorales sustitutos para los pacientes TgAb positivos en los que no se pueda confiar en la determinación de Tg (276). Específicamente, los pacientes TgAb positivos considerados libres de enfermedad típicamente se convierten en TgAb negativos entre 1 y 4 años (276- 278). Por el contrario, los pacientes con enfermedad persistente después del tratamiento mantienen concentraciones detectables de TgAb. De hecho, un aumento en la concentración de TgAb es a menudo el primer indicio de recidiva en esos pacientes (276).

#### 7. Autoanticuerpos anti-receptor de TSH (TRAb)

El receptor de TSH integra la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana unidos a las proteínas G. El gen del receptor de TSH (peso molecular 60 kb) ubicado en el brazo largo del cromosoma 14q31 ha sido clonado y secuenciado (272). Los exones 1 a 9 codifican para el dominio extracelular del receptor (397 aminoácidos) y el exón 10 codifica para la región transmembrana (206 aminoácidos). La activación de las proteínas G por el complejo hormona receptor resulta en la estimulación de la producción de AMPc por la adenilato ciclasa y en el recambio de fosfato de inositol por las fosfolipasas (280). La mutagénesis sitio-dirigida ha demostrado que la estructura tridimensional del receptor es importante para la interacción con la TSH y/o los TRAb. Existen tres tipos generales de TRAb determinados por bioensayos o ensayos de radioreceptor (Tabla VI). Los ensayos de radioreceptor, o ensayos de inmunoglobulinas inhibi-



doras de la unión de TSH (TBII) no miden actividad biológica directamente sino que determinan si la muestra contiene inmunoglobulinas que puedan bloquear la unión de TSH a una preparación *in vitro* del receptor. Los anticuerpos estimulantes de TSH (TSAb) parecen fijarse a la porción N terminal del dominio extracelular y mimetizar las acciones de TSH induciendo la transducción de la señal post receptor y la estimulación celular. En contraste, la región C terminal es más importante para los anticuerpos bloqueantes del receptor de TSH (TBAb o TSBAb) que impiden la estimulación por TSAb o TSH, provocando hipotiroidismo (281). Con respecto a esto, las inmunoglobulinas estimulantes del crecimiento tiroideo (TGI), están menos caracterizadas.

Se ha demostrado que la falta de correlación entre las concentraciones de TRAb y el estado clínico de los pacientes se debe principalmente a la heterogeneidad de los TRAb circulantes. El hecho de que esta heterogeneidad pueda coexistir dentro de un mismo paciente y cambiar con el tiempo, es una de las razones por las que ha sido difícil desarrollar métodos diagnósticos eficientes para los TRAb (282) (283). De hecho, el cuadro clínico de los pacientes con enfermedad de Graves que presentan tanto TSAb como TBAb/TSBAb depende de la concentración relativa y de la afinidad del anticuerpo predominante. El pasaje de TRAb estimulantes a TRAb bloqueantes podría explicar la remisión espontánea de la enfermedad de Graves durante el embarazo al igual que la inducción de hipotiroidismo transitorio por yodo radiactivo (281) (284). Es importante observar que los bioensayos que utilizan preparaciones celulares para medir los efectos biológicos de los TRAb (estimulación o inhibición de la actividad de TSH o del crecimiento celular) pueden detectar cambios funcionales en la heterogeneidad de los TRAb. Por el contrario, el ensayo de radioreceptor, o el de inmunoglobulinas inhibitoras de la unión de TSH (TBII), utilizados por la mayoría de los laboratorios clínicos, simplemente miden la capacidad del suero o de una preparación de IgG de bloquear la unión de TSH al receptor, y no miden la respuesta biológica (Tabla VI). Esta diferencia fundamental en el diseño del ensayo explica por qué los bioensayos y los ensayos de radioreceptor normalmente presentan una correlación débil ( $r = 0,31-0,65$ ) (283) (285).

#### (a) Metodología para TRAb

En 1956 se publicó el primer trabajo referente a la existencia de un estimulador tiroideo diferente de la TSH cuya vida media era más larga (Estimulante tiroideo de acción prolongada o LATS), utilizando un bioensayo *in vivo* (286). El LATS se identificó más tarde como una inmunoglobulina. Al igual que la TSH, los TRAb estimulan tanto el AMPc como las vías del

fosfato de inositol de la célula folicular tiroidea y, en consecuencia, estimulan y bloquean la síntesis de la hormona tiroidea y el crecimiento de la glándula (283). Los tipos de métodos desarrollados para determinar TRAb se clasifican en relación con su actividad funcional, según se muestra en la Tabla VI. Los estudios en ratones y líneas celulares FRTL-5 al igual que en humanos, muestran que una elevada concentración de gonadotropina coriónica humana (hCG) también es un agonista débil de los TRAb y puede estimular el cAMP, el transporte de yodo y el crecimiento celular (56). Las elevaciones marcadas de hCG secundarias a coriocarcinoma pueden en casos raros causar un falso resultado positivo de TRAb. Sin embargo, el aumento de la hCG habitualmente observado en el embarazo normal o en pacientes con mola hidatiforme tratados no es lo suficientemente alto como para provocar un falso resultado positivo.

#### (b) Bioensayos (TSAb, TBAb/TSBAb y TGI)

La mayoría de los ensayos actuales se basan en la activación por el receptor de TSH de la producción del segundo mensajero (AMPc) a partir de una línea celular (FRTL-5/ CHO TSH-R) expuesta a una muestra de suero que contiene los anticuerpos o a una preparación de IgG (287-289). El reciente clonado del receptor de TSH ha beneficiado los bioensayos facilitando el desarrollo de líneas celulares transfectadas del receptor de TSH (290) (291). Aunque estos bioensayos están disponibles en muchos laboratorios comerciales en los Estados Unidos y Asia, están menos disponibles en Europa por las regulaciones que afectan el uso de organismos genéticamente alterados, y no lo están aún en Latinoamérica. Lamentablemente, la correlación entre los resultados de los TRAb y el cuadro clínico es aún deficiente. Por ejemplo, la sensibilidad diagnóstica de los bioensayos para TRAbs en la enfermedad de Graves presenta un rango entre 62,5 y 81% (283). Es posible que los nuevos métodos que emplean moléculas químicas puedan detectar los *locus* de los epitopes de los TRAb y los sitios de unión de la TSH, y en consecuencia mejorar la correlación entre la respuesta del ensayo y el resultado clínico (281) (284) (292-294).

#### (c) Ensayos de radioreceptor (TBII)

Los ensayos de inmunoglobulinas inhibitoras de la unión de TSH al receptor (TBII) se encuentran comercialmente disponibles y se los utiliza en muchos laboratorios. Estos métodos cuantifican la inhibición de la unión de TSH marcada con  $^{125}\text{I}$  a receptores porcinos solubilizados o, más recientemente, a receptores de TSH humana recombinante (295-297). Este tipo de método no distingue entre TRAb estimulantes y bloqueantes. La actividad de TBII es cuantificada a partir

Tabla VI. Métodos para Anticuerpos del Receptor de TSH (TRAb)

Anticuerpo	Función	Método directo
TSAb	Estimula la producción de AMPc, la captación de yoduro, y la síntesis de tiroglobulina	bioensayo celular (FRTL-5/ CHO TSH-R)% de estimulación de síntesis de AMPc inducida por TSH comparada con una mezcla de suero normal
TBAb/ TSBAb	Inhibe la producción de AMPc inducida por TSH, la captación de yoduro y la síntesis de la tiroglobulina	bioensayo celular (igual que anterior) % de inhibición de síntesis de AMPc inducida por TSH comparada con una mezcla de suero normal
TGI	Estimula el crecimiento de la célula tiroidea	células FRTL-5, captación de timidina H3/ ensayo de detención mitótica
TBII	Inhibe la unión de I <sup>125</sup> TSH al receptor	Ensayo de radioreceptor con TSH-R soluble porcino o TSH-R recombinante humano

TSAb: anticuerpos estimulantes del receptor de TSH  
 TBAb/TSBAb: anticuerpos bloqueantes del receptor de TSH  
 TGI: Inmunoglobulinas estimulantes del crecimiento tiroideo  
 TSH-R: receptor de TSH  
 TBII: Inmunoglobulinas inhibidoras de tirotrófina

de un suero TRAb positivo calibrado contra un estándar de referencia sérico. El calibrador más frecuentemente utilizado ha sido el suero de referencia MRC, LATS-B. También se dispone del estándar de la OMS (MRC 90/672). La heterogeneidad de los TRAb en el suero de pacientes y el origen del receptor utilizado (porcino *versus* humano recombinante) son causas probables de la amplia variabilidad observada entre los métodos de TBII, a pesar del uso del mismo estándar (283) (298). Aunque en la actualidad los métodos TBII basados en el receptor de la TSH humana recombinante pueden tener una mayor sensibilidad diagnóstica para la enfermedad de Graves, no parecen ofrecer mayor especificidad ni sensibilidad para predecir la respuesta al tratamiento con medicamentos antitiroideos (297) (299).

- En general, la correlación entre los resultados de los TSAb y los TBII (60-75%) es pobre. Los ensayos TSAb declaran dar resultados positivos entre el 80 y el 100% de los pacientes hipertiroideos por Graves no tratados, mientras los ensayos TBII lo son entre el 70 y el 90%. Ninguno de los dos ensayos tiene una alta especificidad ni sensibilidad para predecir remisión.
- Se sabe que tanto la producción normal de hCG, como la producción anormal en el coriocarcinoma interactúan con el receptor de TSH lo que podría resultar en falsos valores positivos. Esto se podría observar en casos poco frecuentes de coriocarcinoma pero no en embarazos normales o en la mola hidatiforme tratada, en la que el nivel de hCG no es lo suficientemente alto para causar un falso resultado positivo.

#### (d) Intervalos de referencia de los TRAb

A pesar de la adopción de una nueva preparación internacional de referencia MRC 90/672, los valores de TRAb todavía dependen del método, y los intervalos de referencia dependen de la población "normal" seleccionada para determinar el nivel de corte para un resultado positivo. Este corte se define en general como dos desviaciones estándar por encima de la media de los individuos normales.

#### 8. Usos clínicos de las determinaciones de TRAb

El uso clínico de las determinaciones de TRAb para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tiroidea autoinmune sigue siendo controvertido y difiere mucho de un país a otro. El diagnóstico diferencial de hipertiroidismo se puede resolver en la mayoría de

#### Recomendación N° 38. Ensayos para anticuerpos antirreceptor de TSH (TRAb)

*Ensayos de TRAbs en el laboratorio clínico:*

- Ensayos de Radioreceptor o de Inhibición de la unión de TSH (TBII) que no miden actividad estimulante directamente sino que detectan inmunoglobulinas en el suero que bloquean la unión de TSH marcada a una preparación *in vitro* del receptor de TSH. Estos ensayos son los que se utilizan con mayor frecuencia para determinar TRAb en los laboratorios clínicos.
- Bioensayos del receptor de TSH (TSAb) que utilizan células (células FRTL-5, o más recientemente CHO transfectadas con el receptor de TSH humana) para la detección de inmunoglobulinas estimulantes de tiroideas (TSAb) que estimulan la producción de cAMP o la captación de yodo. Estos ensayos no están disponibles de manera rutinaria en todos los países.

los pacientes sin recurrir a los TRAb. De todos modos, la presencia de TRAb puede establecer una diferencia entre la enfermedad de Graves y la tirotoxicosis ficticia y otras manifestaciones de hipertiroidismo como la tiroiditis subaguda o post parto y el bocio nodular tóxico.

También se ha sugerido que las determinaciones de TRAb son útiles para predecir la evolución de la enfermedad de Graves. A menudo se observa una disminución en el nivel de TRAb en pacientes hipertiroides en remisión clínica luego del tratamiento con fármacos antitiroideos (ATD). Después de la suspensión de los mismos el aumento de TRAb correlaciona bastante bien con la recidiva rápida, pero esta situación involucra a muy pocos pacientes. Por el contrario, un número significativo de pacientes con niveles no detectables o bajos de TRAb va a recidivar. Un metanálisis de la relación entre los niveles de TRAb y el riesgo de recidiva ha demostrado que un 25% de pacientes son mal categorizados a partir de los ensayos de TRAb (263). Esto sugiere que después del tratamiento con ATD, se necesita un seguimiento de los pacientes independientemente del valor de los TRAb al momento de la suspensión del fármaco, y para este propósito la determinación de TRAb no resulta costo-efectiva (263).

Hay acuerdo general en que las determinaciones de TRAb pueden ser usadas para predecir disfunción fetal y/o neonatal en embarazadas con antecedentes de AITD (8) (252). Valores altos de TRAb en la madre durante el tercer trimestre de embarazo sugieren riesgo de disfunción tiroidea en el bebé (8) (282). Entre el 2 y el 10% de embarazadas con TRAb muy elevados dan a luz recién nacidos con hipertiroidismo (8). El riesgo de hipertiroidismo neonatal es insignificante luego del tratamiento satisfactorio con antitiroideos, pero puede desarrollarse después del tratamiento con radioyodo si los niveles de TRAb permanecen elevados (8). Las embarazadas eutiroideas (con o sin tratamiento con L-T4) que han recibido tratamiento previo con yodo radioactivo para la enfermedad de Graves deberían realizarse determinaciones de TRAb a comienzos del embarazo, cuando un valor alto es un factor de riesgo significativo para el hipertiroidismo fetal, y también durante el tercer trimestre para evaluar el riesgo de hipertiroidismo neonatal (8). Las embarazadas que reciben ATD para la enfermedad de Graves, deberían realizarse determinación de TRAb en el tercer trimestre. Valores altos TRAb en estas pacientes deberían instar a una evaluación clínica y bioquímica exhaustiva de hipertiroidismo en el neonato, al momento del nacimiento (sangre del cordón) y entre los 4 y 7 días, después que los efectos del pasaje transplacentario de los ATD hayan desaparecido (300). Cabe destacar que los ensayos de radioreceptor TBII frecuentemente se usan con este propósito, ya que detectan tanto anticuerpos estimu-

lantes (TSAb), como en casos poco frecuentes, anticuerpos bloqueantes (TBAb/TSBAb) que provocan hipotiroidismo transitorio en 1:180.000 recién nacidos (301). También se sugiere realizar la determinación de ambos anticuerpos estimulantes y bloqueantes porque la expresión de disfunción tiroidea puede ser diferente en la madre y en el infante (253).

