

VALTER TADEU BOLDARINE

**APERFEIÇOAMENTO DO ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DO RNA
MENSAGEIRO DA TIROGLOBULINA POR RT-PCR EM TEMPO REAL NO
SEGUIMENTO DE PACIENTES COM CARCINOMA DIFERENCIADO DA
TIROIDE**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

VALTER TADEU BOLDARINE

APERFEIÇOAMENTO DO ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DO RNA
MENSAGEIRO DA TIROGLOBULINA POR RT-PCR EM TEMPO REAL NO
SEGUIMENTO DE PACIENTES COM CARCINOMA DIFERENCIADO DA
TIROIDE

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências

Orientador: Rui Monteiro de Barros Maciel
Co-orientadora: Rosa Paula Mello Biscolla
Coordenador do Programa: Sérgio Atala Dib

São Paulo
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Boldarine, Valter Tadeu

Aperfeiçoamento do ensaio de quantificação do RNA mensageiro da tiroglobulina por RT-PCR em tempo real no seguimento de pacientes com carcinoma diferenciado da tiroide São Paulo, 2009

p 48.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Endocrinologia

Título em inglês: Development of a sensitive and specific quantitative RT-PCR assay for blood thyroglobulin messenger RNA (TgmRNA) in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma

1. Tiroglobulina RNAm
2. PCR quantitativo
3. *Splicing* alternativo
4. Carcinoma diferenciado de tiroide

Banca Examinadora

1. Prof. Dr. Julio Abucham, Professor Associado, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Medicina, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo
2. Pedro Wesley Rosário, Médico-Doutor, Centro de Pesquisas da Santa Casa de Belo Horizonte
3. Ileana G. S. de Rubió, Pesquisadora-Doutora, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

Suplente: Profa. Dra. Miriam Oliveira Ribeiro, Professora Adjunta, Universidade Presbiteriana Mackenzie

Dedico esta tese de mestrado aos meus pais, que sempre me apoiaram e me deram forças para continuar, mesmo nos momentos mais difíceis.

A vocês, obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

Sendo sucinto e sincero, espero transmitir, por meio destes agradecimentos, meus sentimentos quanto ao processo desta dissertação de mestrado.

Agradeço ao Professor Dr. Rui Monteiro de Barros Maciel, meu orientador, que ao longo do tempo se tornou na verdade meu amigo, e sem o qual não estaria apresentando esta tese científica.

À minha co-orientadora Dra. Rosa Paula Biscolla, que confiou em minha capacidade e me convidou para realizar o presente trabalho sob sua co-orientação (sempre solícita), a todos que participaram de alguma forma deste trabalho, seja diretamente (Gustavo, Cléber, Cláudia(s), Dani, Conceição, Felipe e Teresa), seja indiretamente, através de conselhos (Dra. Janete, Dr. Gilberto), ou mesmo de dicas como aprimorar minhas técnicas (Gisele, Flávia, Rosana, Ilda), e também a todos os funcionários do Programa de Pós Graduação em Endocrinologia.

Agradeço também ao apoio e sempre boa vontade da Ângela. Faço uma menção especial a todos do ambulatório de Tiróide, por seus ensinamentos clínicos (pós-graduandos, residentes, chefes) e aos solícitos funcionários da Pós-Graduação. Agradeço também à Professora Dra. Miriam (minha professora da graduação que abriu meus olhos para o mundo da Endocrinologia Molecular).

Às minhas irmãs pelo apoio a todo o momento.

À Amanda, por estar sempre ao meu lado, mostrando muita paciência e disposição.

Aos pacientes, por consentirem em participar deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de Mestrado (processo nº05/55842-0) e pelo financiamento da pesquisa realizada (processo nº04/09934-7).

Obrigado

ÍNDICE

1 APRESENTAÇÃO	8
2 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	10
2.1 SÍNTESE E SECREÇÃO DE TIROGLOBULINA	11
2.2 SEGUIMENTO DE PACIENTES COM CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIROIDE	13
2.3 PAPEL DO RNA MENSAGEIRO COMO MARCADOR TUMORAL	15
2.4 OBJETIVOS	19
3 ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	20
“DEVELOPMENT OF A SENSITIVE AND SPECIFIC QUANTITATIVE RT-PCR ASSAY FOR BLOOD THYROGLOBULIN MESSENGER RNA (TgmRNA) IN THE FOLLOW-UP OF PATIENTS WITH DIFFERENTIATED THYROID CARCINOMA”	
4 CONCLUSÕES	42
5 REFERÊNCIAS	44

1-APRESENTAÇÃO

1. APRESENTAÇÃO

Nesta tese de mestrado apresentamos, de acordo com as recomendações do Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, um trabalho completo em inglês intitulado “Development of a sensitive and specific quantitative RT-PCR assay for blood thyroglobulin messenger RNA (TgmRNA) in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma”, de autoria de Valter T. Boldarine, Gustavo S. Guimarães, Claudia C. D. Nakabashi, Cleber P. Camacho, Danielle M. Andreoni, Maria da Conceição O. C. Mamone, Elza S. Ikejiri, Teresa S. Kasamatsu, Felipe Crispim, Flavio C. Hojaij, Rui M. B. Maciel e Rosa P. M. Biscolla.

A idéia deste trabalho derivou-se de interesse antigo do grupo de tiroide da Disciplina de Endocrinologia, que é o seguimento dos pacientes portadores de câncer diferenciado da tiroide por meio de marcadores sensíveis e específicos, especialmente a tiroglobulina (1-13).

Além do trabalho apresentado nesta tese, durante o Mestrado participei de outras publicações que contribuíram para meu aprendizado e formação. São elas:

1. Vieira TC, Boldarine VT, Abucham J. Molecular analysis of PROP1, PIT1, HESX1, LHX3, and LHX4 shows high frequency of PROP1 mutations in patients with familial forms of combined pituitary hormone deficiency. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia** 2007; 51: 1097-1103
2. Ramos HE, Nesi-França S, Boldarine VT, Pereira RM, Chiamolera MI, Graf H, de Lacerda L, Carvalho GA, Maciel RMB. Clinical and Molecular Analysis of Thyroid Hypoplasia: A Population-based Approach in Southern Brazil". **Thyroid** 2009; 19:61-68
3. Ramos HE, Boldarine VT, Nesi-França S, Camacho CP, Guimarães GS, Dias da Silva MR, Graf H, de Lacerda L, Carvalho GA, Maciel RMB. NKX2.5 missense mutations are associated with thyroid ectopy: a study of 157 patients with thyroid dysgenesis. Submetido ao **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**

2-INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

2.1. SÍNTESE E SECREÇÃO DE TIROGLOBULINA

A tiroglobulina (Tg) é uma proteína de 660 kDa secretada pelo tirócito no lúmen folicular e corresponde a 70-80% do conteúdo protéico da glândula. É codificada por um gene de cerca de 300 kb (48 exons localizados no cromossomo 8), sintetizada no retículo endoplasmático e exportada para o lúmen folicular. O principal papel da Tg é funcionar como um suporte para a síntese dos hormônios tiroídianos (T3 e T4) e, também, como um reservatório intra-tiroídiano de T3, T4 e iodo. Assim, quando o organismo necessita de T4 e T3, a Tg do lúmen folicular, sob estímulo do TSH, é captada pelos tirócitos, digerida nos lisossomos, com consequente liberação do T4 e T3 na corrente sanguínea (Figura 1). A Tg é uma proteína de quase 3000 aminoácidos com 66 resíduos tirosina, dimerizada e glicada no retículo endoplasmático do tirócito, fatores necessários à sua funcionalidade; quando madura migra para a região apical do tirócito em pequenas vesículas que a secretam no lúmen folicular. Para a síntese de T3 e T4 é necessário que o iodeto acople-se a radicais tirosil da molécula de Tg. Para tal, o iodeto deve ser oxidado e para isso requer a presença de H_2O_2 , reação catalizada pela peroxidase tiroídiana (TPO), glicoproteína com 933 aminoácidos e 103 kDa que contém um grupo prostético heme, localizada na membrana apical do tirócito com seu domínio catalítico voltado para o coloide. Sua expressão é também controlada pelo TSH. Além de catalizar a oxidação do iodeto, a TPO é essencial para a incorporação do iodeto nos resíduos tirosil da molécula de Tg, reação denominada organificação, com a formação da monoiodo-tirosina (MIT). O MIT, ainda ligado à TPO, pode sofrer nova oxidação e reagir com outro radical de iodeto, produzindo a diiodotirosina (DIT). Além disso, a TPO atua no acoplamento das iodotirosinas (MIT e DIT) para a formação do T4 e do T3 (Figura 1). H_2O_2 é um fator essencial e limitante na oxidação do iodeto, para sua organificação e para a reação de acoplamento de MIT e DIT; para que a reação se processe, além de H_2O_2 , é necessária a oxidação de NADPH por NADPH-oxidases que na tiroide receberam o nome de THOX1 e THOX2, de oxidases da tiroide (do inglês “thyroid-oxidases”). Apresentam-se como proteínas transmembrana, com sítios para ligação NADPH, FAD e cálcio, o que indica que a ativação do sistema H_2O_2 é dependente deste íon, estimulada tanto pela via do AMP cíclico, como por fosfatidil-inositol e inibida por concentrações elevadas de iodeto (Figura 1) (23). Uma pequena quantidade de Tg escapa dos mecanismos de digestão lisossomal e é secretada

intacta na corrente sanguínea. É esta tiroglobulina sérica (sTg) que é utilizada como marcador tumoral no seguimento dos pacientes com câncer diferenciado da tireoide (CDT).

