

ROBERTA POSSATO FERNANDES

**Quantificação do RNAm de tireoglobulina em sangue
periférico de pacientes com câncer diferenciado de
tireóide: acompanhamento a longo prazo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Medeiros-Neto

Co-Orientadora: Dra. Ileana Gabriela. Sanchez. Rubió

SÃO PAULO

2008

Dedico esta tese às pessoas mais importantes da minha vida: à minha querida família: meus pais, minha irmã e ao meu amor: Tom.

Em todos os momentos desta longa caminhada, pude contar com amor, carinho, compreensão, ajuda, incentivo e apoio financeiro. Dedico esta realização especialmente a vocês que, incansavelmente se orgulham de mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela dedicação, pelo incentivo e respeito em todas as minhas decisões, pelo orgulho que sentem e que sempre fazem questão de expor e pelo amor incondicional. Vocês são a minha base e estrutura, são os principais responsáveis por quem sou. Sem vocês, com certeza não estaria aqui hoje, conquistando mais esta etapa da minha vida.

À minha irmã, Eli, pelo seu carinho, sua confiança e pelo seu orgulho de ter uma irmã “certinha” além sempre estar ao meu lado, me ouvindo e apoiando. Você também foi muito importante por mais esta conquista.

Ao Tom, por ter complementado a minha vida com seu amor, dedicação, paciência nos momentos estressantes e de ausência, por seu orgulho e sempre acreditar no meu esforço. A sua presença nesta fase da minha vida foi extremamente importante. Você é muito especial.

Aos meus mestres Prof. Geraldo e Dra. Ileana:

Ao Prof. Geraldo, por sua dedicação, incentivo e apoio. Obrigada por acreditar e investir em mim. O seu conhecimento inesgotável, sua dedicação, amor à ciência e sua energia são estimulantes para continuarmos sempre em frente.

À Dra. Ileana Rubio, a Ile, pela dedicação, amizade e principalmente pela paciência. É para quem devo os meus conhecimentos em Biologia Molecular. Sua “intensidade” é um grande incentivo.

Ao Dr. Eduardo e Dra. Rosalinda, por estarem sempre dispostos a ajudar, aconselhar, tirar dúvidas e apoiar. Agradeço de coração o carinho e atenção de vocês.

Às pessoas que colaboraram e me ajudaram nesta pesquisa: Dra. Rossana Romão, Maria Silvia Córdia, Dona Jacira Lima e Dra. Tomoko.

A todos os amigos e amigas que, indiretamente, me apoiaram, incentivaram e acreditaram na “doutorinha”.

À minha “segunda família” por hoje fazerem parte da minha vida e se orgulharem também.

Às amigas do laboratório de Tireóide, pela ajuda, pelos momentos divertidos e pelas companhias durante as noites de trabalho.

Aos colegas do LIM 25, pela ajuda e companhia durante estes anos de trabalho.

A todos os pacientes que participaram desta pesquisa, pois sem eles, não seria realidade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa e desta conquista.

E por último agradeço, não finalmente e sim principalmente a Deus, por ter me proporcionado forças, sabedoria e discernimento durante minhas decisões, além de ter colocado em meu caminho grandes pessoas e grandes amigos que me acompanharam e ajudaram durante esta longa caminhada e conquista.

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida
com paixão, perder com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...
A vida é muito para ser insignificante”.

Charles Chaplin, 1889-1977

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2008.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

I. INTRODUÇÃO.....	1
Carcinoma de Tireóide.....	1
Tireoglobulina Sérica.....	3
Anticorpos Anti-Tireoglobulina.....	6
RNA mensageiro de Tireoglobulina: um método alternativo.....	7
II. OBJETIVO.....	11
III. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	12
CASUÍSTICA.....	12
Fluxograma.....	15
MÉTODOS.....	16
Coleta de sangue para extração de RNA total.....	16
Extração de RNA total do sangue periférico.....	16
Reextração do RNA total.....	17
Quantificação do RNA total.....	17
Avaliação da integridade do RNA.....	18
Purificação do RNA.....	18
Síntese de cDNA.....	18

Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real.....	19
Escolha do gene controle interno.....	24
Validação do gene controle interno.....	28
Avaliação da função tireoidiana e auto-anticorpos.....	29
Ultrassonografia de tireóide.....	29
IV. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	31
V. RESULTADOS.....	32
Função tireoidiana dos pacientes.....	32
Pesquisa de corpo inteiro.....	34
Ultrassonografia.....	34
QUANTIFICAÇÃO DO RNAm-TG E DA TIREOGLOBULINA	
SÉRICA.....	35
Correlação dos valores de RNAm-TG _{GAPDH} e RNAm-TG _{HPRT1}	35
Quantificação do mRNA-TG _{GAPDH}	37
Quantificação do RNAm-TG _{HPRT1}	38
Quantificação da tireoglobulina sérica.....	39
Anticorpos anti-TG.....	41
RNAm-TG, tireoglobulina sérica e anticorpos anti-TG.....	41
Avaliação de casos.....	46
RNAm-TG e tipo histológico.....	47
VALOR DE CORTE PARA O RNAm DE TIREOGLOBULINA.....	48
ANÁLISE SISTEMÁTICA E METANÁLISE.....	49
Estratégia de busca.....	49
Seleção de dados.....	50

Resultados da análise sistemática.....	50
VI. DISCUSSÃO.....	51
Perspectivas futuras.....	58
VII. CONCLUSÃO.....	59
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
IX. ANEXOS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

βG	β -Globina
cDNA	ácido desoxi-ribonucléico complementar
CDT	câncer diferenciado de tireóide
VP	variação percentual
CT	<i>threshold cycle</i>
CV	coeficiente de variação
Depc	dietil pirocarbonato
<i>et al.</i>	e outros
dNTP	nucleotídeos do DNA
DO₂₆₀	densidade óptica de 260 nm
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1
IRMA	ensaio imunoradiométrico
Kb	Kilo base
q.s.p.	quantidade suficiente para
TAE	Tris acetato EDTA
TG	tireoglobulina
TGs	tireoglobulina sérica
TSH	hormônio estimulante da tireóide
RIA	radioimunoensaio
RIT	radioiodoterapia
RNA	ácido ribonucléico

RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia da polymerase via transcriptase reversa
rpm	rotações por minuto
UA	unidades arbitrárias

Lista de figuras

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,5% de algumas amostras de RNAs

Figura 2: Amplificação dos genes GAPDH, HPRT1, β G, TG.

Figura 3: Gráfico de denaturação (curva de Melting) para os fragmentos amplificados dos genes GAPDH, HPRT1, β G e TG.

Figura 4: curva padrão de amplificação do gene β G ($R^2=0,99079$; $E=0,86429$).

Figura 5: curva padrão de amplificação do gene HPRT1 ($R^2=0,99213$; $E=0,91677$).

Figura 6: curva padrão de amplificação do gene GAPDH ($R^2=0,98855$; $E=1$).

Figura 7: Valores de expressão gênica (em CT) dos genes HPRT1, β G e GAPDH de amostras de RNA de sangue periférico de indivíduos normais.

Figura 8: Valores de expressão gênica (em CT) dos genes HPRT1, β G e GAPDH de amostras de RNA de sangue periférico de indivíduos normais após purificação em coluna.

Figura 9: correlação do logaritmo da concentração de amostra e o Δ CT dos genes TG e HPRT1.

Figura 10: correlação do logaritmo da concentração de amostra e o Δ CT dos genes TG e GAPDH.

Figura 11: correlação dos valores de amplificação (CT) entre os genes GAPDH e HPRT1 em amostras de indivíduos controles normais ($r=0,34$).

Figura 12: concentrações de TSH antes e após a RIT de todos os pacientes (média \pm DP).

Figura 13: concentrações de T4L antes e após a RIT de todos os pacientes (média \pm DP).

Figura 14: Correlações de Spearman dos valores das concentrações de RNAm-TG_{GAPDH} e de RNAm-TG_{HPRT1} de todas as amostras ($p=0,001$; $r=0,6$).

Figura 15: Estadio clínico em relação aos valores de RNAm-TG_{GAPDH}. Valores expressos em Unidades Arbitrárias (UA). SM: pacientes sem

metástase; MG: pacientes com metástase ganglionar; MD: pacientes com metástase à distância.