---

#### Recomendación 39. Usos clínicos de las determinaciones de TRAb

- Para investigar la etiología del hipertiroidismo cuando el diagnóstico no es clínicamente evidente.
  - La disminución en la concentración de TRAb durante el tratamiento con drogas antitiroideas a largo plazo sugiere remisión. No obstante, las determinaciones de TRAb pueden dar resultados confusos en el 25% de estos pacientes.
  - Las determinaciones de TRAb son útiles para diagnosticar enfermedad de Graves y para relacionar los valores de TRAb con un algoritmo de tratamiento.
  - Para evaluar pacientes con sospecha de "oftalmopatía eutiroidea de Graves". No obstante, no se debe descartar la patología en caso de TRAb no detectables.
  - Aunque los ensayos de TSAb presentan ventajas teóricas, algunos sostienen que los TBII que detectan tanto anticuerpos estimulantes (TSAb) como los casos poco frecuentes de anticuerpos bloqueantes (TBAb/TSBAb), son igualmente útiles.
  - Para mujeres embarazadas con antecedentes o enfermedad de Graves actual. Nota: Las embarazadas eutiroideas después de la administración de drogas antitiroideas (ATD) para la enfermedad de Graves tienen un riesgo insignificante de hipertiroidismo fetal o neonatal.
  - Los TRAb en las embarazadas eutiroideas (con o sin tratamiento con L-T4) que han recibido tratamiento previo con yodo radioactivo para la enfermedad de Graves se deberían determinar a comienzos del embarazo, cuando un aumento en el valor es un factor de riesgo para el hipertiroidismo fetal (2-10%) y durante el tercer trimestre para evaluar riesgo de hipertiroidismo neonatal.
  - Se debería realizar una determinación de TRAb en el tercer trimestre a las embarazadas que son tratadas con ATD por enfermedad de Graves para mantener el estado eutiroideo durante el embarazo. Un valor alto de TBII debería instar a una evaluación clínica y bioquímica de hipertiroidismo en el neonato, tanto al nacimiento (sangre del cordón) como entre los 4 y 7 días, después de que los efectos del pasaje transplacentario de los ATD hayan desaparecido.
  - La evaluación del riesgo de disfunción tiroidea fetal o neonatal requiere la detección de TRAb bloqueantes o estimulantes cuando las madres no tienen la tiroides intacta luego de un tratamiento previo para el hipertiroidismo de Graves.
  - Para identificar neonatos con hipotiroidismo transitorio debido a anticuerpos bloqueantes del receptor de TSH.
-

---

**Recomendación N° 40. Mejoras necesarias en los ensayos de anticuerpos antitiroideos**

- Los ensayos de anticuerpos antitiroideos actuales deberían someterse a estudios comparativos de sus comportamientos analíticos y clínicos.
  - Un estudio comparativo de las preparaciones antigénicas que se usan en la actualidad, facilitaría la identificación de el o los métodos para anticuerpos antitiroideos más convenientes para su utilización clínica.
  - Se deberían establecer las características de las preparaciones antigénicas utilizadas en el ensayo para todos los métodos de autoanticuerpos tiroideos.
  - Debería poder disponerse de las preparaciones de referencia de antígenos.
- 

Todavía se desconoce el papel de los TRAB en la oftalmopatía asociada a tiroideos (TAO) (302). Esta patología parece ser exacerbada por el tratamiento con yodo radioactivo (303). Además, los niveles de TRAB y de otros anticuerpos antitiroideos aumentan significativamente después de este tipo de tratamiento (304-306). Esto sugiere que las determinaciones de TRAB previas al tratamiento con radioyodo podrían ser útiles para predecir el riesgo de TAO aunque aún ningún estudio prospectivo ha documentado esta observación.

#### 9. Tendencias futuras

Es importante realizar un estudio comparativo bien estructurado de los ensayos de autoanticuerpos tiroideos comercialmente disponibles. Esto aportaría evidencia irrefutable de que existen diferencias en el desempeño de los métodos de ensayos actuales (296). Además ayudaría a persuadir a los profesionales de los laboratorios clínicos para que eviten el uso de ensayos con deficiencias en el comportamiento clínico, e instaría a los fabricantes a mejorar sus productos o a retirarlos del mercado.

---

**Recomendación N° 41. Para los fabricantes que desarrollan ensayos de anticuerpos antitiroideos**

- Los métodos absolutos o "estándares de referencia" son un objetivo para el futuro.
- El folleto dentro de la caja del equipo de reactivos debería documentar el método utilizado para obtener el antígeno, el diseño del ensayo, y todas las condiciones experimentales que afecten las interacciones antígeno-anticuerpo.
- La especificidad de los estándares secundarios debería seleccionarse de acuerdo a las interacciones entre los autoanticuerpos en el suero del paciente y su antígeno específico.
- Se debería controlar los efectos "gancho" de los TPOAb y de los TgAb IMA utilizando ~20 muestras con concen-

traciones de anticuerpos > 1.000 kUI/L y ~20 muestras con valores superiores a 10.000 kUI/L.

- Se deberían controlar los efectos de altas concentraciones de antígeno (Tg) en los métodos de TgAb agregando a varios sueros con concentraciones bajas de TgAb, otros con niveles de Tg >10.000 µg/L (ng/mL) y >100.000 µg/L (ng/mL).
- 

#### E. TIROGLOBULINA (TG)

La tiroglobulina (Tg), proteína precursora de la síntesis de las hormonas tiroideas se puede detectar en el suero de la mayoría de los individuos normales si se utiliza un método sensible. El nivel de Tg sérica está influido por tres factores principales: (i) la masa de tejido tiroideo diferenciado presente; (ii) cualquier inflamación o lesión de la glándula tiroidea que provoque liberación de Tg; y (iii) el grado de estimulación del receptor de TSH (por TSH, hCG o TRAB). Una concentración elevada de Tg sérica es un indicador no específico de disfunción tiroidea. La mayoría de los pacientes con Tg sérica elevada presentan alteraciones tiroideas benignas. La Tg sérica se utiliza como marcador tumoral en los pacientes con diagnóstico de cáncer diferenciado de tiroides (CDT). Aproximadamente dos tercios de estos pacientes presentan un nivel pre-quirúrgico elevado de Tg sérica que confirma la capacidad del tumor de secretar Tg y valida su uso como marcador tumoral post-quirúrgico (307). Por el contrario, cuando la concentración pre-quirúrgica de Tg sérica no supera los valores normales, no existe evidencia de que el tumor secrete Tg, y un valor post-quirúrgico indetectable es menos tranquilizador. En esos pacientes una concentración post-quirúrgica detectable de Tg sérica podría reflejar la presencia de una importante masa tumoral. De hecho, en general, los cambios post-quirúrgicos representan cambios en la masa tumoral, siempre que se mantenga un nivel constante de TSH mediante terapia con L-T4.

La Tg sérica medida durante el estímulo de TSH (TSH endógena o TSH recombinante humana, rhTSH), es más sensible para la detección del CDT residual o metastásico que una determinación de Tg basal realizada durante el tratamiento con L-T4 (Figura 6) (308). La magnitud del aumento de la Tg sérica en respuesta a la TSH es un indicador de la sensibilidad del tumor a la TSH. Los tumores bien diferenciados típicamente muestran una respuesta estimulada a TSH elevada equivalente a ~10 veces el valor basal de Tg (309). Los tumores escasamente diferenciados que no concentran yoduro pueden presentar una respuesta disminuida al estímulo con TSH (310).

#### 1. Estado actual de los métodos de determinación de Tg

Generalmente, la tiroglobulina se mide en suero, pero también es posible realizar las determinaciones en lí-

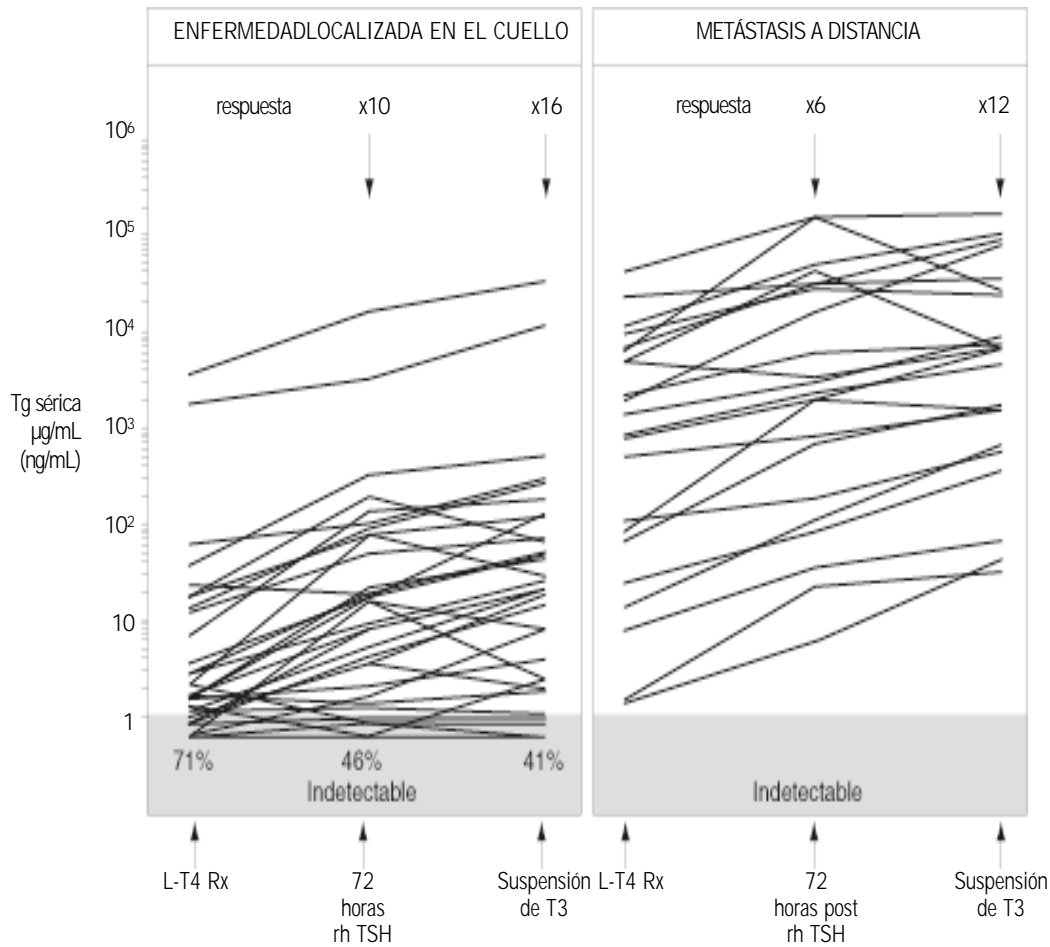


Fig 6. Respuestas de Tg sérica a la administración de rhTSH o a la suspensión de T3. Datos de la ref. 308.

quido de quistes tiroideos y/o en material obtenido por punción con aguja fina de masas cervicales no tiroideas (311). La determinación de Tg sérica es técnicamente difícil. En la actualidad, los ensayos inmunométricos (IMA), están superando en popularidad a los métodos por radioinmunoensayo (RIA). La tendencia se debe a que los métodos IMA ofrecen la ventaja práctica de un menor tiempo de incubación, un rango dinámico más amplio y una mayor estabilidad del anticuerpo marcado, y en consecuencia una menor susceptibilidad al daño por marcación que los RIA (312). Hoy los laboratorios pueden escoger entre una serie de métodos IMA tanto isotópicos (inmunorradiométricos, IRMA) como no isotópicos (fundamentalmente quimioluminiscencia, ICMA). No obstante, los métodos IMA suelen ser más susceptibles a interferencias por autoanticuerpos antitiroglobulina (TgAb), que provocan una subestimación de los niveles de Tg sérica. En consecuencia, algunos laboratorios han escogido los métodos RIA para determinarla en pacientes TgAb positivos y restringir el uso de los métodos IMA a los pacientes TgAb negativos.

Sin embargo, ningún método puede alegar estar totalmente libre de la interferencia por TgAb, la cual puede provocar resultados inapropiados de Tg. Además de los problemas con la interferencia de TgAb, los actuales métodos IMA tienen diferencias en la estandarización y en la especificidad, deficiencias en la sensibilidad, precisión interensayo por debajo del nivel óptimo, y potencial predisposición a sufrir efecto *hook* (gancho) a concentraciones elevadas (312).

(a) Estandarización

Las concentraciones de Tg sérica determinadas por métodos RIA o IMA presentan marcadas diferencias (312) (313). Un reciente esfuerzo en colaboración patrocinado por el Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities ha desarrollado una nueva Preparación de Referencia Internacional para Tg, CRM-457 (298) (314). Este material se puede solicitar al Dr. Christos Profilis, BCR, Rue de la Loi 200, B 1049 Bruselas, Bélgica.

**Recomendación N° 42. Para los fabricantes que desarrollan métodos para la determinación de Tg**

- Sería ideal que el diluyente utilizado para los estándares fuese suero humano libre de Tg y TgAb. Se deberían seleccionar matrices no séricas para producir una señal (cuentas radioactivas, unidades relativas de luz, etc.) que sean idénticas al suero humano libre de Tg y TgAb para evitar desvíos (*bias*) relacionados con las matrices.

El desvío entre los diferentes métodos de determinación de Tg puede provenir de las diferencias entre las matrices libres de Tg utilizadas para la dilución de los estándares y el suero de pacientes, o diferencias en el reconocimiento de los epitopes por parte de los distintos anticuerpos de Tg usados por los diversos fabricantes. Sería ideal que el diluyente utilizado para los estándares fuese suero humano libre de Tg y TgAb o, como alternativa, una matriz no sérica que hubiera sido seleccionada para producir una señal (cuentas radiactivas, unidades relativas de luz, etc.) que fuese idéntica a la del suero humano libre de Tg y TgAb. Es fundamental que se informe a los médicos antes de que el laboratorio cambie su método para Tg para que puedan realizar una nueva determinación de valores basales en los pacientes con CDT.

La adopción generalizada del estándar CRM-457 se proyectó para reducir, aunque no eliminar la significativa variabilidad inter-método que existe entre los inmunoensayos de Tg de los distintos fabricantes. Se esperaba que la estandarización internacional facilitara un mayor acuerdo entre los diversos estudios publicados y mejorara el uso clínico del seguimiento seriado con Tg en los pacientes con CDT, que a veces tienen determinaciones realizadas en distintos laboratorios. Lamentablemente, el uso del estándar CRM-457 no ha eliminado los problemas de variabilidad entre métodos como se esperaba. En la actualidad, los niveles de Tg sérica determinados por métodos que utilizan la estandarización CRM-457 pueden presentar diferencias de más de cuatro veces en sus resultados (Figura 7). Estas diferencias inter-métodos son mayores que la máxima imprecisión aceptada durante el seguimiento de los pacientes individuales (Tabla V) y excluye el intercambio de diferentes métodos de Tg para el seguimiento a largo plazo de los pacientes con cáncer de tiroides.

**Recomendación N° 43. Para los laboratorios que consideran cambiar su método de determinación de Tg**

*Seleccionar un método para Tg en función de las características de su comportamiento analítico y no de su costo o conveniencia. Antes de cambiar el método para Tg el labo-*

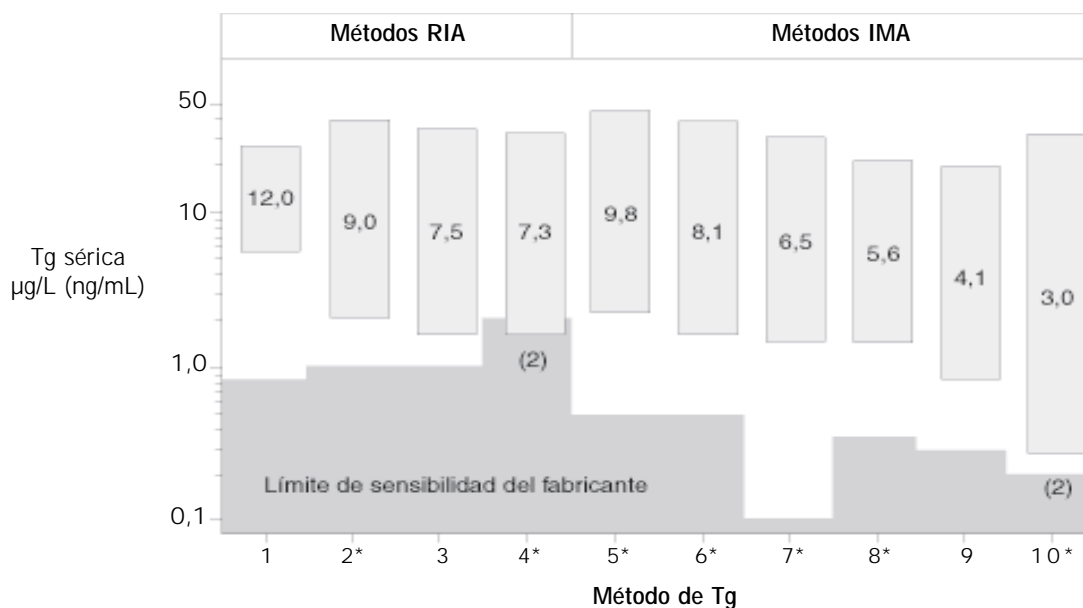


Fig 7. Valores de la media  $\pm$  2 DE para la medición de 20 sueros normales TgAb-negativos mediante 10 métodos diferentes de Tg. Método N°1= Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, EE.UU.; Método N°2=University of Southern California RIA, Los Angeles, CA, EE.UU.; RIA N°3= Kronus RIA, Boise ID, EE.UU.; Método N°4= Endocrine Sciences RIA, Calabasas, CA, EE.UU.; Método N°5=Nichols Institute Diagnostics ICMA, San Juan Capistrano, CA, EE.UU.; Método N°6= Endocrine Sciences ICMA, Calabasas, CA, EE.UU.; Método N°7=Sanofi Pasteur IRMA, Marnes-La-Coquette, Francia; Método N°8=Kronus OptiQuant IRMA, Boise ID, EE.UU.; Método N°9=Brahms DynoTest TgS IRMA, Berlín, Alemania; Método N°10=Diagnostic Products Immulite ICMA, Los Angeles, CA, EE.UU. El asterisco señala los ensayos que declaran estandarización CRM-457.

ratorio debería consultar a los médicos que utilizan su método y comparar los resultados entre el método antiguo y el nuevo propuesto utilizando muestras de pacientes TgAb negativos y positivos.