Esta proteína é formada por duas subunidades idênticas, unidas por ligações químicas fracas e pode apresentar-se de forma heterogênea em decorrência do processo de “splicing” alternativo de seu RNA mensageiro (mRNA) (24-26).

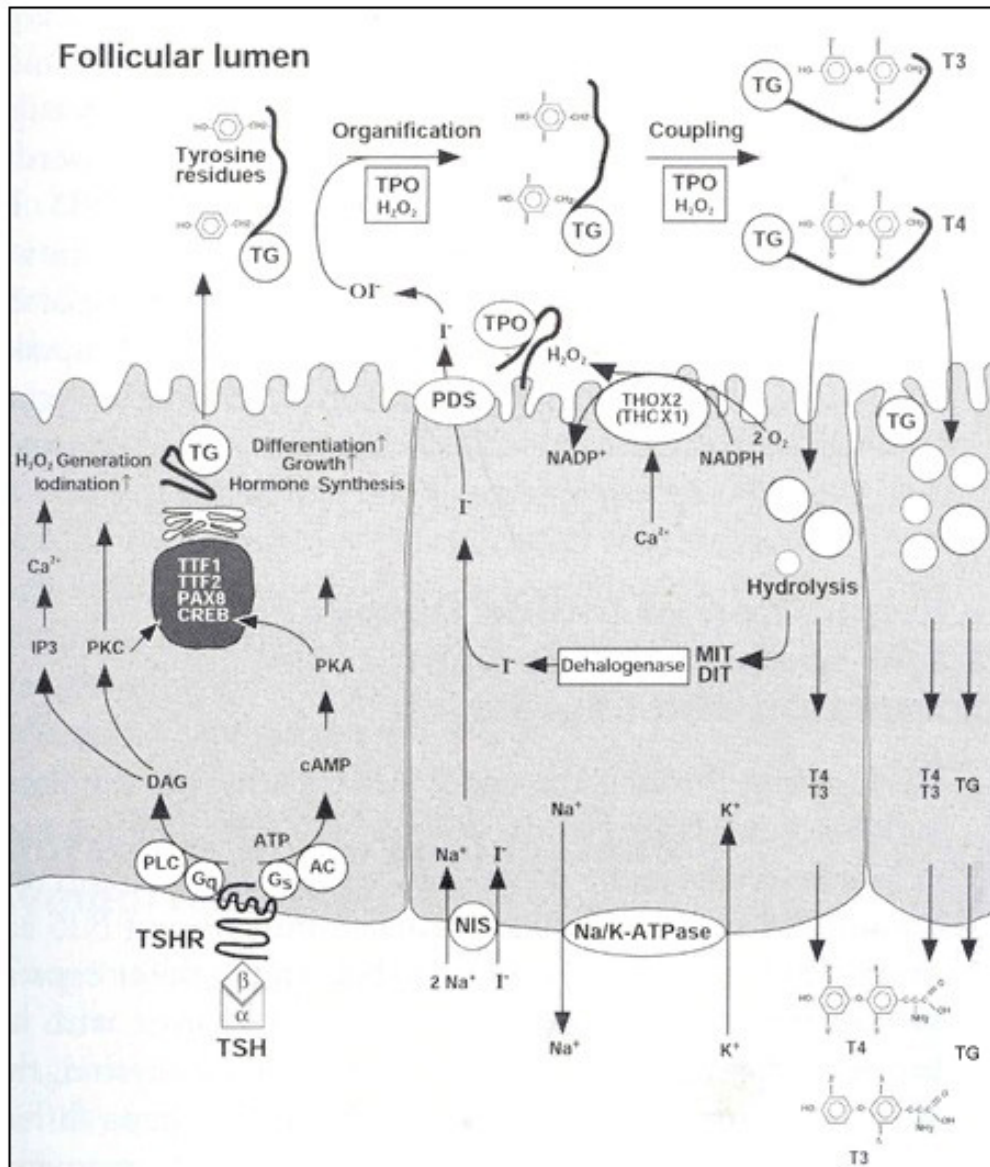


Figura 1. Esquema da síntese e secreção dos hormônios tireoidianos e das vias de sinalização nos tirócitos. AC: adenilciclase; cAMP: AMP cíclico; DAG: diacilglicerol; DIT: monoiodotirosina; NIS: simportador sódio-potássio; PDS: peroxidase tireoideana; PKA: proteínaquinase A; PKC: proteínaquinase C; PLC: fosfolipase C; IP3: fosfoinositol 3; TG: tiroglobulina; TPO: peroxidase tireoideana; TSH: tirotrofina; TSHR: receptor do TSH (reproduzida a partir da referência 1 modificada)

2.2. SEGUIMENTO DE PACIENTES COM CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIROIDE

Os carcinomas diferenciados da tiroide (CDT), tanto do tipo papilífero (PTC, do inglês “papillary thyroid carcinoma”), quanto do folicular (FTC, do inglês “follicular thyroid carcinoma”), estão entre as neoplasias endócrinas mais comuns, porém com maior índice de cura. Os pacientes apresentam sobrevida de aproximadamente 95% para o PTC e de 70% a 80% para o FTC (14). Porém, pode haver recorrência tumoral, ou mesmo morte decorrente do CDT e o prognóstico depende de fatores relacionados ao paciente, ao tratamento e à própria doença, sejam estes de origem genética, ambiental ou mesmo dependentes da interação entre ambos (14-16).

A conduta recomendada pelas diversas diretrizes emanadas pelas sociedades nacionais e internacionais de tiroide diante de um paciente com CDT é a tireoidectomia total complementada pela ablação do tecido remanescente com iodo radioativo (16-19). Nesta situação, o paciente não deve apresentar sTg circulante, pois a tiroide é sua única fonte de produção. Assim, depois do tratamento, concentrações detectáveis de sTg podem indicar a persistência ou, até mesmo, a recorrência da doença, o que pode ocorrer décadas após o diagnóstico inicial e justifica o seguimento permanente dos pacientes (14-16).

Para este seguimento, as diretrizes internacionais recomendam que o método mais sensível para avaliar a recorrência do tumor é a dosagem da sTg, em associação com a realização de ultrassonografia da região cervical (USC); hoje em dia não se recomenda mais a realização rotineira da pesquisa de metástases com o emprego do iodo radioativo (PCI), especialmente nos pacientes que não apresentem anticorpos anti-tiroglobulina circulantes (15-21,27,28).

Apesar de sua grande utilidade no seguimento do câncer de tiroide, a dosagem de sTg não é, no entanto, tecnicamente simples. Várias limitações tornaram-se evidentes, desde a descrição dos primeiros métodos radioimunológicos, apesar de seu uso ter comprovado a utilidade prática potencialmente esperada (21,23,27,28). Algumas das limitações técnicas foram, pelo menos teoricamente, contornadas com a adoção, em rotina, dos métodos imunométricos (21,23). No entanto, uma série de problemas podem interferir na determinação, a saber:

- a) sensibilidade funcional inadequada numa série de métodos disponíveis comercialmente, o que limita a detecção de pequenas massas de tecido tiroidiano, especialmente quando o TSH está suprimido;
- b) falta de padrão internacional, o que determina grande variabilidade entre os diversos métodos disponíveis;

- c) variação inter-ensaio acima do desejável, em especial, se levarmos em consideração o intervalo de tempo, entre a coleta de amostras, utilizado habitualmente para o seguimento dos pacientes com carcinoma diferenciado (6 a 12 meses);
- d) possibilidade de efeito "gancho", especialmente, em ensaios imunométricos, o que causa a obtenção de valores inapropriadamente baixos em pacientes com concentrações de Tg especialmente elevadas;
- e) presença de anticorpos endógenos anti-Tg no soro de 13 a 23% dos pacientes com CDT, o que pode determinar resultados falsamente baixos nos ensaios imunométricos e falsamente elevados nos radioimunoensaios (21).

Tendo em vista estas limitações, desenvolvemos em nosso laboratório uma série de alternativas para a resolução destes problemas. Assim, nosso ensaio é um método imunoradiométrico sensível, que permite a detecção segura de valores de 1 ng/mL. Além disso, introduzimos um protocolo de arquivo de amostras: assim, estas são guardadas congeladas por um prazo mínimo de 1 ano e quando da colheita de nova amostra, processamos a antiga em paralelo, diminuindo, desta maneira, a variação inter-ensaio. Fazemos sempre a pesquisa de anticorpos anti-Tg, o que evita a presença de falso-negativos, como já mencionado. Também executamos sempre os ensaios em duas etapas, com o intuito de evitar o efeito "gancho" (21,23,27,28).

Além disso, é esperado que o nível da sTg varie de acordo com a concentração de TSH. Assim, trabalhos evidenciaram sensibilidade maior para detecção de sTg em vigência de níveis de TSH elevado (obtido por meio da suspensão do L-T4 e consequente hipotireoidismo ou após estímulo com TSH recombinante - rhTSH)), do que com o TSH suprimido durante a terapia com L-T4 (17-19).

Desta forma, apesar da sTg ser bastante útil no seguimento pós-operatório de pacientes com CDT, podem ocorrer resultados falso-negativos (sTg indetectável na persistência ou recorrência tumoral), que se explicam por diversas razões, como: a) menor sensibilidade do exame durante a terapia supressora de TSH; b) interferência do anticorpo anti-Tg; c) desdiferenciação tumoral, que secretaria Tg não reconhecida pelo ensaio. Estes fatores justificam a busca de alternativas à dosagem de sTg para o acompanhamento de pacientes com CDT, como por exemplo a quantificação do RNA mensageiro da tiroglobulina (TgmRNA).