Figura 16: Estadio clínico em relação aos valores de RNAm-TG_{HPRT1}. Valores expressos em Unidades Arbitrárias (UA). SM: pacientes sem metástase; MG: pacientes com metástase ganglionar; MD: pacientes com metástase à distância.

Figura 17: estadio clínico em relação à concentração de TGs ao longo do tempo. Resultados expressos em log da concentração sérica de TG (IRMA). SM: pacientes sem metástase; MG: pacientes com metástase ganglionar; MD: pacientes com metástase à distância.

Figura 18: concentração de RNAm-TG_{GAPDH} em amostras de pacientes SM, com MG e MD na presença de Acs anti-TG e níveis de TSH \geq 30 μ U/mL.

Figura 19: concentração de RNAm-TG_{HPRT1} em amostras de pacientes SM, com MG e MD na presença de Acs anti-TG e níveis de TSH \geq 30 μ U/mL.

Figura 20: concentração de TGs em amostras de pacientes SM, com MG e MD na presença de Ac anti-TG e níveis de TSH \geq 30 μ U/mL. (*p=0,0001 **p=0,0127 e ***p=0,0023).

Figura 21: concentração de RNAm-TG_{GAPDH} de amostras com TGs indetectável, em pacientes SM e com MG. Os pacientes com MD não tiveram TGs indetectável.

Figura 22: concentração de RNAm-TG_{HPRT1} de amostras com TGs indetectável, em pacientes SM e com MG. Os pacientes com MD não tiveram TGs indetectável.

Figura 23: Curva ROC para RNAm-TG_{GAPDH} segundo categorias de TG.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes estudados.

Tabela 2: Valores de expressão gênica (em CT) dos genes HPRT1, β G e GAPDH de amostras de RNA de sangue periférico de indivíduos controles normais.

Tabela 3: Valores de expressão gênica (em CT) dos genes HPRT1, β G e GAPDH de amostras de RNA de sangue periférico de indivíduos controles normais após purificação em coluna.

RESUMO

O carcinoma diferenciado de tireóide (CDT) abrange 95% de todas as doenças malignas da tireóide. Nos EUA, aumentou em 2,4 vezes nos últimos anos (1973-2002). O seu tratamento inclui tireoidectomia total, seguido por terapia com radioiodo e supressão do TSH com L-tiroxina. A doença pode recidivar em ~20% dos casos, sendo necessária avaliação periódica através de exames de imagens e dosagem de tireoglobulina sérica (TGs). Os Anticorpos (Acs) anti-TG podem ser detectados em 15 a 25% dos pacientes, comprometendo, parcialmente, o uso da TGs como marcador de recidiva do câncer. Um método alternativo proposto para monitorar os pacientes é a detecção de células tireoidianas em sangue periférico, através da mensuração do RNA mensageiro de TG (RNAm-TG) pela técnica de RT-PCR em tempo real. Esta nova metodologia aumenta a sensibilidade da detecção desta molécula. O objetivo deste estudo é verificar a significância da quantificação do RNAm-TG, como método diagnóstico complementar no acompanhamento a longo prazo de pacientes com CDT. Amostras de sangue de 45 pacientes (25 sem metástase, 14 com metástase ganglionar e 6 com metástase à distância) foram coletadas nos tempos: antes e 24, 48, 72 horas, 7 dias, 1, 3, 6, 9 meses, 1, 2, 4, 5, 6 e 7 anos após a dose ablativa de radioiodo. Foi realizada extensiva padronização da técnica com a finalidade de excluir interferências metodológicas, empregando dois genes controles interno (GAPDH e HPRT1) para o cálculo da concentração do RNAm-TG. Concomitantemente foi realizada a mensuração de TGs, perfil hormonal e de anticorpos anti-TG. A pesquisa de corpo inteiro, realizada 7 dias após a dose terapêutica, estabeleceu o estadio clínico inicial dos pacientes. Não foi possível estabelecer um valor de corte para o RNAm-TG. O RNAm-TG não diferenciou os estadios clínicos da doença ao longo do tempo, independente do gene controle interno utilizado, e tampouco quando analisaram-se os dados na presença de Acs anti-TG e $TSH \geq 30 \text{ ng/mL}$. A TGs diferenciou os estadios clínicos ao longo do tempo. Concluiu-se que, o RNAm-TG não é um bom marcador de recidiva do CDT, mesmo quando considerou-se critérios de padronização da técnica, avaliação em longo prazo e presença de Acs anti-TG, sendo assim não poderia ser utilizado como método diagnóstico complementar no acompanhamento de pacientes com CDT. Este estudo demonstra que a técnica de RT-PCR em tempo real é muito sensível perdendo especificidade, inviabilizando sua utilização no acompanhamento dos pacientes com CDT.