- **Pacientes TgAb negativos:** Si el desvío entre los resultados del método antiguo y el nuevo es > 10%, se debería informar a los médicos y brindarles tiempo suficiente para volver a determinar los valores basales de los pacientes en estado crítico.
- **Pacientes TgAb positivos:** El laboratorio debería advertir a los médicos acerca de la probable dirección de la interferencia en presencia de TgAb.
- Si se informan los valores de Tg sérica para las muestras TgAb positivas, se debería incluir una advertencia en cada informe de laboratorio:
- **PARA LOS MÉTODOS IMA:**  
Los métodos IMA pueden dar valores de Tg sérica inadecuadamente bajos o indetectables en presencia de TgAb. Los resultados indetectables de Tg sérica no se pueden utilizar como indicadores de ausencia de tumor en un paciente TgAb positivo. Un valor detectable de Tg indica presencia de Tg, pero las concentraciones pueden ser subestimadas.
- **PARA LOS MÉTODOS RIA:**  
Los métodos RIA (aunque menos susceptibles a la interferencia) también pueden dar resultados inapropiados de Tg sérica en presencia de TgAb (dependiendo del método).

#### (b) Sensibilidad

Algunos métodos de Tg carecen de sensibilidad para detectar el límite inferior de referencia eutiroideo que, dependiendo del ensayo, se sitúa aproximadamente en 1-3 µg/L (ng/mL). Los métodos que no están en condiciones de detectar Tg en todos los sueros normales son insensibles para la búsqueda de recidivas en los pacientes con CDT. Al igual que para TSH, la sensibilidad funcional del ensayo de Tg se determina con el 20% del CV inter-ensayo. El protocolo utilizado para determinar la sensibilidad funcional del ensayo de Tg es el mismo que se describió para TSH (Recomendación N° 20) con las tres cláusulas descriptas en la Recomendación N° 44.

#### (c) Precisión

La precisión intra- e inter-ensayo, expresada como porcentaje del coeficiente de variación (%CV) es un parámetro importante para la validación del comportamiento analítico de un ensayo de Tg. La precisión se debería determinar utilizando mezclas de sueros TgAb negativos con tres niveles diferentes de Tg (ver Recomendación N° 44).

La precisión intra-ensayo en los inmunoensayos es mejor que la inter-ensayo, como cabría de esperar. Esto se debe a que las mediciones realizadas dentro de

una misma corrida no están sujetas a la variabilidad introducida por el uso de lotes diferentes de reactivos ni por distintas calibraciones de los instrumentos. La precisión intra-ensayo puede ser el parámetro más significativo cuando se evalúa la respuesta de Tg sérica al estímulo con rhTSH (308). En esta prueba, se extrae una muestra basal y una muestra estimulada con rhTSH con 3 a 5 días de intervalo entre sí, y generalmente se determina la Tg de ambas muestras en la misma corrida (Figura 6) (308)(309). En contraste, cuando se utiliza la determinación de Tg para el control seriado, cuanto más prolongado es el intervalo entre corridas mayor la variabilidad y peor la precisión inter-ensayo. Las matrices no humanas utilizadas para determinar la precisión en la zona baja pueden producir una sensibilidad funcional irreal en comparación con las mediciones realizadas con suero humano libre de TgAb como matriz. Es importante que se establezca la sensibilidad funcional y la precisión inter-ensayo con determinaciones distribuidas durante un período entre 6 y 12 meses, ya que éste es el intervalo clínico característico utilizado para el control de los pacientes con CDT.

La máxima imprecisión de las determinaciones de Tg sérica sugerida para el seguimiento de pacientes debe ser < 5% (Tabla V). Es poco probable que los ensayos actuales de Tg puedan mantener una precisión tan estricta a lo largo del intervalo clínicamente relevante entre 6 y 12 meses, típicamente utilizado para el control de los pacientes con CDT. Este problema con la precisión se puede superar repitiendo la determinación en muestras previas almacenadas del paciente en la misma corrida que la muestra actual (9).

#### Recomendación N° 44. Sensibilidad funcional y precisión inter-ensayo para los ensayos de Tg

La sensibilidad funcional y la precisión inter-ensayo se deberían establecer utilizando el mismo protocolo que para TSH (Recomendación N° 20) con tres consideraciones importantes:

- Utilización de mezclas de suero humano que no contengan TgAb, determinados por un inmunoensayo sensible.
- Se recomiendan valores óptimos para mezclas de valores bajos, medios y altos:

Mezcla de valor bajo (utilizada para determinar la sensibilidad funcional) debería tener un valor de Tg sérica que sea entre 30 y 50% más elevado que el valor esperado de sensibilidad funcional (SF).

[Si SF = 1,0 µg/L (ng/mL) el valor de la mezcla baja debería ser 1,3 a 1,5 µg/L (ng/mL)]

Mezcla de valor medio = ~10 µg/L (ng/mL) es decir, cercano al rango medio normal.

Mezcla de valor alto = ~90% del límite superior que informa el fabricante.

- El período utilizado para evaluar la precisión inter-ensa-

yo debiera ser por lo menos de 6 meses. Este lapso es más representativo del intervalo clínico utilizado para el control de los pacientes con CDT que el intervalo entre 6 y 8 semanas sugerido para TSH en la Recomendación N° 20.

(d) *Efecto hook a valores elevados*

Los métodos IMA se ven afectados por el efecto *hook* a valores elevados. Los valores falsamente bajos debido a este "efecto gancho" son particularmente problemáticos en los ensayos de marcadores tumorales como la Tg, en donde es frecuente encontrar valores muy elevados cuando los pacientes presentan metástasis avanzada (307) (310) (315). Se produce efecto *hook* cuando un exceso de antígeno satura la capacidad de unión del anticuerpo de captura. Esto provoca una señal inadecuadamente baja que se traduce en un resultado bajo o paradójicamente normal para un paciente con una concentración excesivamente elevada de Tg sérica (>1000 µg/L (ng/mL) (312). Los fabricantes de métodos IMA intentan solucionar el problema del efecto *hook* mediante uno de estos dos procedimientos:

- Diseños de ensayo de dos pasos. Se realiza una primera incubación de la muestra sérica con el anticuerpo de captura antes de que los constituyentes no ligados se eliminen por lavado y se introduzca el anticuerpo marcado, seguido de una segunda incubación.
- Se realizan dos determinaciones (generalmente sin diluir y con dilución 1/10) para cada muestra.

Existe sospecha de efecto *hook* cuando el tubo con la dilución presenta un resultado más alto que la muestra sin diluir. Se realizan más diluciones hasta que el resultado en el tubo con la dilución disminuya y las concentraciones de Tg séricas de dos diluciones consecutivas concuerden.

Recomendación N° 45. Detección de efecto *hook*

- Se recomienda un diseño de ensayo en dos pasos para minimizar los problemas *hook*. Los ensayos "en un paso" que son más propensos al efecto *hook* deberían medir cada muestra en dos concentraciones (sin diluir y 1:10) para ver si hay discrepancias entre ambos resultados.
- Se debería validar el efecto *hook* en todos los métodos (de dos pasos o de un paso) antes de su comercialización.
- Para verificar el efecto *hook*, efectuar diluciones 1/10 seriadas de ~ 20 muestras TgAb negativas con concentraciones de Tg sérica superiores a 10.000 µg/L (ng/mL) y ~ 20 muestras TgAb negativas con concentraciones de Tg sérica superiores a 100.000 µg/L (ng/mL) hasta que se demuestre linealidad.

(e) *Interferencia por autoanticuerpos anti tiroglobulina (TgAb)*

Los autoanticuerpos anti tiroglobulina (TgAb) se detectan con mayor frecuencia en los pacientes con CDT que en la población general (~20 *versus* ~10%, respectivamente) (276). Las determinaciones seriadas de los TgAb séricos pueden ser indicadores pronósticos independientes de la eficacia del tratamiento o de la recidiva del CDT en los pacientes TgAb positivos (276-278) (316). Cualquier TgAb presente en la muestra tiene el potencial de interferir con un método de Tg (317) (318). Debido a que los TgAb son heterogéneos, ni la medición de la concentración de estos anticuerpos ni un ensayo de recuperación con Tg exógena permiten predecir si los TgAb causarán interferencia (276) (317) (318). Probablemente el signo característico más confiable de la interferencia por TgAb sea la presencia de discordancia entre los RIA y los IMA. La Tg determinada por RIA se caracteriza por valores más elevados que la Tg determinada mediante IMA si la muestra contiene TgAb que provoquen interferencia (276) (309). En la actualidad se ha logrado consenso acerca de que los ensayos de recuperación de Tg no son un método confiable para la detección de TgAb y se los debería eliminar (276) (318). Los primeros estudios que informaron recuperaciones bajas en ausencia de TgAb en algunos sueros tenían el problema de la insensibilidad de los métodos iniciales para medir TgAb. Cuando se utilizan inmunoensayos cuantitativos con sensibilidad adecuada, los TgAb deberían detectarse siempre cuando la recuperación es baja.

Los métodos inmunométricos no competitivos (IMA) parecen ser más susceptibles a la interferencia producida por TgAb que los RIA, lo que se evidencia por el hallazgo de valores indetectables de Tg en individuos con enfermedad de Graves (318) (319). Aparentemente, en algunos casos los IMA no pueden cuantificar la Tg acomplejada con los TgAb y esta omisión puede provocar subestimación de la concentración de Tg total. Por el contrario los métodos RIA parecen capaces de cuantificar las fracciones de Tg de la muestra tanto libre como ligada a TgAb y característicamente producen valores más altos que los métodos IMA en presencia de TgAb (276) (309). Existe gran variabilidad en la sensibilidad y especificidad de los diferentes ensayos de TgAb [Sección-3 D6(b)]. Es esencial que la medición de TgAb sea realizada por el laboratorio que determinará la Tg porque ese laboratorio es responsable de seleccionar el método de TgAb más apropiado para detectar interferencia por TgAb en el método para Tg que utilice.

Cuando se determina Tg en suero que contiene TgAb con métodos RIA e IMA, con frecuencia se observa una discordancia RIA: IMA equivalente a [Tg RIA ≥ 2 µg/L (ng/mL): Tg IMA = indetectable]. Esta



discordancia parece caracterizar la interferencia por TgAb en una o ambas clases de métodos. Como el umbral actual para una respuesta de Tg positiva estimulada por rhTSH equivale a 2 µg/L (ng/mL), el grado de discordancia tiene el potencial de influir en la toma de decisiones clínicas (308). Algunos profesionales creen que las mediciones con RIA producen resultados de Tg sérica con mayor validez clínica para los pacientes TgAb positivos que las mediciones con IMA, según se infiere por las correlaciones con el estado clínico y el paralelismo con determinaciones seriadas de TgAb (276) (320). No obstante, cabe destacar que ningún método RIA es inmune a la interferencia por TgAb en todos los sueros TgAb positivos y que la influencia de estos anticuerpos en los diferentes métodos RIA es bastante variable y se relaciona con los componentes del ensayo y las condiciones de incubación. Específicamente, la calidad del trazador I<sup>125</sup> de la Tg, junto con la especificidad del anticuerpo policlonal para Tg determinan la predisposición del método a la interferencia por TgAb (275) (321) (322).

---

**Recomendación N° 46. Interferencia por TgAb y ensayos de recuperación**

- Los ensayos de recuperación no son confiables para la detección de TgAb y se los debería eliminar. Estudios previos que informaron recuperaciones bajas en ausencia de TgAb estaban influenciados por la baja sensibilidad de los métodos iniciales para medir TgAb. Cuando se utilizan inmunoensayos ultrasensibles, siempre es posible detectar TgAb cuando la recuperación es baja.
  - La discordancia entre las mediciones de Tg realizadas con IMA y RIA en una muestra TgAb positiva sugiere interferencia por TgAb (si los valores habitualmente concuerdan en las muestras TgAb negativas).
  - Los laboratorios no deberían informar valores indetectables de Tg sérica por método IMA en pacientes TgAb positivos.
- 

Aunque no existe garantía de que ningún método actual de Tg esté libre de interferencia por TgAb, la subestimación que se produce con la metodología IMA es la dirección de interferencia más grave, ya que este error tiene el potencial de enmascarar la enfermedad metastásica. En consecuencia, los laboratorios no deberían informar valores indetectables de Tg sérica para pacientes TgAb positivos.

---

**Recomendación N° 47. Para los fabricantes y los laboratorios**  
*El folleto con el procedimiento técnico incluido en la caja de reactivos para Tg debería informar sobre las características reales de comportamiento analítico del método (es decir, un comportamiento reproducible en una serie de laboratorios clínicos).*

- Se deberían estandarizar los ensayos contra la preparación de referencia CRM-457. Los ensayos que no estén estandarizados contra el CRM-457 deberían proveer un factor de corrección.
  - El valor medio de Tg y los límites de 2 DE del rango de referencia para los individuos normales eutiroideos TgAb negativos (establecidos utilizando la Recomendación N°48) se deberían citar en todas las publicaciones para permitir la comparación de los valores absolutos.
  - Los ensayos que no pueden detectar Tg en todos los sueros normales presentan una sensibilidad subóptima para el control de los pacientes con CDT.
  - Se debería verificar el desvío de la matriz utilizada para la dilución de los estándares (Recomendación N° 42).
  - La sensibilidad funcional y la precisión intra- e inter-ensayo se deberían establecer utilizando los protocolos descritos en la Recomendación N° 44.
  - La interferencia por TgAb se debería evaluar comprobando las discordancias RIA: IMA en los sueros TgAb positivos [en valores de TgAb de 100 a > 1000 kUI/L (UI/mL)].
  - Se deberían usar inmunoensayos de sensibilidad adecuada de TgAb, y no ensayos de recuperación con Tg exógena para detectar interferencia por TgAb (ver Recomendación N° 46).
  - Los valores de Tg sérica para muestras TgAb positivas no se deberían informar si el método da valores inapropiadamente indetectables en pacientes con CDT con enfermedad documentada.
- 

**2. Determinación de ARN mensajero (ARNm) para Tg**

Se ha utilizado la amplificación de ARNm específico de tejido con la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) para detectar células cancerígenas circulantes en sangre periférica de los pacientes con melanoma, cáncer de próstata y de mama (326-328). La disponibilidad de cebadores (*primers*) específicos de Tg permitió la aplicación de esta técnica a la detección de transcritos de ARNm Tg en sangre. El uso de RT-PCR para detectar recidiva de cáncer tiroideo se informó por primera vez en 1996 (329). A partir de entonces, se ha aplicado la técnica a material de punción de metástasis de ganglios cervicales y se ha visto que es más sensible que la determinación de Tg en el aspirado (330).

Todavía tiene que establecerse el valor clínico de la determinación de ARNm Tg en sangre periférica. Antes de que se pueda utilizar este método para la toma de decisiones terapéuticas en el CDT, es necesario resolver ciertas cuestiones sobre la sensibilidad y especificidad tisular del ARNm Tg en sangre periférica (323-325).