2.3. PAPEL DO RNA MENSAGEIRO COMO MARCADOR TUMORAL

O conceito de detecção molecular de células tumorais na corrente sanguínea foi descrito no início da década de 90 para tumores sólidos, como carcinoma de próstata, neuroblastoma e carcinoma de mama (29-31).

O primeiro estudo de TgmRNA data de 1996, quando Ditzhoff e cols. (32) detectaram por meio de RT-PCR o TgmRNA em 9 pacientes com doença metastática e em menos de 10% dos pacientes sem metastase. Ainda nesse grupo, a detecção do TgmRNA foi mais frequente naqueles pacientes com história prévia de metástases. Controles normais e com doenças benignas não amplificaram o TgmRNA. A partir destes resultados concluiu-se que a presença na circulação sanguínea do TgmRNA poderia representar tumores disseminados pela via hematogênica.

Seguindo essa idéia, outro trabalho conseguiu detectar o TgmRNA, além do mRNA da TPO (TPO mRNA) em 54,2% dos indivíduos em seguimento de CDT, incluindo 5 pacientes de um grupo de 8 que não apresentavam evidência de doença no momento do exame (33). Os autores, entretanto, não conseguiram explicar a detecção de TgmRNAs e TPO mRNA em 10% dos pacientes com doença tireoidiana benigna, que desaparecia no pós-operatório, o que demonstrava que a presença no sangue de mRNA específico da tireóide não está necessariamente relacionada com metastase.

O próximo trabalho nessa linha de pesquisa, publicado em 1998, foi um dos mais bem-sucedidos até então. Ringel e cols. (34) detectaram TgmRNA em 26 de 33 pacientes (79%) com remanescente em leito tireoidiano ou doença metastática confirmada por PCI, num grupo de 87 pacientes com CDT, enquanto que sTg foi encontrada em apenas 12 destes pacientes (com TSH suprimido). Porém, apesar de terem obtido uma sensibilidade consideravelmente alta, a especificidade foi inferior. Este mesmo grupo desenvolveu um método de RT-PCR quantitativo (35) e amplificou o TgmRNA em todos os 32 voluntários normais. A partir daí aplicaram o método em 107 pacientes com CDT e verificaram o achado de TgmRNA em 38% dos pacientes sem captação anormal de iodo na PCI, 75% daqueles com captação em leito tireoidiano, 84% com doença cervical e 94% com metastase à distância (36).

Em nosso laboratório desenvolvemos há alguns anos a amplificação do TgmRNA em associação com o mRNA do transportador sódio-iodeto (NIS) (5). O interesse maior no estudo do NIS como marcador tumoral era avaliar se havia correlação entre sua expressão e a captação de iodo, na tentativa de explicar a discordância entre sTg e PCI encontrada em alguns pacientes; sua amplificação, por "nested PCR", entretanto, mostrou baixa eficácia (sensibilidade de 16,6% e especificidade de 54%), não demonstrando tal correlação. A baixa especificidade pode ser

explicada, pelo menos em parte, pela expressão do NIS em tecidos não tiroidianos. No mesmo estudo, a sensibilidade e especificidade do TgmRNA, entretanto, foram bastante aceitáveis, de 83% e 71%, respectivamente, em comparação com a sTg, de 50% e 89%.

Outro ponto importante é o fato de que a avaliação do TgmRNA por RT-PCR quantitativo em crianças com doença de tiróide benigna e maligna não mostrou diferença significativa entre os dois grupos (37), sendo que por esse motivo, apesar de alguns resultados iniciais promissores, pairaram dúvidas sobre o verdadeiro valor e eficácia da detecção do TgmRNA no seguimento do CDT, pois vários pacientes em aparente remissão clínica apresentavam TgmRNA circulante detectável (falso-positivos), enquanto que outros pacientes sabidamente com metástases apresentavam TgmRNA indetectável (falso-negativos).

Outro grupo desenvolveu um teste para determinação de TgmRNA empregando um RT-PCR semiquantitativo com variação do número de ciclos (32 a 36) na reação, mas não houve diferença significativa de expressão entre os indivíduos normais e os pacientes submetidos a tiroidectomia por outra doença que não CDT; entretanto, neste estudo os pacientes não foram avaliados com PCI para avaliar possíveis remanescentes tiroidianos pós-operatórios (38).

Em outro estudo por RT-PCR quantitativo, utilizando 57 pacientes tiroidectomizados, também não se encontrou diferença de expressão do TgmRNA entre pacientes com e sem metástases. Entretanto, a metodologia foi diferente, pois não se realizou tratamento com DNase (para prevenir a amplificação de DNA genômico) e a padronização da curva de concentração foi feita com GAPDH, e não mRNA de tiroide (39).

O que se pode concluir da apresentação destes trabalhos é que há realmente uma variedade enorme de protocolos utilizados, em diversos níveis, como por exemplo, processamento da amostra de sangue (variação quanto ao tipo de tubo em que a amostra é coletada, volume do sangue utilizado, separação de camadas celulares por gradiente ou utilização de sangue total, tipo de kit de extração de RNA e tratamento ou não do RNA com DNase). Como exemplo podemos citar o trabalho de Ezlinger e cols. (40), que compararam a eficácia de extração de vários métodos e concluíram que a utilização de tubos com citrato com subsequente separação da camada mononuclear e extração imediata garantem um melhor resultado, embora essa metodologia não fora comparada com um dos métodos mais utilizados (amostras de sangue adicionadas diretamente em tubos estéreis contendo substâncias estabilizadoras de RNA).

Outras divergências encontradas entre os trabalhos também dizem respeito à metodologia do RT-PCR, onde não se seguiu uma padronização quanto à quantidade de RNA total utilizada para a síntese de cDNA, quantidade de cDNA empregada para a realização da PCR, seqüência de oligonucleotídeos escolhida (residindo aqui a maior controvérsia entre os autores), tipo de

amplificação (se quantitativa, qualitativa ou semi-quantitativa) e também número de ciclos utilizados. Com relação a este último aspecto, o estudo de Bojunga e cols. (41) observa incremento da sensibilidade com o aumento de ciclos, porém com perda na especificidade, com a detecção de TgmRNA em diversos tecidos, como timo, pulmão, entre outros, evidenciando o fenômeno conhecido como transcrição ilegítima.

Outros autores buscaram correlacionar o mRNA de mais de um gene. Assim, Gupta e cols. (42), estudando a especificidade de “primers” em amplificar, além do TgmRNA, o mRNA do receptor de TSH (TSH-R mRNA) em sangue de indivíduos normais e de pacientes com câncer de tireoide, concluíram que é provável que o processamento pós-transcricional (“splicings”) seja diferente entre as células da tireoide e outras e que a seleção do “primer” possa determinar maior especificidade ao método. Ainda com relação a esse assunto, o “splicing” alternativo pode afetar não somente a especificidade, mas também a sensibilidade, pois se o “primer” for direcionado para áreas sabidamente de risco de “splicing”, aumentará a probabilidade de resultados falso-negativos, como demonstrado por Savagner e cols. (43). Neste estudo cerca de 33% dos pacientes apresentavam “splicing” alternativo.

Apesar da possibilidade de baixa especificidade por transcrição ilegítima da Tg por células não tiroidianas, ainda não se pode afastar a hipótese de alta sensibilidade do método, diagnosticando precocemente possíveis recidivas. No trabalho de Grammatopoulos e cols. (44), por exemplo, a determinação de TgmRNA correlacionou-se melhor com as metástases identificadas por PCI do que a dosagem de sTg.

Por fim, Fugazzola e cols. estudaram 36 pacientes com CDT em aparente remissão e com anticorpo anti-Tg negativo (45). A sTg foi dosada por dois métodos com sensibilidade de 0,9 ug/L e 0,1 ug/L, além do TgmRNA, antes e após a administração de TSH recombinante, e então avaliado o grau de concordância entre estes exames e a avaliação clínica (USG cervical, PCI, etc). A Tg com sensibilidade de 0,9 ug/L apresentou concordância de 53% no basal e 55% após estimulação do TSH. Os resultados da quantificação do RNA foram concordantes com a avaliação clínica em 66% no basal e pós-estimulação. Neste estudo, as condições de RT-PCR foram otimizadas para evitar expressão extra-tiroidiana e nestas condições, não foi observada amplificação de Tg RNAm em pacientes com agenesia tiroidiana, sendo que desta forma, o emprego de uma metodologia que diminua o risco de interferência da expressão extra-tiroidiana talvez possa ser útil.

Tendo em vista estas discrepâncias metodológicas resolvemos estabelecer um novo método para a determinação do TgmRNA, utilizando as recomendações sugeridas por M. D. Ringel em editorial publicado no Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (46), ou seja: a) construir “primers” em áreas livres de “splicings”; b) tratar as amostras de sangue de modo a evitar qualquer tipo de contaminação com DNA; c) quantificar o ensaio de TgmRNA e estabelecer a curva-padrão; d) validar o ensaio com um grande número de amostras de pacientes com história clínica muito bem definida.