Varios grupos han desarrollado métodos cuantitativos de RT-PCR para la detección de transcritos de

ARNm Tg en sangre (323-325)(331-333). Estos estudios generalmente encuentran ARNm Tg detectable en todos los individuos normales pero presentan una correlación pobre con la Tg sérica determinada por inmunoensayo (331)(332). También hay diferencias en la correlación entre ARNm Tg y masa tumoral. Algunos estudios han informado que la cantidad de ARNm Tg se correlaciona con la presencia o ausencia de metástasis mientras que otros no informan dicha correlación (324)(331)(333). Es probable que estas discrepancias reflejen diferencias (a) en la sensibilidad y en la especificidad de los primers de Tg y los sistemas RT-PCR, (b) en la sensibilidad de las técnicas de imágenes y de los inmunoensayos de Tg utilizados y (c) en el nivel de TSH del paciente. Los problemas de especificidad (resultados falsos positivos) constituyen una conocida limitación de la metodología RT-PCR (328)(334). Se necesitan estudios adicionales para determinar si los niveles detectables de ARNm Tg informados para los pacientes atiróticos sin metástasis conocida reflejan enfermedad clínicamente oculta, artefactos del ensayo o transcripción ilegítima.

Es necesario demostrar la correlación entre los resultados de los ensayos de ARNm Tg y la recidiva clínica, en especial en pacientes ARNm Tg positivos con valores indetectables de Tg sérica antes de que se generalice la adopción del ensayo de ARNm Tg en la práctica clínica. Como este método es más costoso que la determinación de Tg sérica, es probable que si se demuestra que las mediciones de ARNm Tg son útiles para la clínica, se reserven para los pacientes de alto riesgo o TgAb positivos en quienes las determinaciones de Tg sérica no son diagnósticamente confiables.

### 3. Valores de referencia de Tg sérica

#### (a) Individuos eutiroideos normales

Las concentraciones de Tg sérica presentan una distribución normal logarítmica en los individuos eutiroideos. Los valores suelen ser ligeramente más elevados en las mujeres, pero no es necesario establecer rangos de referencia en relación con el género (335). El hábito de fumar es un factor asociado con bocio y valores elevados de Tg sérica (336). Los rangos de referencia de Tg varían según la zona geográfica, ya que reflejan la disponibilidad e ingesta de yoduro (337)(338). La selección de individuos para la cohorte normal para determinar el rango de referencia de Tg debería respetar los siguientes criterios de exclusión:

- Bocio
- Consumo de cigarrillos
- Antecedentes personales o familiares de enfermedad tiroidea
- Presencia de autoanticuerpos tiroideos (TgAb o TPOAb)

TSH sérica < 0.5 mUI/L o > 2.0 mUI/L  
Embarazo

#### (b) Valores de Tg sérica después de la cirugía tiroidea

Como se indica en la Recomendación N° 48, el intervalo de referencia para Tg citado en los informes de laboratorio no corresponde para los pacientes que han sido sometidos a cirugía tiroidea. Durante las primeras semanas después de la cirugía, la Tg sérica estará determinada por la extensión de la intervención, el grado de liberación de Tg debida al daño quirúrgico, y, lo más importante, si el paciente está o no bajo tratamiento con hormona tiroidea. De hecho, la concentración de TSH sérica es un modulador tan potente del nivel de Tg sérica que siempre es necesario conocer el nivel de TSH del paciente antes de establecer el significado de cualquier determinación de Tg sérica.

En las primeras semanas posteriores a la tiroidectomía, se produce una típica disminución de las concentraciones de Tg con una vida media aproximada entre 2 y 4 días, cuando la administración de hormona tiroidea evita el aumento de la TSH (340)(341). En este contexto, la relación entre los valores pre- y post-quirúrgicos (entre 6 y 8 semanas) de Tg puede aportar información que podría influir en el esquema de tratamiento. Durante el seguimiento a largo plazo, las concentraciones de Tg sérica medidas con y sin tratamiento de L-T4 (con TSH suprimida o desenfrenada, respectivamente) proporcionan diferente información. La curva de los valores de Tg sérica (con tratamiento con L-T4) es un indicador más específico de un cambio en la masa tumoral que cualquier valor aislado de Tg sérica (122). La concentración de Tg sérica durante el tratamiento con L-T4 es un indicador más estable de masa tumoral que la Tg sérica determinada cuando la TSH está elevada (suspensión de L-T4 o administración de rhTSH) anterior a un rastreo corporal con yodo radioactivo (RAI). Esto se debe a que la magnitud del aumento de Tg sérica estimulada por TSH está influida por el grado y la cronicidad de la elevación de TSH que puede variar de un rastreo a otro. Sin embargo, según lo muestra la Figura 6, como la TSH normalmente estimula más de 10 veces la Tg sérica, las determinaciones de Tg sérica estimuladas por TSH son más sensibles para detectar enfermedad restringida al cuello, que los niveles de Tg sérica determinados durante la supresión de TSH (308)(309). La magnitud de la respuesta de la Tg sérica estimulada por TSH es un indicador de la sensibilidad del tumor a la TSH. Los tumores metastásicos poco diferenciados que son rastreo corporal con yodo radioactivo negativos presentan respuestas disminuidas de Tg estimulada por TSH (310).

**Recomendación N° 48. Intervalos de referencia para Tg sérica**

- Los rangos de referencia para Tg se deberían determinarse localmente porque las concentraciones de Tg sérica están influenciadas por la ingesta de yoduro:
- *Países con ingesta adecuada de yoduro:* El intervalo de referencia para Tg sérica para la población eutiroides TgAb negativa según los estándares CRM-457 se aproxima a los 3 a 40 µg/L (ng/mL).
- *Países con yododeficiencia:* Es posible que se registre un aumento en la media de Tg de la población y del límite superior del rango de referencia relacionado con el grado de carencia de yodo.
- Los laboratorios deberían validar su intervalo de referencia para Tg independientemente de los fabricantes.
- Se deberían establecer rangos de referencia a partir de los valores logarítmicamente transformados de 120 individuos normales, no fumadores, eutiroides (TSH 0,5 a 2,0 mUI/L) menores de 40 años sin antecedentes personales ni familiares de enfermedad tiroidea y sin evidencia de TgAb o TPOAb.
- Es engañoso citar el rango de referencia normal eutiroides al informar valores de Tg sérica para los pacientes con CDT tiroidectomizados. Los valores de referencia deberían relacionarse con los límites de referencia eutiroides para el método, la masa tiroidea y el nivel de TSH.

Como ejemplo, los rangos de referencia a continuación serían apropiados para un método de Tg con un rango de referencia eutiroides de 3-40 µg/L (ng/mL):

Tg µg/L (ng/mL)	Condición
3 – 40	Glándula tiroidea normal (TSH 0,4-4,0 mUI/L)
1.5 – 20	Glándula tiroidea normal (TSH < 0.1 mUI/L)
< 10	Lobectomía tiroidea (TSH < 0,1 mUI/L)
< 2	Tiroidectomía casi total (TSH < 0,1 mUI/L)

*4. Usos clínicos de las determinaciones de Tg sérica*

La concentración de Tg sérica refleja la masa tiroidea, el daño tiroideo y el estímulo del receptor de TSH (122). En consecuencia, un aumento en la Tg sérica es un hallazgo inespecífico no asociado virtualmente con ninguna patología tiroidea.

*(a) Patologías no Neoplásicas*

Se produce un aumento de la Tg sérica cuando los pacientes tienen bocio y en la mayoría de las patologías hipertiroideas. La concentración baja de Tg sérica puede ser un parámetro útil para la confirmación

del diagnóstico de tirotoxicosis facticia o para la investigación de la etiología de hipotiroidismo congénito (342)(343).

**Recomendación N° 49. Determinación de Tg sérica para patologías no neoplásicas**

*Concentraciones anormalmente altas de Tg resultan de anomalías en la masa tiroidea, excesiva estimulación tiroidea, daño físico a la tiroides secundario a cirugía, PAAF o tiroiditis. Las determinaciones de Tg sérica son útiles para:*

- Diagnosticar tirotoxicosis facticia caracterizada por Tg sérica baja.
- Investigar la etiología del hipotiroidismo congénito detectado en el *screening* neonatal.
- Evaluar la actividad de la tiroiditis inflamatoria, por ejemplo: tiroiditis subaguda o inducida por amiodarona.

La concentración de Tg a veces también es útil para confirmar la historia pasada de tiroiditis, en la cual la concentración de Tg es habitualmente el último parámetro bioquímico que se normaliza (hasta los 2 años) (344). Estudios recientes sugieren la determinación de Tg sérica como un parámetro para reflejar el estado de yododeficiencia en una población determinada (337) (338).

*(b) Carcinoma diferenciado de tiroides (CDT)*

En el contexto del CDT, la concentración de Tg sérica refleja masa tiroidea (tumor o remanente normal), lesión tiroidea (cirugía o PAAF) y estimulación del receptor de TSH (endógena o con rhTSH) (122). Debido a que la TSH es el principal regulador de la concentración de Tg sérica, es difícil interpretar los valores de Tg sin conocer el nivel de TSH del paciente. Aunque no hay un "rango normal de referencia para Tg" para los pacientes con CDT tratados, la relación normal entre la masa tiroidea y la Tg sérica provee un punto de referencia importante. Concretamente, un gramo de tejido tiroideo normal libera ~1 µg/L (ng/mL) de Tg en la circulación cuando la TSH sérica es normal y ~0,5 µg/L (ng/mL) cuando se la suprime por debajo de 0,1 mUI/L.

**Recomendación N° 50. Determinación de Tg sérica para el carcinoma diferenciado de tiroides (CDT)**

*Pacientes TgAb negativos:*

- Los valores séricos pre-quirúrgicos (extracción antes o más de 2 semanas después de la PAAF) son útiles para la determinación de la capacidad secretante de Tg del tumor.
- La disminución aguda post-quirúrgica de Tg sérica refleja la extensión de la cirugía con una vida media de la Tg

entre 3 y 4 días. (Si se administra hormona tiroidea para evitar el aumento de TSH).

- No existe "rango normal" para un paciente tiroidectomizado. Los pacientes completamente atireóticos no deben presentar Tg detectable en suero, incluso si la TSH está elevada.
- Parámetro útil de referencia: un gramo de tejido tiroideo normal libera ~1 µg/L (ng/mL) de Tg en suero cuando la TSH es normal y ~0,5 µg/L (ng/mL) cuando la TSH está suprimida a < 0,1 mUI/L.
- Cuando la Tg sérica es detectable durante el tratamiento con L-T4 (TSH estable) se pueden seguir los cambios en la masa tumoral con determinaciones seriadas de Tg sérica sin interrupción de la hormona tiroidea ni rhTSH.
- Cuando la Tg sérica es indetectable bajo tratamiento con L-T4 (y ausencia de TgAb) la Tg sérica estimulada por TSH es más sensible para la detección de enfermedad localizada en el cuello.
- Habitualmente se produce un aumento > 5 veces en la Tg sérica con respecto a los valores bajo supresión con LT4 luego del estímulo con TSH (endógena o rhTSH). Estudios comparativos muestran que las respuestas de la Tg estimulada con rhTSH son aproximadamente la mitad que las observadas con TSH endógena siguiendo a la suspensión de la hormona tiroidea.

#### **Pacientes TgAb positivos:**

- Habitualmente presentan respuestas disminuidas o ausentes de Tg sérica estimulada con TSH.
- Las determinaciones seriadas de TgAb (por inmunoensayos) son valiosas como marcadores tumorales sustitutos.

#### *i) Tg sérica pre-quirúrgica*

Algunos tumores tiroideos carecen de capacidad para secretar tiroglobulina. En 2/3 de los pacientes con CDT se observa un aumento en el valor pre-quirúrgico de Tg sérica, lo que indica que sus tumores tienen la capacidad de secretar Tg, y por lo tanto el seguimiento post-quirúrgico con Tg puede ser de utilidad clínica en ellos (307). Esta información es fundamental para la interpretación de los resultados post-quirúrgicos de la Tg sérica. Si el nivel pre-quirúrgico está dentro de los límites normales, un valor post-quirúrgico indetectable de Tg sérica es menos tranquilizador porque el tumor pudo ser originariamente no secretor de Tg. La sensibilidad del control post-quirúrgico con Tg sérica para la detección de recidiva será mayor cuando el tumor sea relativamente pequeño (< 2 cm de diámetro) y el valor pre-quirúrgico de Tg sea elevado. (Nota: las muestras pre-quirúrgicas se deberían extraer antes de la PAAF, o después de 2 semanas de la misma).

#### *i) Determinación de Tg sérica entre 1 y 2 meses después de la cirugía tiroidea*

Después de la cirugía tiroidea, las concentraciones de Tg sérica disminuyen rápidamente con una vida

media entre ~2 y 4 días (340). La Tg liberada por daño durante la manipulación quirúrgica se debería resolver en gran parte dentro de los primeros dos meses posteriores a la cirugía. Durante este lapso la TSH tendrá una influencia dominante en el nivel de Tg sérica. Si se inicia el tratamiento con hormona tiroidea inmediatamente después de la cirugía para evitar el aumento de TSH, la concentración de Tg sérica declinará a un valor que refleje el tamaño del remanente tiroideo normal más cualquier residuo o metástasis tumoral. Como el remanente tiroideo después de una tiroidectomía casi total habitualmente se aproxima a 2 gramos de tejido, se espera una concentración de Tg sérica equivalente a < 2 µg/L (ng/mL) cuando la cirugía ha sido exitosa y el nivel de TSH se mantiene por debajo de 0,1 mUI/L.

#### *iii) Determinación de Tg sérica durante el seguimiento a largo plazo bajo tratamiento con L-T4.*

Cuando el nivel de TSH es estable durante el tratamiento con L-T4, cualquier cambio en el nivel de Tg sérica reflejará un cambio en la masa tumoral. La recidiva clínica en tumores considerados "secretores deficientes de Tg" (valor pre-quirúrgico de Tg en el rango normal) se puede asociar con valores post-quirúrgicos bajos o indetectables de Tg sérica. Por el contrario, la recidiva de tumores considerados "buenos secretores de Tg" (valores pre-quirúrgicos elevados de Tg) se asocia normalmente con un aumento progresivo en Tg sérica (122). El perfil de las determinaciones seriadas de Tg sérica, establecido cuando el paciente tiene TSH estable, es más útil clínicamente que un valor aislado de Tg. Sin embargo, es posible interpretar el significado de un valor aislado de Tg conociendo el rango de referencia del ensayo de Tg, la extensión de la cirugía tiroidea y la concentración de TSH (en un estado estable), según lo muestra la Figura 8.