2.3. OBJETIVOS

1. Aperfeiçoar o método quantitativo para a medida do TgmRNA a partir do sangue periférico
2. Validar o ensaio em pacientes com Carcinoma Diferenciado de Tiróide

3 – “DEVELOPMENT OF A SENSITIVE AND SPECIFIC QUANTITATIVE RT-PCR ASSAY FOR BLOOD THYROGLOBULIN MESSENGER RNA (TgmRNA) IN THE FOLLOW-UP OF PATIENTS WITH DIFFERENTIATED THYROID CARCINOMA”

3 – DEVELOPMENT OF A SENSITIVE AND SPECIFIC QUANTITATIVE RT-PCR ASSAY FOR BLOOD THYROGLOBULIN MESSENGER RNA (TgmRNA) IN THE FOLLOW-UP OF PATIENTS WITH DIFFERENTIATED THYROID CARCINOMA

Valter T. Boldarine, Gustavo S. Guimarães, Claudia C. D. Nakabashi, Cleber P. Camacho, Danielle M. Andreoni, Maria da Conceição O. C. Mamone, Elza S. Ikejiri, Teresa S. Kasamatsu, Felipe Crispim, Flavio C. Hojaij, Rui M. B. Maciel, and Rosa P. M. Biscolla

Laboratory of Molecular Endocrinology, Division of Endocrinology, Department of Medicine, Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Key words: Thyroglobulin mRNA, Real Time quantitative RT-PCR, thyroid cancer

Correspondence to:

Rosa Paula M. Biscolla, MD, PhD

Laboratory of Molecular Endocrinology

Division of Endocrinology, Department of Medicine

Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo

Rua Pedro de Toledo 781, 12nd. Floor

04039-032 Sao Paulo, SP, Brazil

Phone: +55-11-5084-5231 Fax: +55-11-5084-5231

e-mail: rosapaula@uol.com.br

ABSTRACT

The measurement of serum thyroglobulin (sTg) has been considered the most sensitive tumor marker in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma (DTC) after total thyroidectomy and radioiodine therapy. However, sTg assays present some technical problems, specially, the interference by endogenous anti-thyroglobulin antibodies (TgAb), present in approximately 20% of DTC patients' sera. Therefore, in order to enhance sensitivity and to hinder the interference by TgAb, several investigators have tried to quantify the mRNA Tg by Real-Time RT-PCR. However, the results have been variable and some of them did not report a correlation between mRNA Tg measurement and presence of metastases.

The aim of this study was to evaluate TgmRNA expression, performed by a new sensitive and specific Real-Time PCR, in peripheral blood of 104 patients who previously undergone total thyroidectomy and radioiodine treatment. DTC patients were studied during L-T₄ therapy. Eighty-two patients out of 104 (78.8%) were considered “free of disease”, and 22 (21.2%) presented metastases. The quantification of mRNA was significantly different between patients “free of disease” and those with metastases: TgmRNA (90.1 vs 951.3 ug/uL) ($P<0,0001$). In conclusion, the differences proposed in the TgmRNA quantification made it a reliable method, and allowed us to differentiate patients free of disease from patients with metastases and thus could be an appropriate molecular marker in the follow-up of patients with thyroid carcinoma, especially in patients with positive TgAb.

INTRODUCTION

Measurement of serum thyroglobulin (sTg) is considered the most sensitive tumor marker to discover residual, recurring, or metastatic disease in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma (DTC) after total thyroidectomy and ablative radioiodine therapy. sTg measurement in hypothyroidism or after recombinant human TSH (rhTSH), in association with neck ultrasound (US), is the current recommended guideline to follow-up these patients (1-3). However, the low sensitivity of sTg during thyroid hormone suppression therapy, as well as an interference on its measurement caused by endogenous anti-thyroglobulin antibodies (TgAb), present in approximately 15-20% of DTC patients' sera, reduces its clinical utility (4).

Therefore, in order to enhance sensitivity and to hinder the interference by TgAb, several authors have developed qualitative RT-PCR assays to amplify Tg messenger RNA (TgmRNA) present in circulating thyroid cells from patients with DTC (5-13). The outcome of these studies has been variable, with some groups showing correlation between the presence of metastases and the detection of TgmRNA (5-8,11,13), whereas others have not demonstrated such correlation (9,10,12). The reasons to explain such discrepancies amongst those studies are most likely related to methodological aspects, as: a) different methods of standardization; b) use of primers including Tg splice variants; c) interference of ectopic transcription, and d) number of PCR cycles used in the reactions (14-16).

Thereafter, some investigators have tried to quantify TgmRNA employing real-time RT-PCR (15-23). The results have also been variable and some of them did not report a correlation between TgmRNA quantification and the presence of disease. The protocols used in these quantitative studies also differed too much, especially regarding mRNA extraction, normalization process and different primers.

Due to these controversies, an editorial and some reviews have appointed the possible methodological dilemmas involving these data, including primers design, removal of contaminating DNA, sample handling, and improvements on assay's normalization, sensitivity and specificity (14,15,24). In this report we have examined these points in order to develop an enhanced method of quantitative TgmRNA and to evaluate it on the follow-up of DTC patients.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

We studied 124 patients, 104 with DTC, followed in the Division of Endocrinology, Department of Medicine, Federal University of Sao Paulo. A review of clinical data was carried out to obtain each patient's history, surgical and pathology reports, laboratory and radiological examinations. All DTC patients (90 females and 14 males, age range 16-78 yr, median 35 yr) had been treated with total or near-total thyroidectomy, 90 of whom also received radioiodine ablation (30-200 mCi; mean: 116 ± 42), according to current clinical protocols in use at our institution (3). Fourteen of the 104 patients did not receive radioiodine ablation due to a negative whole body scan (WBS) after surgery (less than 1% uptake in thyroid bed). Seventy-one patients had papillary thyroid carcinoma (12 presented the follicular variant) and 33 had follicular carcinoma, classified according to the World Health Organization (25). Thirteen out of the 104 patients (12.5%) presented positive TgAb. All DTC patients were studied during L-T₄ therapy (TSH concentrations below 0.2 mU/L).

Eighty-two of the 104 DTC patients (78.8%) were considered "free of disease", since they presented sTg levels <1 ng/mL on hypothyroidism, negative WBS, and negative neck ultrasound for metastases (follow-up: 3-12 years). In this group of patients the mean ablative radioiodine dose was 100 ± 75.1 mCi of ¹³¹I; as mentioned, 14/82 patients did not receive radioiodine because WBS showed less than 1% uptake in the thyroid bed after surgery. Six out of these 82 patients presented positive TgAb, with negative WBS and neck US, and showed no evidence of recurrent disease during follow up (mean: 8 ± 2 years).

Twenty-two out of the 104 patients (21.2%) presented metastases: 8/22 patients had detectable levels of sTg under TSH suppression, and positive WBS uptake (lung, cervical lymph nodes and/or bone) after radioiodine treatment (Table 1, patients 1-8); 7/22 patients presented sTg levels above 5 ng/mL in hypothyroidism, in spite of undetectable sTg levels under L-T₄. Of these 7 patients, 2 had lung uptake and 5 presented cervical uptake on WBS, with suspicious metastatic cervical disease, confirmed by aspirative cytology and surgery (Table 2, patients 9-15). The remaining 7 patients had positive TgAb with undetectable levels of sTg even in hypothyroidism; however, WBS uptake was observed in all these 7 patients, 5/7 in the thyroid bed and 2 in the lung. In addition, neck US showed the presence of suspicious cervical lymph nodes in 5 of them, which were confirmed as thyroid metastases by cytology and by pathology report after surgery (Table 3, patients 16-22).

Methods

Blood samples were obtained for determinations of sTg (Delfia Thyroglobulin, time-resolved fluoroimmunoassay, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Wallac Oy, Turku, Finland, with a sensitivity of 1 ng/mL), serum TSH (immunofluorimetric method, normal range 0.3 to 5.0 mU/L) (26), and TgAbs (immunofluorimetric assay, normal range below 40 U/mL) (27).

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from 1 mL of venous blood and transferred immediately into tubes containing 3 mL of Trizol LS Reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) according to manufacturer's recommendations (28). Total RNA (1.5µg) was treated with DNase (Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and then stopped with the addition of 5 µL of DNase Inactivaton Reagent (Ambion) to the samples. The complementary DNA was reverse transcribed to a final volume of 60 µL, using 50 ng of OligoDT (Life Technologies), 10 U of RNase inhibitor (Life Technologies), 200 U of Superscript III (Life Technologies), 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 500 µM of each dNTPs and 10 mM of dithiothreitol (DTT). Finally, the samples were incubated at 50C for 1 hour and then stored at -20C until their usage. Reverse transcriptase negative samples were prepared for each individual reaction and served as controls for detection of assay contamination.

Tg Primer Design

The design of intron-spanning primers was made targeting different exons in order to discriminate possible amplification of genomic DNA contaminants and in regions free of alternative splicings. The analysis was performed using prediction programs for alternative Splicing and transcript Diversity Database (<http://www.ebi.ac.uk/asd/altsplice>) from Ensembl (<http://ensemble.org> gene ID ENSG00000042832), for splice sites (NNSPLICE: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), and for exonic-splicing enhancer (ESE) (ESEFinder: <http://exon.cshl.edu/ESE/>) (29-31).

The final choice of Tg primer sequences was: sense, 5'-CTATCGACGGCTCCTTCTTG-3'; antisense, 5'- CCAGTTGCCACTCACCTCTC -3', generating an amplicon of 116-bp encompassing

exons 40 and 41 of the Tg cDNA (Genebank, accession number NM_003235.4). These primers were near the 3' end of TgmRNA, which optimized the use of Oligo dT to perform the cDNA synthesis.

Real-time Quantitative PCR and assay quantification

The PCR products were detected by using the ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR was performed using 2 μ L of first-strand cDNA in a 20 μ L reaction volume containing 10mM of each Tg primer and 17 μ L of SYBR Green Mix (Applied Biosystems); cycling conditions for PCR included denaturing for 10 min at 95C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95 C, 20 sec at 55C, 20 sec at 72C and 20 sec at 75C. In order to confirm the identity of the amplicons, samples were visualized by agarose 1.5% gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining and sequenced (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems).

An absolute standard curve was designed by using plasmids containing PCR amplified Tg cDNA fragment as template. The standard curve included 5 different dilutions, with a range of 0.32 to 200 μ g of plasmids/ μ L of solution (0.32, 1.6, 8, 40, and 200 μ g/ μ L of plasmids), and was calculated by two independent methods, spectrophotometry and gel analysis. Independent standard curves were generated from the same plasmids preparation, for each 96-well plate as well as for negative control template reactions. cDNAs from different patients were quantified by comparing the crossing points of samples with those of the standards containing the plasmid concentration as stated above. For each experimental sample, the amount of target reference was determined from the appropriate standard curve. The quantification was performed in triplicate and the results were expressed as μ g of RNA/ μ L of solution.

Tissue Panels

cDNA samples from normal thyroid tissue and from 7 different non-thyroidal tissues (lung, testis, liver, brain, pancreas β cells, an osteosarcoma cell line and a mammary cell line) were used to validate the specificity of the selected Tg primers, comparing their expression by RT-PCR, using the following conditions: 2 min at 95C, then 40 cycles of 20 sec at 95C, 20 sec at 55C and 20 sec at 72C. The PCR products were visualized by agarose 1.5% gel electrophoresis followed by ethidium

bromide staining. To evaluate possible contaminations we used a negative control containing water instead of cDNA.

ROC Curve and Statistical analysis

In order to set a cut-off point for the quantification of TgmRNA, we performed a receiver operating characteristics (ROC) curve and calculated its respective sensitivity and specificity. The results were log-transformed and the statistical analysis of data was performed using paired *Student's t* test by the StatView 4.5 software (Abacus Concepts, Inc, Berkeley, CA). A *p* value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Validation of the TgmRNA quantitative method

We did not find any TgmRNA expression in all 7 extra-thyroidal tissues (Figure 1A), but we found expression in normal thyroid tissue (Figure 1B). We conclude that the pair of primers used in our study was specific for thyroid tissue.

The identity of generated amplicons was confirmed by agarose gel electrophoresis and nucleotide sequencing. Standard curves showed an efficacy (r^2) of 0.99 and a slope of 3.45, with a high level of confidence. The mean interassay coefficient of variation (CV) for the threshold cycle of the absolute standard curve containing PCR amplified Tg cDNA fragments (0.32, 1.6, 8, 40, and 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of plasmids), assayed in triplicate, was 1.0-1.5%; the intraassay CV for the threshold cycle of the standards was 0-2%. To rule out possible accidental laboratory contamination of RT-PCR, negative controls without reverse transcriptase or without cDNA consistently failed to demonstrate detectable PCR products at 40 cycles, showing that there were no external contaminants in our reactions.

Quantification of TgmRNA and sTg in patients with DTC and with benign thyroid disease and normal individuals

TgmRNA concentration was significantly different between patients considered "free of disease" and patients with metastases (mean= $90.1 \pm 8,6$ vs $951.3 \pm 36,8\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ($p < 0.0001$). There was no overlap between the two groups (Figure 2A). In a ROC curve, a level of $190 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ of TgmRNA presented a sensitivity of 94.7% and a specificity of 95.8% (Figure 2B). Employing this cut-off value we were able to discriminate almost all patients between the two groups. We also noticed that the test was useful for patients with positive TgAb, since patients with metastases ($n=7$) presented high TgmRNA quantification (mean= $685,7 \pm 31,8$), while those "free of disease" ($n=7$) showed a low TgmRNA quantification (mean= $165,2 \pm 13,9$).

When we compared TgmRNA quantification with the measurement of sTg in patients "free of disease", all of them presented sTg lower than 1 ng/mL and values of TgmRNA below the cut-off of $190 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. On the other hand, all but one patient with metastases showed TgmRNA above the cut-off value. It's worth noting that all 7 patients with metastases and positive TgAb had TgmRNA above the cut-off. In these patients, sTg levels were below 1 ng/mL, probably due to interference of anti-thyroglobulin antibodies (Figure 3).

DISCUSSION

Currently, the measurement of sTg, specially performed with TSH stimulation, has been considered a specific and sensitive marker of recurrence of the disease and indicates the presence of metastases in the follow-up of patients with DTC (1-3). However the presence of TgAb in the sera of 15-20% of patients with DTC and the expensive cost of rhTSH to avoid the hypothyroidism status could be a limiting factor for the use of sTg as a thyroid tumor maker. Therefore, a sensitive screening test to diagnose recurrent thyroid cancer even in the presence of TgAb and not requiring TSH stimulation would be really useful (15).

Based on the previous evidence of positive TgmRNA in the peripheral blood of DTC patients with negative sTg and positive TgAb, several authors have suggested the use of TgmRNA by RT-PCR as a suitable test (5,6-8,10). However, in all of these previous studies, the authors identified a group of patients (about 20%) with positive TgmRNA but considered free of disease by traditional methods (negative WBS, negative neck US and undetectable levels of sTg); therefore, they were considered false positive results (5-8,10). Accordingly, TgmRNA showed to be more sensitive than sTg, but with lower specificity. In a previous report of our group we have found 3 patients with negative sTg, positive TgAb and positive TgmRNA, in whom we detected metastases of papillary thyroid carcinoma in cervical lymph node, by neck US-guided aspirative cytology (8).

To avoid the problem of specificity, the quantification of TgmRNA has been used as a tool in the follow up of patients with DTC. Thus, Ringel et al. showed that 89% of patients with local metastases and 94% of patients with distant metastases had TgmRNA above a cut-off level of 3 pg of TgmRNA Eq/ μ g thyroid RNA; however, 38% of patients with no uptake on WBS and undetectable levels of sTg also presented TgmRNA above the mentioned cut-off level (16). Savagner et al. showed that the quantification of TgmRNA is a good choice in patients displaying TgAb, but 18% of patients considered "cured" had TgmRNA values above 1 pg TgmRNA/ μ g RNA (18). On the other hand, Takano et al. detected Tg transcripts in all patients submitted to total thyroidectomy with and without metastases and even in patients with medullary thyroid carcinoma (17). Similarly Bugalho et al. investigated the diagnostic specificity of TgmRNA detection, analyzing blood samples from healthy volunteers and from patients previously subjected to thyroidectomy for reasons other than a carcinoma of the follicular cells using a semi-quantitative PCR and were also unable to find any difference between them (12). Other investigators also did not demonstrate correlation between quantitative TgmRNA levels and the presence or absence of thyroid tissue (20-23). Therefore, nowadays, based on the heterogeneity of the methods and contradictory data, it was difficult to define the clinical value of TgmRNA quantification.

A variety of technical factors may contribute to the different results obtained in the literature (13,14,24). The first possible explanation for them is related to diverse methods of blood collection and RNA extraction. Eszlinger et al. compared 3 methods of blood collection and RNA extraction and showed a greater RNA amount in RNA obtained from citrate blood and mononuclear cell separated in comparison with RNA extracted from EDTA or citrate blood and without a mononuclear cell separation. In addition, an average of 5-fold increase in TgmRNA levels in samples prepared using citrate blood with mononuclear cell separation, as compared to samples with no separation of mononuclear cells (19). The second possible reason of this discrepancy is the use of different PCR primers and distinct methods of reverse transcription. Some groups compared primers designed to amplify known splice variants (13,18,32,33) and it appears that the avoidance of detecting Tg splice variants can improve TgmRNA assays. The third point to discuss is the extra-thyroidal expression of TgmRNA. The highly sensitive TgmRNA assays could detect transcripts in patients with no known thyroid tissue, which may lead to a false-positive result based on follow-up data of patients. Bugalho et al. did not find statistical difference in the expression levels of TgmRNA in healthy volunteers and in patients previously subjected to total thyroidectomy for reasons other than a carcinoma of the follicular epithelium (12). According to these data, the determination of a possible threshold point in cells of non-thyroid origin is mandatory to obtain reliable and comparable results. The presence of TgmRNA in patients free of disease might not be derived from thyroid cells, but, most likely, from other tissues that express small quantities of TgmRNA (34). On the other hand, a possible explanation of the lower level of TgmRNA in patients with metastases could be the well-known heterogeneity of gene transcription in thyroid cancer tissue (35).

As some variable results among previously studies have been related to methodological factors, we have addressed some of the technical problems found in previous reports in order to optimize the method of quantitative mRNA Tg, and to evaluate it on the follow-up of patients with DTC.

Our first goal was to avoid the amplification of Tg splice variants. In fact, the transcription pattern of TgmRNA is heterogeneous in thyroid cancer, as well as in normal thyroid tissues, and no specific pattern has been identified in DTC (36). The examination of the pairs of primers used in different studies reveals that the amplified sequences were located in regions affected by alternative TgmRNA splicings. Therefore, in this report quantitative TgmRNA assays were based on primers located in a region that did not seem to be affected by alternative splicing or Single Nucleotide Polimorphisms (SNPs). We also designed primers in a region near the 3' end of the gene, in order to favoring the synthesis of cDNA when using Oligo dT. In addition, these pair of primers did not

show extra-thyroidal expression in any of the seven non-thyroidal studied tissues. This data made our methods reliable to the main objective, that is, to verify if it would be possible to distinguish patients apparently free of disease and patients with metastases by quantification of mRNA Tg.