#### **Condiciones asumidas**

*Sin lesión tiroidea reciente (cirugía o PAAF)*

*Usando la Recomendación N° 48, la media normal de Tg = 13,5, rango 3-40 (2DE) µg/L (ng/mL)*

*Masa de tejido tiroideo normal = 10-15 gramos*

*Un gramo de tejido tiroideo normal produce ~1 µg/L (ng/mL) Tg en suero si la TSH es normal*

*Un gramo de tejido tiroideo normal produce ~0,5 µg/L (ng/mL) Tg si la TSH es < 0.1 mUI/L*

#### *(iv) Respuesta de Tg Sérica al estímulo con TSH*

La magnitud de la respuesta de la Tg sérica a la TSH endógena (suspensión de la hormona tiroidea) o a la administración de rhTSH es un indicador de la sensibilidad del tumor a la TSH (308) (309). Habitual-

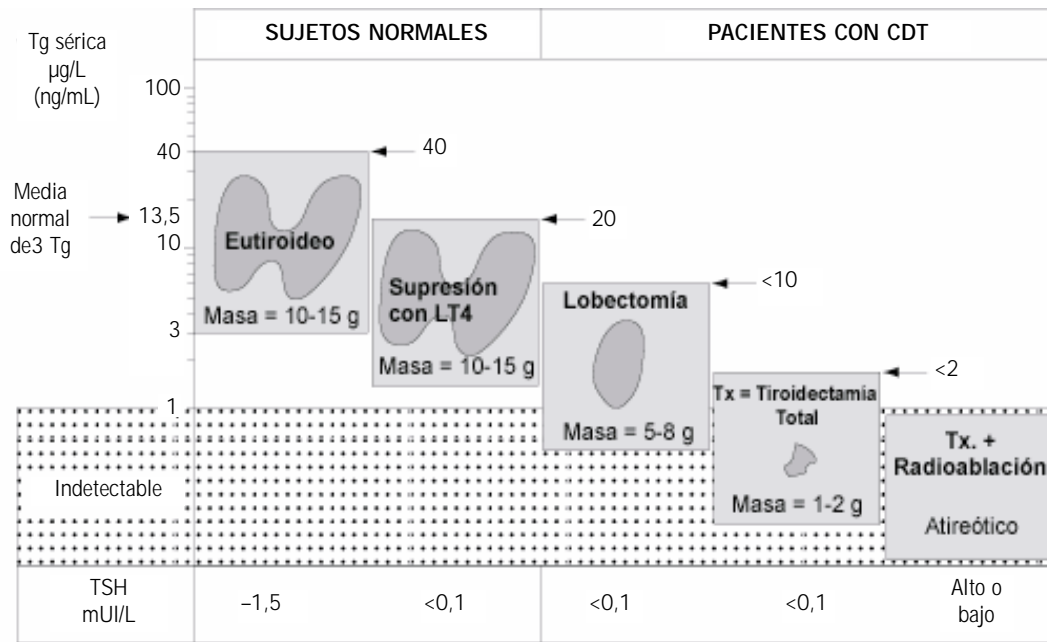


Figura 8. Valores esperados de Tg sérica relativos a la masa tiroidea y al valor de TSH (Para los métodos con un rango de referencia diferente al que se muestra en la Figura 8 ajustar los valores absolutos aplicando un factor de corrección basado en el valor normal medio del método, por ejemplo, para los métodos con un valor normal medio de 6,2 ug/L (ng/mL) corregir los valores que se muestran en un 50%).

mente, el estímulo con TSH de los remanentes tiroideos normales o de un tumor bien diferenciado produce un aumento > 3 veces de Tg sérica por sobre el nivel basal (con TSH suprimida) en los pacientes TgAb negativos (Figura 6). La respuesta de la Tg sérica a un aumento en la TSH endógena es habitualmente dos veces mayor que con rhTSH (308) (345). Además, los tumores pobremente diferenciados, presentan una respuesta disminuida (< 3 veces) de la Tg sérica al estímulo con TSH (310). Cabe observar que los pacientes TgAb positivos habitualmente presentan una respuesta disminuida o ausente de la Tg al estímulo con rhTSH determinada por la mayoría de los ensayos, incluso cuando la concentración basal de Tg es detectable.

#### F. CALCITONINA Y PROTO-ONCOGEN RET

El carcinoma medular de tiroides (CMT) se produce por una transformación maligna de las células C parafoliculares tiroideas y representa aproximadamente entre el 5 y el 8% de todos los casos de cáncer de tiroides. Aproximadamente el 75% es de presentación esporádica, en tanto el 25% restante es hereditario (9) (11) (347). Según un estudio de patología nodular la prevalencia de CMT es de 0,57% (348). El comportamiento y el manejo del CMT medular difiere del que se observa en el carcinoma de tiroides bien diferenciado de origen folicular (346). Las formas hereditarias de CMT se presentan asociadas a síndromes poliglan-

dulares denominados neoplasias endócrinas múltiples (NEM) tipos 2A y 2B que son, heredados de manera autosómica dominante, con penetrancia asociada a la edad, y expresión variable. Existe la denominada variante familiar del CMT (CMTF), que se caracteriza por la aparición de CMT sin endocrinopatía asociada. En 1993 se describieron mutaciones responsables de estos trastornos en el proto-oncogen RET (349) (350), que se localiza en el cromosoma 10 sub-banda 10q11.2. Las expresiones fenotípicas de la NEM hereditaria se resumen en la Tabla VII.

#### 1. Detección de CMT mediante la determinación de calcitonina sérica (CT)

##### (a) Biosíntesis de calcitonina

El gen CALC-1 que codifica para la CT humana se ubica en el extremo del brazo corto del cromosoma 11 (11p15.3-15.5). Si bien las células C parafoliculares tiroideas son la fuente principal de CT circulante, muchas otras categorías de células neuroendócrinas, normalmente contienen y segregan CT. La calcitonina madura es un polipéptido de 32 aminoácidos (aa) con un puente disulfuro y una amida prolínica carboxiterminal que juega un rol funcional importante. Como se muestra en la Figura 9, la CT madura es el resultado de una modificación postraducciona de un precursor de más de 141 aa (preprocalcitonina) dentro de las células C parafoliculares. La preprocalcitonina primero sufre el clivaje de

su péptido señal para formar procalcitonina (proCT), una prohormona que consiste en 116 residuos de aa. En el extremo aminoterminal de proCT hay un péptido de 57 aa, denominado aminoprocalcitonina (amino-proCT o PAS-57), y en el extremo carboxiterminal, un péptido de 21 aa conocido como péptido-1 carboxiterminal de calcitonina (CCP-1 o Katalcalcina). Los 33 aa de la porción central de la molécula de proCT constituyen la molécula de CT inmadura. La CT madura activa de 32 aminoácidos (que incluye una prolina amidada en su extremo carboxiterminal) se produce a partir de CT inmadura por acción de la enzima monoxidasa amidante de peptidilglicina (PAM).

(b) *Métodos de determinación de CT*

Hasta 1988, los métodos de ensayo para la determinación de CT se basaban principalmente en el radioinmunoensayo y utilizaban anticuerpos policlonales que reconocían tanto el monómero de CT madura como otras formas circulantes (precursores y productos de degradación). Estos primeros ensayos carecían de especificidad y sensibilidad. Desde 1988, las mejoras con las nuevas técnicas inmunométricas basadas en el uso de anticuerpos monoclonales (uno capaz de identificar la región N-terminal y el otro, la región C-terminal) han permitido desarrollar ensayos más específicos y sensibles para la CT madura monomérica de 32 aa. Actualmente los ensayos inmunométricos de dos sitios detectan CT en plasma en ayunas en el 83% y 46% de hombres y mujeres sanos, respectivamente (351-353). Los valores de CT pueden diferir según el método utilizado, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Es importante que los médicos conozcan que las diferencias entre métodos existen y pueden afectar la interpretación y el uso adecuado de la CT en el diagnóstico y el manejo del CMT.

(c) *Valores basales de calcitonina*

En 1968 se estableció que los valores basales de calcitonina eran un marcador útil para el diagnóstico de

CMT (354). En la actualidad los IMA de dos sitios, específicos para CT madura, típicamente informan niveles de CT por debajo de 10 ng/L (pg/mL) para los controles normales sanos y para el 90% de los pacientes con otra disfunción tiroidea que no sea CMT. (348) (355-357).

Recomendación N° 51. *Ensayos para CT*

- La CT madura (de 32 aminoácidos) es el principal marcador tumoral en el CMT.
- Las determinaciones de CT aplicadas al diagnóstico y seguimiento del CMT deberían realizarse mediante ensayos inmunométricos de dos sitios, específicos para el monómero maduro de CT de 32 aminoácidos.
- Actualmente, los valores basales de CT inferiores a 10 pg/mL (ng/L) son considerados como normales.
- A medida que se disponga de nuevos ensayos más sensibles, dicho umbral debería redefinirse.

Los pacientes con formas micro o macro de CMT (variantes esporádicas o familiares) poseen valores elevados de CT que correlacionan con la masa tumoral (358). La hiperplasia de células C (HCC) es el hallazgo histológico más temprano, previo al desarrollo de un microcarcinoma, en los pacientes con NEM2. La HCC se presenta pronto luego del nacimiento, y en esta etapa de la enfermedad la CT basal puede ser normal. Por lo tanto un resultado basal normal de CT no descarta patología de células C en las etapas más tempranas.

(d) *Pruebas de estimulación de calcitonina para el diagnóstico de CMT*

Para detectar de manera temprana las anomalías en las células C, se han usado pruebas de estimulación con secretagogos conocidos de la CT como el calcio y un análogo de la gastrina (pentagastrina, Pg) y cuando la Pg no está disponible, el omeprazol ya sea en forma separada o combinada, que provocan un aumento en la CT en todos los estadios del CMT (359-364). Una ventaja de estas pruebas es que pueden detectar hiperplasia de cé-

Tabla VII. *Fenotipos de Neoplasia Endócrina Múltiple (NEM)*

Fenotipo	Características clínicas	
NEM2A (60%)	Carcinoma medular de tiroides (CMT), Feocromocitoma Hiperparatiroidismo Dorsalgia	100% 8-60% 5-20% <5%
NEM2B (5%)	Carcinoma medular de tiroides (CMT) Feocromocitoma Aspecto Marfanoide Neuomas de mucosa y ganglioneuromatosis intestinal	100% 50% 100% 100%
Carcinoma medular de tiroides variante familiar (CMTF) (35%)	Carcinoma medular de tiroides (CMT)	100%

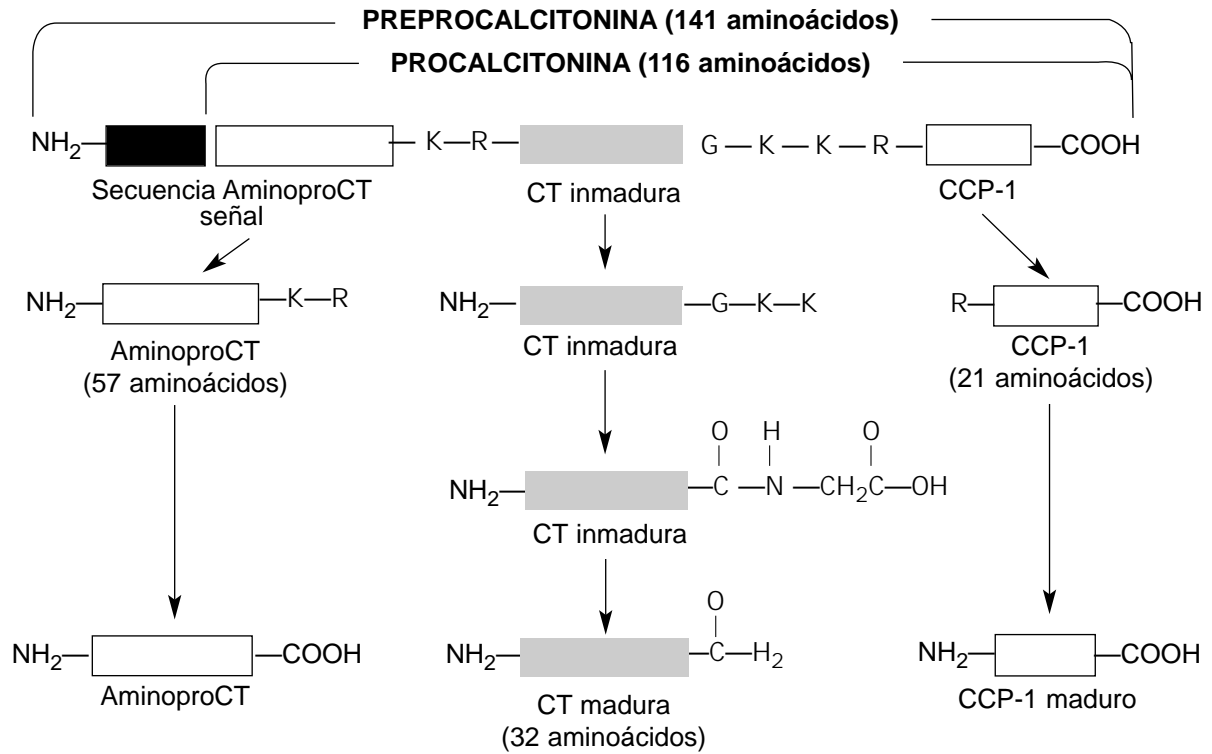


Figura 9. Maduración Postraduccional de Calcitonina

lulas C antes de confirmarse el CMT. En los países, en los que la utilización de técnicas de genética molecular es accesible, la cirugía para los portadores se basa exclusivamente en la prueba genética, y las pruebas de estimulación se usan raramente. Lo mismo sucede en países en donde la pentagastrina es difícil de obtener. Las pruebas de estimulación se usan habitualmente:

Para confirmar el diagnóstico de CMT antes de la cirugía cuando los niveles basales de CT están sólo moderadamente elevados (menos de 100 pg/mL).

Para detectar enfermedad de células C en portadores *RET* positivos.

Para el control prequirúrgico de niños *RET* positivos.

Para el control postoperatorio de recurrencia de tumores.

Cuando la prueba genética no está fácilmente disponible.

cual puede no estar acompañada de una CT elevada en los primeros estadios de un CMT.

- Un aumento en los valores basales de CT por encima de 10 pg/mL (ng/L) sugiere un CMT en la etapa de microcarcinoma.
- Generalmente existe una correlación positiva entre valores de CT y masa tumoral.

(i) Prueba de estimulación con pentagastrina

La prueba de estimulación con Pg se ha utilizado ampliamente en el diagnóstico de CMT pero en muchos países no es muy accesible (359)(365). La misma consiste en una infusión endovenosa de Pg (0,5 µg/kg/peso corporal) efectuada durante unos 5 segundos. Esta administración "lenta" de Pg reduce los efectos secundarios transitorios (náuseas, vómitos, compresión subesternal, rubor, y hormigueo en las extremidades) y mejora la tolerancia del paciente a la prueba. Se toman muestras basales, y 1, 2, 5, y a veces 10 minutos después de iniciada la infusión.

La Tabla VIII muestra los resultados y la interpretación de los valores de CT estimulada con Pg. El pico de estimulación normalmente es inferior a 10 ng/L (pg/mL) en el 80% de adultos voluntarios sanos, e inferior a 30 ng/L (pg/mL) en el 95% de la población general. Los varones normales tienen valores más altos que las mujeres. Una prueba positiva [pico de CT supe-

Recomendación N° 52. Utilidad clínica de la determinación de CT para diagnóstico de CMT

- Los ensayos de CT son método-dependientes lo cual puede tener un impacto en la interpretación de los resultados de CT.
- En pacientes con enfermedades tiroideas autoinmunes (tiroiditis de Hashimoto o enfermedad de Graves) pueden observarse valores elevados de CT.
- El primer hallazgo histológico previo al desarrollo de un microcarcinoma es la hiperplasia de células C (HCC), la

Tabla VIII. Interpretación de la Prueba de Pentagastrina

CT ng/L (pg/mL)	Interpretación
Pico de calcitonina (CT) < 10	Normal (80% de los adultos)
Pico de CT >30 < 50	5% de los adultos normales
Pico de CT >50 < 100	Posible CMT u otras patologías tiroideas
Pico de CT > 100	Probable CMT
Valor de CT basal o posterior a la pentagastrina > 10 pg/mL	Patología de células C o tejido residual en pacientes con NEM2 y CMT postoperatorio

rior a 100 ng/L (pg/mL) ] sugiere CMT. En los pacientes que tienen la mutación familiar responsable de la NEM2, un pico entre 30 y 100 ng/L (pg/mL) es típicamente revelador de una HCC o de un microcarcinoma. Aunque se ha observado que un pico de CT inferior a 100 ng/L (pg/mL) puede darse en adultos con otras enfermedades tiroideas que no sean CMT (ver la Tabla IX), nunca se han observado tales resultados en niños menores de 12 años que no sean portadores de mutación RET (366). La ausencia de CT elevada en individuos jóvenes con mutación del RET no excluye la posibilidad de que el CMT se desarrolle posteriormente.