We found a high efficiency in the quantification of TgmRNA and we were able to distinguish patients with and without metastases, especially when considering the high sensitivity and specificity calculated by ROC curve (both being above 90%, with a cut-off of 190 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). We could find additional information using a quantitative RT-PCR assay, when compared with the traditional methods (sTg and WBS) employed in the follow-up of patients with positive TgAb. The high number of patients “free of disease”, all of them with quantification below the cut-off, excluded the possibility of false-negative results.

Experiments involving TgmRNA quantification in patients with positive TgAb showed a positive correlation with the diagnosis of these patients (“free of disease” or with metastases), proving to be useful in those cases (34). In the present study, although TgAb positive patients with metastases confirmed by positive WBS and cervical US, presented undetectable levels of sTg, even in hypothyroidism, the quantification of TgmRNA was high, in agreement with their positive WBS and cervical US, showing a clinical utility of this method.

In conclusion, the differences proposed in the TgmRNA quantification made it a reliable, sensitive, and specific method, allowing the differentiation between patients free of disease and those with metastases and could be an appropriate molecular marker in the follow-up of patients with thyroid carcinoma, especially in patients with positive TgAb.

REFERENCES

1. **Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Sherman SI, Tuttle RM** 2006 Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 16:109-42
2. **Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JWA, Wiersinga WM and the European Thyroid Cancer Taskforce** 2006 European consensus for the management of patients with differentiated carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 154:787-803
3. **Maia AL, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel LMZ, Maciel RMB, Rosario PW, Vaisman M** 2007 Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: Brazilian consensus. *Arq Bras Endocrinol Metab* 51: 867-893
4. **Demers LM, Spencer CA** 2003 Laboratory Medicine Practice Guidelines. Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. *Thyroid* 13:57-67
5. **Ditkoff BA, Marvin MR, Yemul S, Shi YJ, Chabot J, Feind C, Lo Gerfo PL** 1996 Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood. *Surgery* 120:959-964
6. **Tallini G, Gossein R, Emanuel J, Gill J, Kinder B, Dimich AB, Costa J, Robbins R, Burrow GN, Rosai J** 1998 Detection of thyroglobulin thyroid peroxidase, and RET/PTC1 mRNA transcripts in the peripheral blood of patients with thyroid disease. *J Clin Oncol* 16:1158-1166
7. **Ringel MD, Ladenson PW, Levine MA** 1998 Molecular diagnosis of residual and recurrent thyroid cancer by amplification of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4435-4442
8. **Biscolla RP, Cerutti JM, Maciel RM** 2000 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* 85:3623-3627
9. **Bojunga J, Roddiger S, Stanisch M, Kusterer K, Kurck R, Renneberg H, Adams S, Lindhorst E, Csadel KII, Schumm-Draeger PM** 2000 Molecular detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease by RT-PCR. *Br J Cancer* 82:1650-1655.
10. **Bellantone R, Lombardi DP, Bossola M, Ferrante A, Princi P, Boscherini M, Maussier L, Salvatori M, Rufini V, Reale F, Romano L, Tallini G, Zelano G, Pontecorvi A** 2001 Validity of thyroglobulin mRNA assay in peripheral blood of post-operative thyroid carcinoma patients in predicting tumor recurrences varies according to the histologic type: Results of a prospective study. *Cancer* 92:2273-2279

11. **Fugazzola L, Mihalich A, Persani L, Cerutti N, Reina M, Bonomi M, Ponti E, Mannavola D, Giammona E, Vannucchi G, di Blaio AM, Beck-Peccoz P** 2002 Highly sensitive serum thyroglobulin and circulating thyroglobulin mRNA evaluations in the management of patients with differentiated thyroid cancer in apparent remission. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3201-3208
12. **Bugalho MJ, Domingues RS, Pinto AC, Garrao A, Catarino AL, Ferreira T, Limbert E, Sobrinho L** 2001 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* 145:409-413
13. **Gupta M, Taguba I, Ariaga R, Siperstein A, Faiman C, Mehta A, Sethu S** 2002 Detection of circulating thyroid cancer cells by reverse transcription-PCR for thyroid-stimulating hormone receptor and thyroglobulin: importance of primer selection. *Clin Chem* 48:1862-1865
14. **Bojunga J, Kusterer K, Schumm-Draeger PM, Usadel KH** 2002 Polymerase chain reaction in the detection of tumor cells: new approaches in diagnosis and follow-up of patients with thyroid cancer. *Thyroid* 12:1097-1107
15. **Ringel MD** 2004 Molecular detection of thyroid cancer: differentiating “signal” and “noise” in clinical assays. *J Clin Endocrinol Metab* 89:29-32
16. **Ringel MD, Balducci-Silano PL, Anderson JS, Spencer CA, Silverman J, Sparling YH, Francis GL, Burman KD, Warrtofsky L, Ladenson PW, Levine MA, Tuttle RM** 1999 Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4037-4042
17. **Takano T, Miyarchi A, Yoshida H, Hasegawa Y, Duma K, Amino N** 2001 Quantitative measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of patients after total thyroidectomy. *Br J Cancer* 85:102-106
18. **Savagner F, Rodien P, Reynier P, Rohmer V, Bigorgne JC, Malthiery Y** 2002 Analysis of Tg transcripts by real-time RT-PCR in the blood of thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:635-639
19. **Ezlinger M, Nuemann S, Otto L, Paschke R** 2002 Thyroglobulin mRNA quantification in the peripheral blood is not a reliable marker for the follow-up of patients with differentiated thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* 147:575-582.
20. **Denizot A, Delfino C, Dutour-Meyer A, Fina F, Ouafik LH** 2003 Evaluation of quantitative measurement of thyroglobulin mRNA in the follow-up of differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 13:867-872

21. **Span PN, Slegers MJ, van den Brock WJ, Ross HA, Nieuwlaat WA, Hermus AR, Sweep CG** 2003 Quantitative detection of peripheral thyroglobulin mRNA has limited clinical value in the follow-up of thyroid cancer patients. *Ann Clin Biochem* 40:94-99
22. **Elisei R, Vivaldi A, Agate L, Molinaro E, Nencetti C, Grasso L, Pinchera A, Pacini F** 2004 Low specificity of blood thyroglobulin messenger ribonucleic acid assay prevents its use in the follow-up of differentiated thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 89:33-39
23. **Lombardi CP, Bossola M, Princi P, Boscherini M, La Torre G, Raffaelli M, Traini E, Salvatori M, Pontecorvi A, Bellantone R** 2008 Circulating thyroglobulin mRNA does not predict early and midterm recurrences in patients undergoing thyroidectomy for cancer. *Am J Surg* 196: 326-32
24. **Gupta M, Chia S-Y** 2007 Circulating thyroid cancer markers. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14: 383-388
25. **DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C** 2004 Pathology and Genetics of tumours of the endocrine organs. World Health Organization Classification of Tumours
26. **Vieira JGH, Kunii IS, Nishida SK, Matsumura LK, Russo EMK, Maciel RMB** 1992 Development of an immunofluorimetric assay for the measurement of human thyrotropin (TSH) in serum and in total blood collected in filter paper. *Arq Brasil Endocrinol Metab* 36: 7-12
27. **Vieira JGH, Tachibana TT, Fonseca RMG, Nishida SK, Maciel RMB** 1996 Development of an immunofluorimetric assay for the measurement of anti-thyroglobulin antibodies. *Arq Brasil Endocrinol Metab* 40: 232-7
28. **Deng MY, Wang H, Ward GB, Beckham TR, McKenna TS** 2005 Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR. *J Vet Diag Invest* 17: 574-8
29. **Thanaraj TA, Stamm S, Clark F, Riethoven JJ, Le Texier V, Muilu J** 2004 ASD: the alternative splicing database. *Nucleic Acids Res* 32: D64-9
30. **Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D** 1997 Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 4:311-23
31. **Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR** 2003 ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31:3568-71
32. **Chinnapa P, Taguba L, Arciaga R, Faiman C, Siperstein A, Mehta AE, Reddy K, Nasr C, Gupta MK** 2004 Detection of thyrotropin-receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) and thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease: sensitive and specific markers for thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3705-3709

33. **Wagner K, Arciaga R, Siperstein A, Milas M, Warshawsky I, Reddy SSK, Gupta MK** 2005 Thyrotropin receptor/thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood and fine-needle aspiration cytology: diagnostic synergy for detecting thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 1921-1924
34. **Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St Croix B, Romans KE, Choti MA, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B** 2001 A Phosphatase associated with metastases of colorectal cancer. *Science* 294:1343-1346.
35. **Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahan A** 1989 Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2617-2621 et al 1989
36. **Bertaux F, Noel M., Malthiery Y, Fragu P** 1991 Determination of a heterogeneous transcription pattern of thyroglobulin mRNA in human thyroid tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 586-592

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP), grant 04/09934-7 to RMBM and a research-fellowship grant 05/55842-0 to VTB. We thank Drs. Janete M. Cerutti and José Gilberto H. Vieira for helpful discussions, Mrs. Gisele Oler for technical support with the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, and Angela Faria for superb secretarial assistance. RMBM is an investigator of the Brazilian Research Council and of the Fleury Institute; RPMB is investigator of the Fleury Institute.