No se ha establecido la mejor edad para realizar la prueba de Pg en niños portadores de la mutación del RET para NEM2 ya que esta varía con el tipo de mutación y el tipo de NEM2 presentes en sus familias (367) (368). Por lo tanto, los portadores de la mutación con valores basales normales de CT deberían someterse a pruebas genéticas o de estimulación lo más pronto posible después del nacimiento para NEM2B, y a los 2 años de edad para NEM2A. Sin embargo, debería destacarse que normalmente se observan valores altos de CT en neonatos, seguidos de un descenso asociado a la edad, desde el nacimiento hasta el año, y aún no se dispone de datos sobre pruebas de estimulación para este grupo de edad (369). Esta prueba debería repetirse una vez al año como mínimo, hasta que de positiva, momento en el cual debería realizarse una tiroidectomía total. Pero dado el pronóstico del CMT, la baja tolerancia a la prueba con Pg, y las repercusiones psicológicas para la familia, algunos médicos prefieren no seguir este procedimiento y optan (como se prefiere actualmente) por realizar una tiroidectomía a todos los portadores de la mutación del RET entre los 4 y 5 años de edad.

(ii) Prueba de estimulación con calcio

Esta prueba consiste en administrar por vía endovenosa, durante 30 segundos, 2,5 mg/kg de gluconato de calcio. Se toman muestras para CT basal, y a 1, 2 y 5 minutos después de la inyección. Se sospecha hiperplasia de células C si la CT es mayor a 100 ng/L. En esta prueba no se han observado efectos adversos importantes, a excepción de una moderada y transitoria sensación de calor generalizado. Se ha informado que

la prueba de estimulación con calcio es menos sensible que la de Pg para el diagnóstico de CMT (370-372). Además, esta prueba no ha sido evaluada usando un ensayo inmunométrico específico para el monómero maduro de CT y, por lo tanto, debe ser reevaluada con los ensayos actuales. Se ha demostrado que la prueba de estimulación con Calcio combinado con Pg potencia la sensibilidad de la prueba con Pg sola (359), resultando así en el ensayo más sensible para medir la existencia de tejido de células C.

(e) CT basal y post estimulación en el seguimiento de pacientes después de la cirugía

Luego de la tiroidectomía, la CT sérica es el marcador tumoral aceptado para la detección de tejido tiroideo residual o de metástasis. Un valor de CT detectable, basal o post estimulación, indica la presencia de tejido tumoral (373) (374).

Recomendación N° 53. Seguimiento Postoperatorio del CMT

- La CT y el CEA deberían determinarse inmediatamente antes y 6 meses después de la cirugía del CMT. En algunos pacientes los niveles de CT disminuyen lentamente. La primera determinación de CT postoperatoria no debería realizarse antes de las 2 semanas.
- La presencia de tejido residual o la recurrencia del CMT sólo pueden descartarse si ambos niveles de CT, basal y post estímulo son indetectables.

Teniendo en cuenta las variaciones en la velocidad de desaparición de la CT sérica, la primera muestra control postoperatoria no debería tomarse, antes de las 2 semanas después de la cirugía (375). Cabe destacar que el antígeno carcinoembrionario (CEA) que se determina junto con la CT para detectar recurrencia, parece ser un marcador útil de desdiferenciación en el CMT y es indicativo de pobre pronóstico en el seguimiento.

(f) Niveles elevados de calcitonina en otras patologías además de CMT

Como se muestra en la Tabla IX, se han observado niveles elevados de calcitonina en otras patologías, además del CMT y de los tumores neuroendócrinos.



Tabla IX. Enfermedades que no son CMT con Niveles Elevados de Calcitonina

Tumores neuroendócrinos	Carcinoma pulmonar a células pequeñas, carcinoide bronquial e intestinal y todos los tumores neuroendócrinos
Hiperplasia benigna de células C (HCC)	Enfermedades tiroideas autoinmunes Cáncer diferenciado de tiroides
Otras enfermedades	Enfermedad renal Hipergastrinemia Hipercalcemia

En enfermedades tiroideas autoinmunes (tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves) se suele observar una mayor liberación de CT (376-378). Entre las enfermedades no tiroideas con elevado nivel de CT se incluyen insuficiencia renal severa, hipercalcemia e hipergastrinemia, enfermedades inflamatorias agudas de pulmón y otras formas locales o generales de sepsis (enfermedad de Biermer, trastornos iatrogénicos, etc.) (379-381).

Como en algunos casos los niveles elevados de CT fueron detectados por RIA policlonal, estos informes requieren confirmación con los ensayos actuales basados en anticuerpos monoclonales que son más específicos para CT madura. Estudios que utilizaron un antisuero específico contra ProCT, CT y CCP-1, junto con HPLC y filtración con gel, demostraron que los pacientes con un elevado nivel de CT asociado a enfermedad no tiroidea mostraban un notable aumento en sus niveles séricos de ProCT intacta y, en menor grado, de la forma no escindida, CT-CCP-1. Por lo general, dichos pacientes presentan niveles normales o ligeramente elevados de CT madura. Usando antisuero específico de epitopes y técnicas de aislamiento se ha podido demostrar que otros tumores que no son CMT pueden segregar grandes cantidades de CT madura y diversos precursores (382). Esto puede observarse en varios tumores neuroendócrinos, especialmente en el cáncer de pulmón de células pequeñas y en el carcinoide bronquial. Sin embargo, en estos pacientes, se observa sólo un ligero incremento, o ninguno, en los niveles de CT, después de la prueba de estimulación con Pg (383). La hiperplasia de células C se presenta en la tiroiditis linfocítica y en algunos pacientes con cáncer diferenciado de tiroides (384-386). Esta HCC puede ser responsable de valores ligeramente elevados de CT madura y de la respuesta aumentada de CT con la prueba de estimulación combinada o con de PG solamente.

2. Detección de cáncer medular de tiroides mediante la determinación de mutaciones en el proto-oncogen RET

Hasta 1987 el único método disponible para detectar sujetos de riesgo de CMT era realizar repetidas de-

terminaciones de CT estimulada en el grupo familiar de los pacientes afectados. La subsiguiente identificación del *locus* 10q11.2 responsable de la NEM2 en el cromosoma 10 hizo posible la detección de sujetos portadores a través del *screening* genético (378). Se ha establecido que diversos tipos de mutaciones en el cromosoma 10 pueden activar el Proto-oncogen RET responsable de la NEM2 (349)(350). Esto permite realizar un estudio sistemático del problema antes de que aparezcan los primeros signos biológicos. Actualmente, en muchos países desarrollados, los estudios genéticos constituyen la primera estrategia diagnóstica. Sin embargo, para una predicción efectiva de la enfermedad, es necesario que los resultados positivos del *screening* genético se complementen con un exhaustivo estudio de los miembros sanos y enfermos de la familia.

El RET es un gen de 21 exones que codifica para un receptor de membrana del tipo tirosina quinasa. Este receptor se caracteriza por una región cadherina similar en el dominio extracelular, una región rica en cisteína inmediatamente externa a la membrana y un dominio intracelular de tirosina quinasa. Como se muestra en la Figura 10, las mutaciones descritas hasta ahora en la NEM2 se hallan en los exones 8, 10, 11, 13, 14, 15 y 16 (368) (387-391).

(a) Screening genético para el diagnóstico de NEM2

La NEM2 es una enfermedad familiar autosómica dominante, causada por la activación de mutaciones en el proto-oncogen RET (349). Aproximadamente un 75% de todos los CMT son de origen esporádico y único. El 44% de dichos tumores presenta una mutación somática en el codón 918 (392). Se les debe realizar *screening* a todos los miembros colaterales de la familia, ancestros y descendientes del caso índice, así como a todos los descendientes de los miembros afectados El *screening* se basa en la identificación de la mutación genómica del proto-oncogen RET usando análisis de secuencia de DNA genómico del caso índice y en la búsqueda sistemática de esta mutación en todos los miembros de la familia potencialmente afectados (Figura 11) (393)(394).

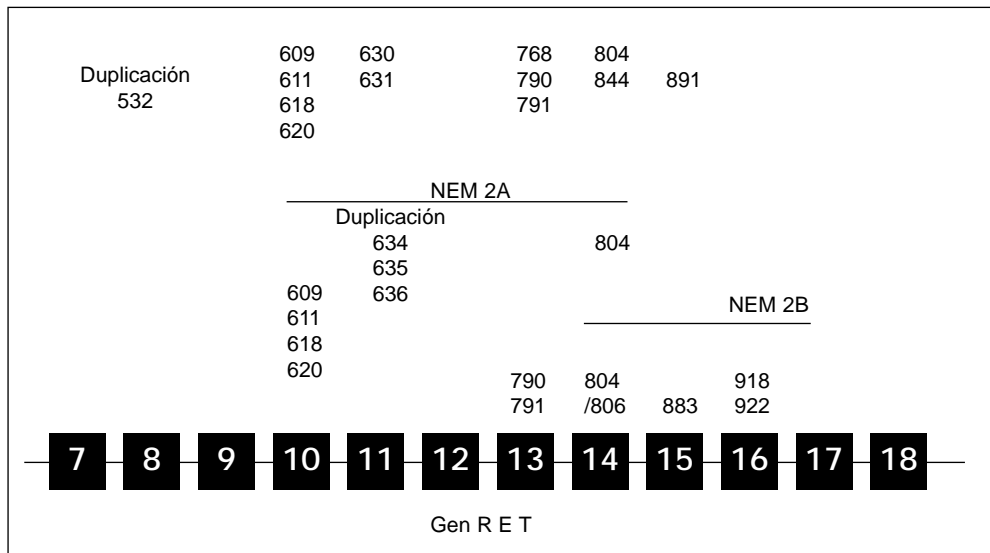


Figura 10. Mutaciones más frecuentes del proto-oncogen RET

Hasta ahora, cinco mutaciones de gen RET están presentes en el 97% de los casos de NEM2 (Figura 10). Las mutaciones responsables de la variedad NEM2A afectan principalmente al dominio extracelular rico en cisteína, resultando que cada una de estas mutaciones transforma una cisteína en otro aminoácido. Las principales mutaciones encontradas se ubican en los codones 609, 611, 618 y 620 del exón 10 y en el codón 634 del exón 11 (368) (378). El carcinoma medular de tiroides familiar (CMTF) está generalmente asociado a mutaciones en los codones descritos del exón 10, así como en los codones 768 y 804 de los exones 13 y 14 (368). La mayoría (87%) de las mutaciones en el codón 634 del exón 11 están asociadas a las manifestaciones en múltiples órganos de NEM2A (CMT, feocromocitoma e hiperparatiroidismo) (9) (378).

Los tumores asociados a NEM2B son causados por mutaciones en el dominio intracelular de tirosina quinasa 2 (TK2). La mayoría (97%) de los casos de NEM2B involucran al codón 918 en el exón 16, que provoca el cambio de una metionina por treonina, la cual se presenta con frecuencia en forma de nuevas mutaciones (*de novo*) de la línea germinal (395). El menor porcentaje (5%) de mutaciones de NEM2B afecta al codón 883 del exón 15 ó 922 del exón 16 (378) (394). Una correlación entre fenotipo y genotipo sugiere que en pacientes afectados por CMTF con mutaciones del RET que no afectan a las cisteínas, la enfermedad de células C aparece más tardíamente que en aquellos pacientes que padecen las mutaciones del RET clásicas del exón 10 (368) (396).

#### Recomendación N° 54. Riesgo genético de carcinoma medular de tiroides

- En NEM2, el porcentaje de miembros de la familia potencialmente afectados por la enfermedad es del 50%.
- Casi todos los pacientes portadores de mutaciones del RET desarrollarán CMT. (Nota: las mutaciones inactivantes del gen RET también causan la enfermedad de Hirschsprung.)
- Se encontró que el 5-10% de los CMT presenta mutaciones del RET de la línea germinal. Por lo tanto, el análisis del RET se justifica en todos los pacientes con CMT aparentemente esporádico.

Una vez identificada una mutación en una familia, se puede tener la certeza de que los miembros de dicha familia y sus descendientes que no presentan esa mutación se encuentran libres de la patología. Por el contrario, los sujetos portadores de la mutación padecen la patología y requerirán tratamiento quirúrgico para manejar o prevenir el desarrollo de la enfermedad (Figura 11). Si se identifica una mutación no genómica en el caso índice, como sucede en menos del 3% de las NEM2A y en el 5% de los CMTF, se puede predecir el nivel de riesgo para los miembros de la familia mediante el análisis de ligadura. Si la genealogía familiar no permite efectuar predicciones de este tipo, la enfermedad deberá detectarse repitiendo estudios clínicos y pruebas biológicas específicas a intervalos apropiados.

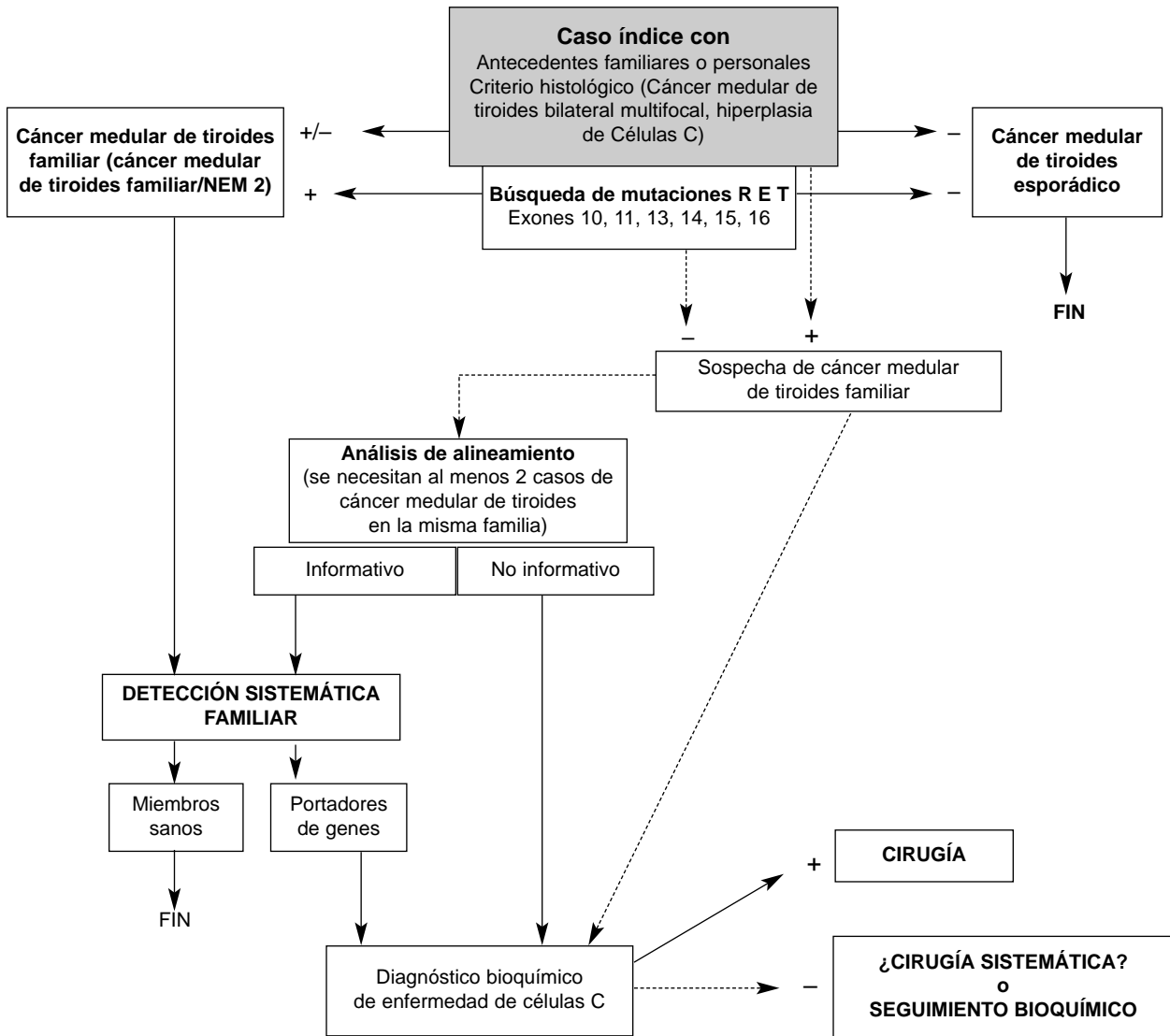


Figura 11. Algoritmo para el diagnóstico y tratamiento del CMT.