TABLES

TABLE 1. Histology, WBS, Qt mRNA Tg in 8 negative TgAb patients with metastases and detectable sTg under L-T4 therapy and hypothyroidism

<i>Patient</i>	<i>Histology</i>	<i>WBS</i>	<i>mRNATg</i> ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	<i>sTg on L-T4</i> (ng/mL)
1	Papillary	cerv.lymph	2096.5	42
2	Follicular	cerv.lymph/bone	2101.5	75
3	Papillary	cerv.lymph	1953.5	125
4	Follicular	lung	1836.4	101
5	Follicular	lung	1420.7	89
6	Papillary	cerv.lymph	430.8	28
7	Papillary	cerv.lymph	1653.2	64
8	Papillary	cerv.lymph	1153.9	50

WBS – Whole Body Scan; mRNATg – Thyroglobulin mRNA; sTg – Serum thyroglobulin; Hypo – hypothyroidism; cerv.lymph – cervical lymphnode

TABLE 2. Histology, WBS, Qt mRNA Tg in 7 negative TgAb patients with metastases and undetectable sTg under L-T4 therapy

<i>Patient</i>	<i>Histology</i>	<i>WBS</i>	<i>mRNATg</i> ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	<i>sTg on hypo</i> (ng/mL)	<i>sTg on L-T4</i> (ng/mL)
9	Papillary	cerv.lymph	645.1	62	< 1
10	Follicular	lung	278.0	42	< 1
11	Follicular	cerv.lymph	502.6	58	< 1
12	Papillary	cerv.lymph	230.5	35	< 1
13	Follicular	lung	398.4	29	< 1
14	Papillary	cerv.lymph	185.3	15	< 1
15	Papillary	cerv.lymph	928.3	258	< 1

WBS – Whole Body Scan; mRNATg – Thyroglobulin mRNA; sTg – Serum thyroglobulin; Hypo – hypothyroidism; cerv.lymph – cervical lymphnode

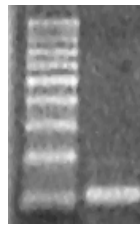
TABLE 3. Histology, WBS, Qt mRNA Tg in 7 positive TgAb patients with metastases and undetectable sTg under L-T4 therapy and hypothyroidism

<i>PATIENTS</i>	<i>Histology</i>	<i>WBS</i>	<i>mRNA Tg</i> <i>(ug/uL)</i>	<i>TgAb</i>	<i>sTg on L-T4</i> <i>(ng/mL)</i>
16	Papillary	cerv.lymph	468.8	Pos	< 1
17	Follicular	cerv.lymph	468.1	Pos	< 1
18	Papillary	cerv.lymph	1045.5	Pos	< 1
19	Follicular	lung	221.7	Pos	< 1
20	Papillary	cerv.lymph	1577.2	Pos	< 1
21	Follicular	lung	355.8	Pos	< 1
22	Follicular	cerv.lymph	398.4	Pos	< 1

WBS – Whole Body Scan; mRNATg – Thyroglobulin mRNA; cerv.lymph – cervical lymphnode

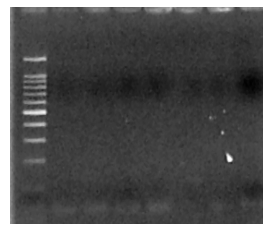
FIGURES

1A



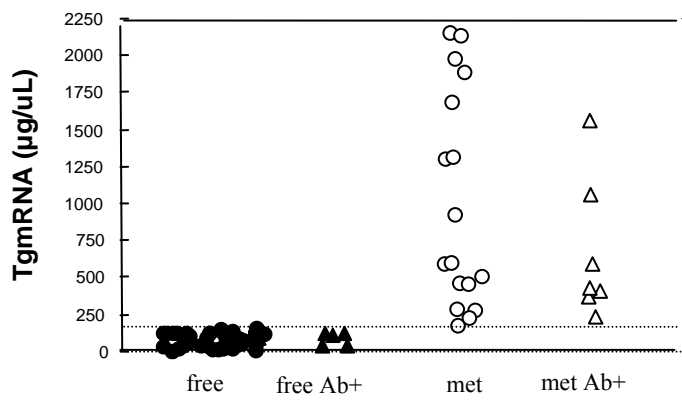
1 2

1B

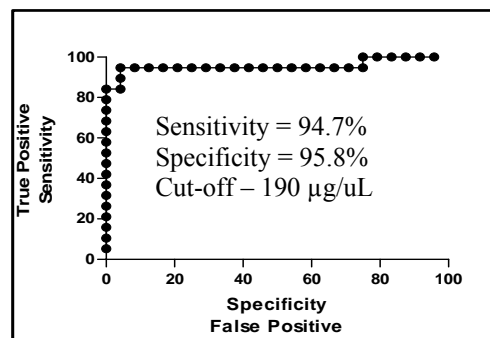


1 2 3 4 5 6 7 8

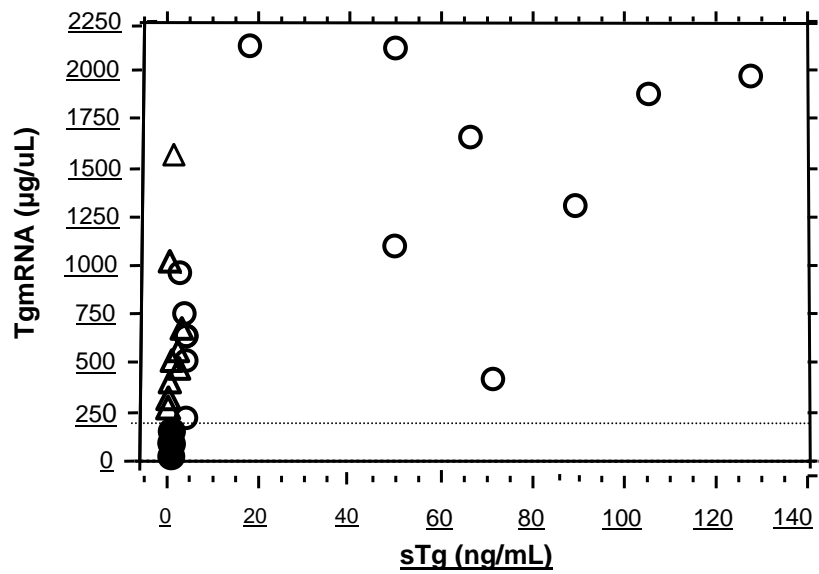
2A



2B



3



LEGEND OF THE FIGURES

Figure 1. Ethidium bromide-stained agarose gel showing Tg gene expressions in thyroid and in non-thyroidal tissues

A. Expression of in normal thyroid tissue; lane 1, 100 kb ladder (Gibco); lane 2, thyroid; B. Expression in non-thyroidal tissues: lane 1, 100 kb ladder (Gibco); lane 2, liver; lane 3, mammary cell line; lane 4, β cells; lane 5, lung; lane 6, testis; lane 7, osteosarcoma cell line; lane 8, brain

Figure 2A. Quantification of TgmRNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) in patients free of disease (free, ●), patients free of disease with positive anti-thyroglobulin antibodies (free Ab+, ▲), patients with metastasis (met, ○), and patients with metastasis and positive anti-thyroglobulin antibodies (met Ab+, Δ). The dotted line represents TgmRNA cut-off of $190 \mu\text{g}/\mu\text{L}$

Figure 2B. ROC curve for TgmRNA: a cut-off of $190 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ mRNA was chosen to calculate sensitivity and specificity

Figure 3. Correlation between TgmRNA and sTg in patients with DTC. Black circles: patients free of disease; Empty circles: patients with metastasis; Empty triangles: patients with metastasis and positive TgAb. The dotted line represents de cut-off value of $190 \mu\text{g}/\mu\text{L}$

4 - CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Os aperfeiçoamentos propostos para o método de quantificação do RNA mensageiro da tiroglobulina por PCR em tempo real apresentados neste estudo tornaram-no um método confiável, sensível, específico e tecnicamente simples. Desta forma, este método permitiu diferenciar o grupo de pacientes livres de doença do grupo de pacientes com metástases, inclusive na presença de anticorpos anti-tiroglobulina.

5- REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

1. Maciel RMB 1983 Desenvolvimento de um método radioimunológico para a dosagem de tiroglobulina sérica e sua aplicação no seguimento de pacientes portadores de câncer diferenciado da tiróide. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Endocrinologia Clínica da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.
2. Maciel RMB, Vieira JGH, Fonseca RMG, Russo EMK, Oliveira MAD, Rocca A 1986 Desenvolvimento de um método radioimunológico para a dosagem de tiroglobulina sérica. *Arq Brasil Endocrinol Metab* 30: 31-39
3. Maciel RMB, Segreto C, Buchala J, da Rosa JC, Romão LA, Aoyama EM, Serson D, Alonso G, Chacra AR 1986 Aplicação da dosagem da tiroglobulina sérica no seguimento de pacientes portadores de câncer diferenciado da tiróide. *Arq Brasil Endocrinol Metab* 30: 60-63
4. Marone MMS, Correa PHS, Maciel RMB, Scalissi NM, Bianco AC 1988 Diagnóstico de metástases do carcinoma diferenciado de tireóide: pesquisa de corpo inteiro vs. tireoglobulina sérica. *Arq Brasil Endocrinol Metab* 32: 24-27
5. Biscolla RPM, Cerutti JM, Maciel RMB 2000 Detection of recurrent thyroid cancer by sensitive nested RT-PCR of thyroglobulin and sodium/iodine symporter messenger RNA transcripts in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 46: 65-71
6. Maciel RMB 2002 O laboratório no diagnóstico e seguimento de doenças auto-imunes e neoplásicas da tiróide. *Arq Brasil Endocrinol Metab* 46: 65-71
7. Alves MLD, Maciel RMB, Valeri FV, Contrera JD, Andrade JM, Llorach-Velludo MA, Iazigi N 2002 Valor preditivo do exame clínico, cintilografia, ultra-sonografia, citologia aspirativa e tiroglobulina sérica no nódulo tiroideano único e atóxico: estudo prospectivo de 110 pacientes. *Arq Brasil Endocrinol Metab* 46: 648-653
8. Maciel RMB 2004 Ainda em busca do ensaio ideal para a tiroglobulina sérica no seguimento de pacientes com câncer diferenciado da tiróide. *Arq Brasil Endocrinol Metab* 48: 434-436
9. Guimarães GS, Latini FRM, Camacho CP, Maciel RMB, Dias-Neto E, Cerutti JM 2006 Identification of candidates for tumor-specific alternative splicing in the thyroid. *Genes, Chromosomes and Cancer* 45: 540-553
10. Maciel RMB, Biscolla RPM 2006 Diagnóstico e tratamento do câncer da tiróide, in *Endocrinologia Clínica*, editado por L Vilar, 3^a edição. Medsi, Editora Médica e Científica, Rio de Janeiro, 2006, pp 240-252

11. Biscolla, RPM, Ikejiri, ES, Mamone, MC, Nakabashi, CCD, Andrade, VP, Kasamatsu, TS, Crispim, F, Chiamolera MI, Andreoni DM, Camacho CP, Hojaij FC, Vieira JGH, Furlanetto RP, Maciel RMB 2007 Diagnóstico de metástases de carcinoma papilífero de tiróide através da dosagem de tiroglobulina no líquido obtido da lavagem da agulha utilizada na punção aspirativa. *Arq Brasil Endocrinol Metab* 51: 419-425
12. Rosário PW, Tavares Jr WC, Biscolla RPM, Purisch S, Maciel, RMB 2007 Emprego da ultrasonografia cervical no seguimento de pacientes com carcinoma diferenciado da tiróide. *Arq Brasil Endocrinol Metab* 51: 593-600
13. Maciel, RMB 2007 O ensaio de tiroglobulina com melhor sensibilidade funcional enquanto os pacientes tomam L-T4 substituirá a tiroglobulina estimulada pelo TSH no seguimento dos pacientes com câncer diferenciado da tiróide? *Arq Brasil Endocrinol Metab* 51: 862-866
14. Maciel RMB, Biscolla RPM 2007 Nódulos e câncer de tiróide, in *Endocrinologia*, editado por MJA Saad, RMB Maciel e BB Mendonça, Editora Atheneu, São Paulo, pp 423-440
15. Vini L, Harmer C. Management of thyroid cancer 2002 *Lancet Oncol* 3: 407-414
16. Sherman SI 2003 Thyroid carcinoma *Lancet* 361: 501-511
17. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Sherman SI, Tuttle RM 2006 Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 16:109-42
18. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JWA, Wiersinga WM and the European Thyroid Cancer Taskforce 2006 European consensus for the management of patients with differentiated carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 154:787-803
19. Maia AL, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel LMZ, Maciel RMB, Rosario PW, Vaisman M 2007 Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: Brazilian consensus. *Arq Bras Endocrinol Metab* 51: 867-893
20. Tuttle RM, Leboeuf R, Martorella AJ 2007 Papillary thyroid cancer: monitoring and therapy. *Endocrinol Matab Clin N Am* 36: 753-778
21. Demers LM, Spencer CA 2003 Laboratory Medicine Parctice Guidelines. Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. *Thyroid* 13: 57-67
22. Rosário PW, Tavares Jr. WC, Biscolla RPM, Purish S, Maciel RMB 2007 Emprego da ultrasonografia cervical no seguimento de pacientes com carcinoma diferenciado da tiróide. *Arq Bras Endocrinol Metab* 51: 593-600
23. Maciel RMB 2007 Tiróide: fisiologia e avaliação diagnóstica, in *Endocrinologia*, editado por MJA Saad, RMB Maciel e BB Mendonça, Editora Atheneu, São Paulo, pp 299-330

24. Mercken L, Simons MJ, Brocas H, Vassart G 1989 Alternative splicing may be responsible for heterogeneity of thyroglobulin structure. *Biochimie* 71: 223-226
25. Bertaux F, Noel M, Malthiery Y, Fragu P 1991 Determination of a heterogeneous transcription pattern of thyroglobulin mRNA in human thyroid tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 586-592
26. Bertaux F, Noel M, Lasmoles F, Fragu P 1995 Identification of the exon structure and four alternative transcripts of the thyroglobulin-encoding gene. *Gene* 156: 297-301
27. Maciel RMB 2007 O ensaio de tiroglobulina com melhor sensibilidade funcional enquanto os pacientes tomam L-T4 substituirá a tiroglobulina estimulada pelo TSH no seguimento dos pacientes com câncer diferenciado da tiróide? *Arq Brasil Endocrinol Metab* 51: 862-866
28. Maciel RMB 2004 Ainda em busca do ensaio ideal para a tiroglobulina sérica no seguimento de pacientes com câncer diferenciado da tiróide. *Arq Brasil Endocrinol Metab* 48: 434-436
29. Moreno JG, Croce CM, Fischer R, Monne M, Vihko P, Mulholland SG et al. 1992 Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 52: 6110-6112
30. Burchill AS, Bradbury FM, Smith B, Lewis IJ, Selby P 1994 Neuroblastoma cell detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for tyrosin hydroxylase mRNA. *Int J Cancer* 54: 671-675
31. Johnson PWM, Burchill SA, Selby PJ 1995 The molecular detection of circulation tumour cells. *Br J Cancer* 72: 268-276
32. Ditkoff BA, Marvin MR, Yemul S, Shi YJ, Chabot J, Feind C, Lo Gerfo PL 1996 Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood. *Surgery* 120: 959-964
33. Tallini G, Gossein R, Emanuel J, Gill J, Kinder B, Dimich AB, Costa J, Robbins R, Burrow GN, Rosai J 1998 Detection of thyroglobulin, thyroid peroxidase, and RET/PTC1 mRNA transcripts in the peripheral blood of patients with thyroid disease. *J Clin Oncol* 16:1158-1166
34. Ringel MD, Ladenson PW, Levine MA 1998 Molecular diagnosis of residual and recurrent thyroid cancer by amplification of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4435-4442
35. Wingo ST, Ringel MD, Anderson FS, Patel AD, Lukes YD, Djuh YY, Solomon B, Nicholson D, Balducci-Silano PL, Levine MA, Francis GL, Tuttle RM 1999 Quantitative Reverse Transcription PCR Measurement of Thyroglobulin mRNA in Peripheral Blood of Healthy Subjects. *Clin Chem* 45: 785-789
36. Ringel MD, Balducci-Silano PL, Anderson JS, Spencer CA, Silverman J, Sparling YH, Francis GL, Burman KD, Wartofsky L, Ladenson PW, Levine MA, Tuttle RM 1999 Quantitative reverse

- transcription-polymerase chain reaction of circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4037-4042
37. Fenton C, Anderson JS, Patel AD, Lukes Y, Solomon B, Tuttle M 2001 Thyroglobulin messenger ribonucleic acid levels in the peripheral blood of children with benign and malignant thyroid disease. *Pediatr Res* 49: 429-34
 38. Bojunga J, Roddiger S, Stanisch M, Kusterer K, Kurck R, Renneberg H, Adams S, Lindhorst E, Usadel KH, Schumm-Draeger PM 2000 Molecular detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease by RT-PCR. *Br J Cancer* 82:1650-1655.
 39. Span PN, Slegers MJ, van den Broek WJ, Ross HA, Nieuwlaat WA, Hermus AR, Sweep CG 2003 Quantitative detection of peripheral thyroglobulin mRNA has limited clinical value in the follow-up of thyroid cancer patients. *Ann Clin Biochem* 40: 94-99
 40. Ezlinger M, Nuemann S, Otto L, Paschke R 2002 Thyroglobulin mRNA quantification in the peripheral blood is not a reliable marker for the follow-up of patients with differentiated thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* 147:575-582.
 41. Bojunga J, Kusterer K, Schumm-Draeger PM, Usadel KH 2002 Polymerase chain reaction in the detection of tumor cells: new approaches in diagnosis and follow-up of patients with thyroid cancer. *Thyroid* 12:1097-1107
 42. Gupta M, Taguba I, Ariaga R, Siperstein A, Faiman C, Mehta A, Sethu S 2002 Detection of circulating thyroid cancer cells by reverse transcription-PCR for thyroid-stimulating hormone receptor and thyroglobulin: importance of primer selection. *Clin Chem* 48:1862-1865
 43. Savagner F, Rodien P, Reynier P, Rohmer V, Bigorgne JC, Malthiery Y 2002 Analysis of Tg transcripts by real-time RT-PCR in the blood of thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:635-639
 44. Grammatopoulos D, Elliott Y, Smith SC, Brown I, Greive RJ, Hillhouse EW, et al. 2003 Measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood as an adjunctive test for monitoring thyroid cancer. *Mol Pathol* 56:162-166
 45. Fugazzola L, Mihalich A, Persani L, Cerutti N, Reina M, Vannucchi G, et al. 2002 Highly sensitive serum thyroglobulin and circulating thyroglobulin mRNA evaluations in the management of patients with differentiated thyroid cancer in apparent remission. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3201-3208
 46. Ringel MD 2004 Editorial: molecular detection of thyroid cancer: differentiating “signal” and “noise” in clinical assays *J Clin Endocrinol Metab* 89: 29-32

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)