## Referencias bibliográficas

248. Marcocci C, Chiovato L. 2000. Thyroid -directed antibodies. *In*: BL. URD, editor. Thyroid. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000, p. 414-31.
249. Chiovato L, Bassi P, Santini F, Mammoli C, Lapi P, Carayon P, *et al*. Antibodies producing complement-mediated thyroid cytotoxicity in patients with atrophic or goitrous autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1700-5.
250. Guo J, Jaume JC, Rapoport B, McLachlan SM. Recombinant thyroid peroxidase-specific Fab converted to immunoglobulin G (IgG)molecules: evidence for thyroid cell damage by IgG1, but not IgG4, autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 925-31.
251. Doullay F, Ruf J, Codaccioni JL, Carayon P. Prevalence of autoantibodies to thyroperoxidase in patients with various thyroid and autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1991; 9: 237-44.
252. Radetti G, Persani L, Moroder W, Cortelazzi D, Gentili L, Beck-Peccoz P. Transplacental passage of anti-thyroid autoantibodies in a pregnant woman with auto-immune thyroid disease. *Prenatal Diagnosis* 1999; 19: 468-71.
253. Heithorn R, Hauffa BP, Reinwein D. Thyroid antibodies in children of mothers with autoimmune thyroid disorders. *Eur J Pediatr* 1999; 158: 24-8.
254. Feldt-Rasmussen U. Anti-thyroid peroxidase antibodies in thyroid disorders and non thyroid autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1991; 9: 245-51.
255. Mariotti S, Chiovato L, Franceschi C, Pinchera A. Thyroid autoimmunity and aging. *Exp Gerontol* 1999; 33: 535-41.

256. Ericsson UB, Christensen SB, Thorell JI. A high prevalence of thyroglobulin autoantibodies in adults with and without thyroid disease as measured with a sensitive solid-phase immunosorbent radioassay. *Clin Immunol Immunopathol* 1985; 37: 154-62.
257. Feldt-Rasmussen U, Hoier-Madsen M, Rasmussen NG, Hegedus L, Hornnes P. Anti-thyroid peroxidase antibodies during pregnancy and postpartum. Relation to postpartum thyroiditis. *Autoimmunity* 1990; 6: 211-4.
258. Premawardhana LD, Parkes AB, Ammari F, John R, Darke C, Adams H, *et al.* Postpartum thyroiditis and long-term thyroid status: prognostic influence of Thyroid Peroxidase Antibodies and ultrasound echogenicity. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 71-5.
259. Johnston AM, Eagles JM. Lithium-associated clinical hypothyroidism. Prevalence and risk factors. *Br J Psychiatry* 1999; 175: 336-9.
260. Bell TM, Bansal AS, Shorthouse C, Sandford N, Powell EE. Low titre autoantibodies predict autoimmune disease during interferon alpha treatment of chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 419-22.
261. Ward DL, Bing-You RG. Autoimmune thyroid dysfunction induced by interferon-alfa treatment for chronic hepatitis C: screening and monitoring recommendations. *Endocrinol Pract* 2001; 7: 52-8.
262. Carella C, Mazziotti G, Morisco F, Manganella G, Rtondi M, Tuccillo C, *et al.* Long-term outcome of interferon-alpha-induced thyroid autoimmunity and prognostic influence of thyroid autoantibody pattern at the end of treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1925-9.
263. Feldt-Rasmussen U, Schleusener H, Carayon P. Meta-analysis evaluation of the impact of thyrotropin receptor antibodies on long term remission after medical therapy of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 98-103.
264. Estienne V, Duthoit C, Di Costanzo, Lejeune PJ, Rtondi M, Kornfeld S *et al.* Multicenter study on TG-PO autoantibodies prevalence in various thyroid and non-thyroid diseases: relationships with thyroglobulin and thyroperoxidase autoantibody parameters. *Eur J Endocrinol* 1999; 14: 563-9.
265. Czarnocka B, Ruf J, Ferrand M, Carayon P, Lissitzky S, *et al.* Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett* 1985; 190: 147-52.
266. Mariotti S, Caturegli P, Piccolo P, Barbesino G, Pinchera A. Antithyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 661-9.
267. Rubello D, Pozzan GB, Casara D, Girelli ME, Boccatto s, Rigon F, *et al.* Natural course of subclinical hypothyroidism in Down's syndrome: prospective study results and therapeutic considerations. *J Endocrinol Invest* 1995; 18: 35-40.
268. Karlsson B, Gustafsson J, Hedov G, Ivarsson SA, Anneren G. Thyroid dysfunction in Down's syndrome: relation to age and thyroid autoimmunity. *Arch Dis Child* 1998; 79: 242-5.
269. Bussen S, Steck T, Dietl J. Increased prevalence of thyroid antibodies in euthyroid women with a history of recurrent in-vitro fertilization failure. *Hum Reprod* 2000; 15: 545-8.
270. Phan GQ, Attia P, Steinberg SM, White DE, Rosenberg SA. Factors associated with response to high-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3477-82.
271. Durelli L, Ferrero B, Oggero A, Verdun E, Ghezzi A, Montanari E, *et al.* Thyroid function and autoimmunity during interferon-Beta-1b Treatment: a Multi-center Prospective Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3525-32.
272. Roti E, Minelli R, Giuberti T, Marchelli C, Schianchi C, Gardini E, *et al.* Multiple changes in thyroid function in patients with chronic active HCV hepatitis treated with recombinant interferon-alpha. *Am J Med* 1996; 101: 482-7.
273. Ruf J, Carayon P, Lissitzky S. Various expression of a unique anti-human thyroglobulin antibody repertoire in normal state and autoimmune disease. *Eur J Immunol* 1985; 15: 268-72.
274. Ruf J, Toubert ME, Czarnocka B, Durand-Gorde JM, Ferrand M, Carayon P. Relationship between immunological structure and biochemical properties of human thyroid peroxidase. *Endocrinol* 1989; 125: 1211-8.
275. Feldt-Rasmussen U, Rasmussen AK. Serum thyroglobulin (Tg) in presence of thyroglobulin autoantibodies (TgAb). Clinical and methodological relevance of the interaction between Tg and TgAb in vivo and in vitro. *J Endocrinol Invest* 1985; 8: 571-6.
276. Spencer CA, Wang C, Fatemi S, Guttler RB, Takeuchi M, Kazarosyan M. Serum Thyroglobulin Autoantibodies: Prevalence, influence on serum thyroglobulin measurement and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1121-7.
277. Pacini F, Mariotti S, Formica N, Elisei R. Thyroid autoantibodies in thyroid cancer: Incidence and relationship with tumor outcome. *Acta Endocrinol* 1988; 119: 373-80.
278. Rubello D, Casara D, Girelli ME, Piccolo M, Busnardo B. Clinical meaning of circulating antithyroglobulin antibodies in differentiated thyroid cancer: a prospective study. *J Nucl Med* 1992; 33: 1478-80.
279. Nordyke RA, Gilbert FI, Miyamoto LA, Fleury KA. The superiority of antimicrosomal over antithyroglobulin antibodies for detecting Hashimoto's thyroiditis. *Arch Intern Med* 1993; 153: 862-5.

280. Di Cerbo A, Di Paola R, Menzaghi C, De Filippis V, Tahara K, Corda D, *et al.* Graves' immunoglobulins activate phospholipase A2 by recognizing specific epitopes on the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3283-92.
281. Kung AWC, Lau KS, Kohn LD. Epitope mapping of TSH Receptor-blocking antibodies in Graves' disease that appear during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3647-53.
282. Ueta Y, Fukui H, Murakami M, Yamanouchi Y, Yamamoto R, Murao A, *et al.* Development of primary hypothyroidism with the appearance of blocking-type antibody to thyrotropin receptor in Graves' disease in late pregnancy. *Thyroid* 1999; 9: 179-82.
283. Gupta MK. Thyrotropin-receptor antibodies in thyroid diseases: advances in detection techniques and clinical application. *Clin Chim Acta* 2000; 293: 1-29.
284. Kung AW, Lau KS, Kohn LD. Characterization of thyroid-stimulating blocking antibodies that appeared during transient hypothyroidism after radioactive iodine therapy. *Thyroid* 2000; 10: 909-17.
285. Filetti S, Foti D, Costante G and Rapoport B. Recombinant human thyrotropin (TSH) receptor in a radio-receptor assay for the measurement of TSH receptor antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 1096-101.
286. Adams DD, Purves HD. Abnormal responses in the assay of thyrotropin. *Proc Univ Otago Med Sch* 1956; 34: 11-2.
287. Morgenthaler NG. New assay systems for thyrotropin receptor antibodies. *Current Opinion Endocrinol Diabetes* 1998; 6: 251-60.
288. Kamijo K, Nagata A, Sato Y. Clinical significance of a sensitive assay for thyroid-stimulating antibodies in Graves' disease using polyethylene glycol at high concentration and porcine thyroid cells. *Endocrinol J* 1999; 46: 397-403.
289. Takasu N, Yamashiro K, Ochi Y, Sato Y, Nagata A, Komiyama I, *et al.* TSBAbs (TSH-Stimulation Blocking Antibody) and TSABs (Thyroid Stimulating Antibody) in TSBAbs-positive patients with hypothyroidism and Graves' patients with hyperthyroidism. *Horm Metab Res* 2001; 33: 232-7.
290. Costagliola S, Swillens S, Niccoli P, Dumont JE, Vassart G, Ludgate M. Binding assay for thyrotropin receptor autoantibodies using the recombinant receptor protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1540-4.
291. Morgenthaler NG, Hodak K, Seissler J, Steinbrenner H, Pampel I, Gupta M, *et al.* Direct binding of thyrotropin receptor autoantibody to in vitro translated thyrotropin receptor: a comparison to radioreceptor assay and thyroid stimulating bioassay. *Thyroid* 1999; 9: 466-75.
292. Akamizu T, Inoue D, Kosugi S, Kohn LD, Mori T. Further studies of amino acids (268-304) in thyrotropin (TSH)-lutropin/chorionic gonadotropin (LH/CG) receptor chimeras: Cysteine-301 is important in TSH binding and receptor tertiary structure. *Thyroid* 1994; 4: 43-8.
293. Grasso YZ, Kim MR, Faiman C, Kohn LD, Tahara K, Gupta MK. Epitope heterogeneity of thyrotropin-blocking antibodies in Graves' patients as detected with wild-type versus chimeric thyrotropin receptors. *Thyroid* 1999; 9: 521-37.
294. Kim WB, Chung HK, Lee HK, Kohn LD, Tahara K, Cho BY. Changes in epitopes for thyroid stimulation antibodies in Graves' disease sera during treatment of hyperthyroidism: Therapeutic implications. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1953-9.
295. Shewring G, Smith BR. An improved radioreceptor assay for TSH receptor. *Methods Enzymol* 1982; 17: 409-17.
296. Costagliola S, Morgenthaler NG, Hoermann R, Badenhop K, Struck J, Freitag D, *et al.* Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 90-7.
297. Schott M, Feldkamp J, Bathan C, Fritzen R, Scherbaum WA, Seissler J. Detecting TSH-Receptor antibodies with the recombinant TBII assay: Technical and Clinical evaluation 2000; 429-35.
298. Feldt-Rasmussen U. Analytical and clinical performance goals for testing autoantibodies to thyroperoxidase, thyroglobulin and thyrotropin receptor. *Clin Chem* 1996; 42: 160-3.
299. Giovanella L, Ceriani L, Garancini S. Clinical applications of the 2nd. generation assay for anti-TSH receptor antibodies in Graves' disease. Evaluation in patients with negative 1st. generation test. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 25-8.
300. Momotani N, Noh JY, Ishikawa N, Ito K. Effects of propylthiouracil and methimazole on fetal thyroid status in mothers with Graves' hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3633-6.
301. Brown RS, Bellisario RL, Botero D, Fournier L, Abrams CA, Cower ML *et al.* Incidence of transient congenital hypothyroidism due to maternal thyrotropin receptor-blocking antibodies in over one million babies. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1147-51.
302. Gerding MN, van der Meer Jolanda WC, Broenink M, Bakker O, W. WM and Prummel MF. Association of thyrotropin receptor antibodies with the clinical features of Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol* 2000; 52: 267-71.
303. Bartelena L, Marcocci C, Bogazzi F, Manetti L, Tanda ML, Dell'Unto E, *et al.* Relation between therapy for hyperthyroidism and the course of Graves' disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 73-8.
304. Bech K. Immunological aspects of Graves' disease and importance of thyroid stimulating immunoglobulins. *Acta Endocrinol (Copenh) Suppl* 1983; 103: 5-38.

305. Feldt-Rasmussen U. Serum thyroglobulin and thyroglobulin autoantibodies in thyroid diseases. Pathogenic and diagnostic aspects. *Allergy* 1983; 38: 369-87.
306. Nygaard B, Metcalfe RA, Phipps J, Weetman AP, Hegedus L. Graves' disease and thyroid-associated ophthalmopathy triggered by <sup>131</sup>I treatment of non-toxic goitre. *J Endocrinol Invest* 1999; 22: 481-5.
307. Ericsson UB, Tegler L, Lennquist S, Christensen SB, Stahl E and Thorell JI. Serum thyroglobulin in differentiated thyroid carcinoma. *Acta Chir Scand* 1984; 150: 367-75.
308. Haugen BR, Pacini F, Reiners C, Schlumberger M, Ladenson PW, Sherman SI, *et al.* A comparison of recombinant human thyrotropin and thyroid hormone withdrawal for the detection of thyroid remnant or cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3877-85.
309. Spencer CA, LoPresti JS, Fatemi S, Nicoloff JT. Detection of residual and recurrent differentiated thyroid carcinoma by serum Thyroglobulin measurement. *Thyroid* 1999; 9: 435-41.
310. Schlumberger M, C. P., Fragu P, Lumbroso J, Parmentier C, Tubiana M. Circulating thyrotropin and thyroid hormones in patients with metastases of differentiated thyroid carcinoma: relationship to serum thyrotropin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 513-9.
311. Pacini F, Fugazzola L, Lippi F, Ceccarelli C, Centoni R, Miccoli P, *et al.* Detection of thyroglobulin in fine needle aspirates of nonthyroidal neck masses: a clue to the diagnosis of metastatic differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 1401-4.
312. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M. Current Status and Performance Goals for Serum Thyroglobulin Assays. *Clin Chem* 1996; 42: 164-73.
313. Feldt-Rasmussen U, Schlumberger M. European interlaboratory comparison of serum thyroglobulin measurement. *J Endocrinol Invest* 1988; 11: 175-81.
314. Feldt-Rasmussen U, Profilis C, Colinet E, Black E, Bornet H, Bourdoux P *et al.* Human thyroglobulin reference material (CRM 457) 2nd part: Physicochemical characterization and certification. *Ann Biol Clin* 1996; 54: 343-8.
315. Schlumberger M J. Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma. *New Engl J Med* 1998; 338: 297-306.
316. Hjiyiannakis P, Mundy J, Harmer C. Thyroglobulin antibodies in differentiated thyroid cancer. *Clin Oncol* 1999; 11: 240-4.
317. Spencer CA. Recoveries cannot be used to authenticate thyroglobulin (Tg) measurements when sera contain Tg autoantibodies. *Clin Chem* 1996; 42: 661-3.
318. Massart C, Maugendre D. Importance of the detection method for thyroglobulin antibodies for the validity of thyroglobulin measurements in sera from patients with Graves' disease. *Clin Chem* 2002; 48: 102-7.
319. Mariotti S, Barbesino G, Caturegli P, Marino M, Manetti L, Pacini F, *et al.* Assay of thyroglobulin in serum with thyroglobulin autoantibodies: an unobtainable goal? *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 468-72.
320. Black EG, Hoffenberg R. Should one measure serum thyroglobulin in the presence of anti-thyroglobulin antibodies? *Clin Endocrinol* 1983; 19: 597-601.
321. Schneider AB, Pervos R. Radioimmunoassay of human thyroglobulin: effect of antithyroglobulin autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47: 126-37.
322. Spencer CA, Platler BW, Nicoloff JT. The effect of <sup>125</sup>I thyroglobulin tracer heterogeneity on serum Tg RIA measurement. *Clin Chim Acta* 1985; 153: 105-15.
323. Bugalho MJ, Domingues RS, Pinto AC, Garrao A, Catarino AL, Ferreira T, *et al.* Detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of individuals with and without thyroid glands: evidence for thyroglobulin expression by blood cells. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 409-13.
324. Bellantone R, Lombardi CP, Bossola M, Ferrante A, Princi P, Boscherini M, *et al.* Validity of thyroglobulin mRNA assay in peripheral blood of postoperative thyroid carcinoma patients in predicting tumor recurrence varies according to the histologic type: results of a prospective study. *Cancer* 2001; 92: 2273-9.
325. Bojunga J, Roddiger S, Stanisch M, Kusterer K, Kurek R, Renneberg H, *et al.* Molecular detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease by RT-PCR. *Br J Cancer* 2000; 82: 1650-5.
326. Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991; 338: 1227-9.
327. Luppi M, Morselli M, Bandieri E, Federico M, Marasca R, Barozzi P, *et al.* Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction of maspin gene. *Ann Oncol* 1996; 7: 619-24.
328. Ghossein RA, Bhattacharya S. Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1681-94.
329. Dittkoff BA, Marvin MR, Yemul S, Shi YJ, Chabot J, Feind C, *et al.* Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood. *Surgery* 1996; 120: 959-65.
330. Arturi F, Russo D, Giuffrida D, Ippolito A, Perrotti N, Vigneri R, *et al.* Early diagnosis by genetic analysis of differentiated thyroid cancer metastases in small lymph nodes. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1638-41.
331. Ringel MD, Balducci-Silano PL, Anderson JS, Spencer CA, Silverman J, Sparling YH, *et al.* Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of

- circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 84: 4037-42.
332. Biscolla RP, Cerutti JM and Maciel RM. 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. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3623-7.
333. Takano T, Miyauchi A, Yoshida H, Hasegawa Y, Kuma K and Amino N. Quantitative measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of patients after total thyroidectomy. *Br J Cancer* 2001; 85: 102-6.
334. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2617-21.
335. Premawardhana LDKE, Phillips DW, Prentice LM, Smith BR. Variability of serum thyroglobulin levels is determined by a major gene. *Clin Endocrinol* 1994; 41: 725-9.
336. Bertelsen JB, Hegedus L. Cigarette smoking and the thyroid. *Thyroid* 1994; 4: 327-31.
337. Knudsen N, Bulow I, Jorgensen T, Perrild H, Oversen L, Laurberg P. Serum Tg - a sensitive marker of thyroid abnormalities and iodine deficiency in epidemiological studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3599-603.
338. Van den Briel T, West CE, Hautvast JG, Vulsma T, de Vijlder JJ, Ategbo EA. Serum thyroglobulin and urinary iodine concentration are the most appropriate indicators of iodine status and thyroid function under conditions of increasing iodine supply in schoolchildren in Benin. *J Nutr* 2001; 131: 2701-6.
339. Gardner DF, Rothman J, Utiger RD. Serum thyroglobulin in normal subjects and patients with hyperthyroidism due to Graves' disease: effects of T<sub>3</sub>, iodide, <sup>131</sup>I and antithyroid drugs. *Clin Endocrinol* 1979; 11: 585-94.
340. Feldt-Rasmussen U, Petersen PH, Date J, Madsen CM. Serum thyroglobulin in patients undergoing subtotal thyroidectomy for toxic and nontoxic goiter. *J Endocrinol Invest* 1982; 5: 161-4.
341. Hocevar M, Auersperg M, Stanovnik L. The dynamics of serum thyroglobulin elimination from the body after thyroid surgery. *Endocrine Rev* 1997; 23: 208-10.
342. Cohen JH, Ingbar SH, Braverman LE. Thyrotoxicosis due to ingestion of excess thyroid hormone. *Endocrine Rev* 1989; 10: 113-24.
343. Mitchell ML, Hermos RJ. Measurement of thyroglobulin in newborn screening specimens from normal and hypothyroid infants. *Clin Endocrinol* 1995; 42: 523-7.
344. Smallridge RC, De Keyser FM, Van Herle AJ, Butkus NE, Wartofsky L. Thyroid iodine content and serum thyroglobulin: clues to the natural history of destruction-induced thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 1213-9.
345. Pacini F, Molinaro E, Lippi F, Castagna MG, Agate L, Ceccarelli C, *et al.* Prediction of disease status by recombinant human TSH-stimulated serum Tg in the postsurgical follow-up of differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5686-90.
346. Cobin RH. Medullary carcinoma of the thyroid. In: S. D. Cobin RH, editor. *Malignant tumors of the thyroid: clinical concepts and controversies*. New York: Springer-Verlag; 1992. p. 112-41.
347. Dunn JT. When is a thyroid nodule a sporadic medullary carcinoma? *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 824-5.
348. Pacini F, Fontanelli M, Fugazzola L, Elisei R, Romei C, Di Coscio G, *et al.* Routine measurement of serum calcitonin in nodular thyroid diseases allows the preoperative diagnosis of unsuspected sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 826-9.
349. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E *et al.* Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363: 458-60.
350. Hofstra RM, Landvaster RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, *et al.* A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 1994; 367: 375-6.
351. Heyningen van V. One gene-four syndromes. *Nature* 1994; 367: 319-20.
352. Becker KL, Nysten ES, Cohen R, Snider RH. Calcitonin: structure, molecular biology and actions. In: J.P. Belezianian, L.E. Raisz, G.A. Rodan eds. *Principle of bone biology*, San Diego: Academic Press; 1996. p. 471-4.
353. Motte P, Vauzelle P, Gardet P, Ghillani P, Caillou B, Parmentier C, *et al.* Construction and clinical validation of a sensitive and specific assay for mature calcitonin using monoclonal anti-peptide antibodies. *Clin Chim Acta* 1988; 174: 35-54.
354. Zink A, Blind E, Raue F. Determination of serum calcitonin by immunometric two-site assays in normal subjects and patients with medullary thyroid carcinoma. *Eur J Clin Chem Biochem* 1992; 30: 831-5.
355. Engelbach M, Gorges R, Forst T, Pflutzner A, Dawood R, Heerdt S, *et al.* Improved diagnostic methods in the follow-up of medullary thyroid carcinoma by highly specific calcitonin measurements. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1890-4.
356. Milhaud G, Tubiana M, Parmentier C and Coutris G. Epithelioma de la thyroïde secretant de la thyrocalcitonine. *C.R. Acad. Sci (serie D)*, Paris 1968; 266: 608-10.
357. Guilloteau D, Perdrisot D, Calmettes C, Baulieu JL, Lecomte P, Kaphan G, *et al.* Diagnosis of medullary

- carcinoma of the thyroid by calcitonin assay using monoclonal antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 1064-7.
358. Niccoli P, Wion-Barbot N, Caron P, Henry JF, de Micco C, Saint Andre, JP, *et al.* Interest of routine measurement of serum calcitonin (CT): study in a large series of thyroidectomized patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 338-41.
359. Wells SA, Baylin SB, Linehan W, Farrell RE, Cox EB, Cooper CW. Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. *Ann Surg* 1978; 188: 139-41.
360. Gagel RF. The abnormal pentagastrin test. *Clin Endocrinol* 1996; 44: 221-2.
361. Wion-Barbot N, Schuffenecker I, Niccoli P, Conte-Devolx B, Lecomte P, *et al.* Results of the calcitonin stimulation test in normal volunteers compared with genetically unaffected members of MEN 2A and familial medullary thyroid carcinoma families. *Ann Endocrinol* 1997; 58: 302-8.
362. Barbot N, Calmettes C, Schuffenecker I, Saint-Andre JP, Franc B, Rohmer V, *et al.* Pentagastrin stimulation test and early diagnosis of medullary carcinoma using an immunoradiometric assay of calcitonin: comparison with genetic screening in hereditary medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 114-20.
363. Erdogan MF, Gullu S, Baskal N, Uysal AR, Kamel N, Erdogan G. Omeprazole: calcitonin stimulation test for the diagnosis follow-up and family screening in medullary carcinoma of the thyroid gland. *Ann Surg* 1997; 188: 139-41.
364. Vieira AEF, Mello MP, Elias LLK. Molecular and biochemical screening for the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma in multiple endocrine neoplasia Type 2A. *Horm Metab Res* 2002; 34: 202-6.
365. Wells SA, Chi DD, Toshima K, Dehner LP, Coffin CM, Downton SB, *et al.* Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. *Ann Surg* 1994; 220: 237-50.
366. Telander RL, Moir CR. Medullary thyroid carcinoma in children. *Semin Pediatr Surg* 1994; 3: 188-93.
367. Niccoli-Sire P, Murat A, Baudin E, Henry JF, Proye C, Bigorgne JC, *et al.* Early or prophylactic thyroidectomy in MEN2/FMTC gene carriers: results in 71 thyroidectomized patients. *Eur J Endocrinol* 1999; 141: 468-74.
368. Niccoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Franc S, Chabrier G, Baldet L. Familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) with non-cysteine RET mutations: phenotype-genotype relationship in large series of patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3756-53.
369. Body JJ, Chanoine JP, Dumon JC, Delange F. Circulating calcitonin levels in healthy children and subjects with congenital hypothyroidism from birth to adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 565-7.
370. Gharib H, Kao PC, Heath H. Determination of silica-purified plasma calcitonin for the detection and management of medullary thyroid carcinoma: comparison of two provocative tests. *Mayo Clin Proc* 1987; 62: 373-8.
371. Telander R, Zimmerman D, Sizemore GW, van Heerden JA, Grant CS. Medullary carcinoma in children. Results of early detection and surgery. *Arch Surg* 1989; 124: 841-3.
372. Calmettes C, Ponder BA, Fisher JA, Raue F. Early diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome: consensus statement. European community concerted action: medullary thyroid carcinoma. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 755-60.
373. Modigliani E, Cohen R, Campos JM, Conte-Devolx B, Maes B, Boneu A, *et al.* Prognostic factors for survival and biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients. *Clin Endocrinol* 1998; 48: 265-73.
374. Machens A, Gimm O, Ukkat J, Hinze L, Schneyer U, Dralle H, *et al.* Improved prediction of calcitonin normalization in medullary thyroid carcinoma patients by quantitative lymph node analysis. *Cancer* 2000; 88: 1909-15.
375. Fugazzola L, Pinchera A, Lucchetti F, Iacconi P, Miccoli P, Puccini M, *et al.* Disappearance rate of serum calcitonin after total thyroidectomy for medullary thyroid carcinoma. *Internat J Biolog Markers* 1994; 9: 21-4.
376. Vierhapper H, Raber W, Bieglmayer C, Kasever K, Weinhausl A, Niederli B, *et al.* Routine measurement of plasma calcitonin in nodular thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1589-93.
377. Ferreira-Valbuena H, Fernandez de Arguello E, Campos G, Ryder E, Avellaneda A. Serum concentration of calcium and calcitonin in hyperthyroidism caused by Graves' disease. *Invest Clin* 1991; 32: 109-14.
378. Lips CJM, Hoppener JWM, Thijssen JHH. Medullary thyroid carcinoma: role of genetic testing and calcitonin measurement. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 168-79.
379. Niccoli P, Brunet Ph, Roubicek C, Roux F, Baudin E, Lejeune PJ, *et al.* Abnormal calcitonin basal levels and pentagastrin response in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis. *Eur J Endocrinol* 1995; 132: 75-81.
380. Snider RH, Nysten ES, Becker KL. Procalcitonin and its component peptides in systemic inflammation: immunochemical characterization. *J Invest Med* 1997; 47: 552-60.
381. Russwurm S, Wiederhold M, Oberhoffer M, Stonans I, Zipfel PF, Reinhart K. Molecular aspects and natural source of Procalcitonin. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 789-97.



382. Niccoli P, Conte-Devolx B, Lejeune PJ, Carayon P, Henry JF, Roux F, *et al.* Hypercalcitoninemia in conditions other than medullary cancers of the thyroid. *Ann Endocrinol* 1996; 57: 15-21.
383. Baudin E, Bidart JM, Rougier P, Lazar V, Ruffie P, Ropers J, *et al.* Screening for multiple endocrine neoplasia type 1 and hormonal production in apparently sporadic neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 69-75.
384. DeLellis RA. C-Cell hyperplasia. In: Rosai J., Carangiu M.L., DeLellis R.A. eds: Atlas of Tumor Pathology, 3rd. series, Fasc 5: tumors of the thyroid gland. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology; 1992. p. 247-58.
385. Guyétant S, Wion-Barbot N, Rousselet MC. C-cell hyperplasia associated with chronic lymphocytic thyroiditis: a retrospective study of 112 cases. *Hum Pathol* 1994; 25: 514-21.
386. Albores-Saavedra J, Monforte H, Nadji M, Morales AR. C-Cell hyperplasia in thyroid tissue adjacent to follicular cell tumor. *Hum Pathol* 1988; 19: 795-9.
387. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffenecker I, Zedenius J, Lips CJ, *et al.* Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the international RET mutation consortium. *J Intern Med* 1995; 238: 243-6.
388. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, *et al.* The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA* 1996; 276: 1575-9.
389. Ito S, Iwashita T, Asai N, Murakami H, Iwata Y, Sobue G, *et al.* Biological properties of RET with cysteine mutations correlate with multiple endocrine neoplasia type 2A, familial medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease phenotype. *Cancer Res* 1997; 57: 2870-2.
390. Heshmati HM, Gharib H, Khosla S, Abu-Lebdeh HS, Lindor NM, *et al.* Genetic testing in medullary thyroid carcinoma syndromes: mutation types and clinical significance. *Mayo Clin Proc* 1997; 72: 430-6.
391. Berndt I, Reuter M, Saller B, Frank-Rane K, Groth P, Grussendorf M, *et al.* A new hot spot for mutations in the RET proto-oncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 770-4.
392. Komminoth P, Roth J, Muletta-Feurer S, Saremaslani P, Seelentag WKF, Heitz PU. RET proto-oncogene point mutations in sporadic neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2041-6.
393. Conte-Devolx B, Schuffenecker I, Niccoli P, Maes B, Boneu A, Barbot N, *et al.* Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: Management of patients and subjects at risk. *Horm Res* 1997; 47: 221-6.
394. Smith DP, Houghton C, Ponder BA. Germline mutation of RET codon 883 in two cases of de novo MEN2B. *Oncogene* 1997; 15: 1213-7.
395. Carlson KM, Bracamontes J, Jackson CE, Clark R, Lacroix A, Wells SA Jr., *et al.* Parent-of-origin effects in multiple endocrine neoplasia type 2B. *J Hum Genet* 1994; 55: 1076-82.
396. Moers AMJ, Landsvater RM, Schaap C, van Veen JM, de Valk IAJ, Blijham GH, *et al.* Familial medullary thyroid carcinoma: not a distinct entity/ Genotype-phenotype correlation in a large family: familial medullary thyroid carcinoma revisited. *Am J Med* 1996; 101: 634-41.