Descritores: tireoglobulina, RNA mensageiro, reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa, neoplasias da glândula tireóide, radioisótopos do iodo/uso terapêutico.

SUMMARY

The differentiated thyroid carcinoma (DTC) encloses 95% of all thyroid malignant disease. In USA, it increased 2,4 times in recent years (1973-2002). The treatment includes total thyroidectomy, ablation with radioiodine (RAI) followed by TSH suppression with L-Thyroxine. The cancer recurrence occurs in 20% of the cases. Periodic evaluation through imaging examinations and serum thyroglobulin (TG) measurements by immunoassays method is recommended for careful follow-up of these patients. The anti-TG antibodies prevalence is 15-25% and would impair, partially, the serum TG use as a tumor marker. An alternative method to identify the recurrence of the tumor is the thyroid cells detection in peripheral blood, through the TG messenger RNA quantification (mRNA-TG) by real time RT-PCR. This new methodology increases the sensitivity detection for this molecule. The objective of this study was to verify the mRNA-TG peripheral blood quantification significance, as a complementary diagnostic method in the long term follow up of patients with DTC. Forty five blood samples from patients with DTC have been collected before and 24, 48, 72 hours, 7 days, 1, 3, 6, 9 months, 1, 2, 4, 5, 6 and 7 years after the ablation therapy. Extensive technique standardization for mRNA-TG measurements was carried out to exclude methodological interventions and two housekeeping genes (GAPDH and HPRT1) were used to calculate the mRNA-TG concentrations. Concomitantly, serum TG measurements, hormonal profile and antibodies anti-TG assays were performed. The whole body scan was performed 7 days after RAI ablation to determine the stage of the disease. It was not possible to establish a cut-point value for mRNA-TG. The mRNA-TG did not differentiated the clinical stage of the disease in the long term follow-up and neither in the presence of anti-TG antibodies and $TSH \geq 30 \text{ ng/mL}$. Serum TG was able to differentiate the clinical stage of the patients during the follow-up. In conclusion mRNA-TG is not a good marker for the DCT recurrence, even when technical standardization, long term evaluation and the presence of antibodies anti-TG were considered. Thus it could not be used as a complementary diagnostic method in the DTC patients follow-up. This study confirmed the high sensitivity of the real time RT-PCR whereas with very low specificity, consequently is unviable to be used in the DTC patients follow-up.

Descriptors: thyroglobulin, RNA messenger, reverse transcriptase polymerase chain reaction, thyroid neoplasms, iodine radioisotopes /therapeutic use.

I. INTRODUÇÃO

Carcinoma Diferenciado de Tireóide

O carcinoma diferenciado de tireóide (CDT) é a mais freqüente doença maligna endócrina abrangendo 95% de todas as doenças malignas da tireóide. Os CDT podem ser classificados em dois tipos histológicos distintos: papilíferos e foliculares que, em regiões com ingestão suficiente de iodo, correspondem a 80% e 10% de todos os carcinomas de tireóide, respectivamente (Bellantone, *et al.*, 2001; Parthasarathy *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006).

A incidência do câncer de tireóide vem aumentando em muitos países nos últimos 30 anos (de 3,6/100.000 em 1973 para 8,7/100.000 em 2002, nos EUA, o que significa um aumento de 2,4 vezes).

Este aumento de 5,1/100.000 na incidência dos cânceres de tireóide, é devido ao aumento da incidência dos cânceres papilares, (2,7 para 7,7/100.000 habitantes neste período). Este fato deve-se principalmente à maior detecção de pequenos carcinomas e melhora na acurácia do diagnóstico (ultrassonografia e Punção por Agulha Fina). Apesar desse aumento, a taxa de mortalidade manteve-se estável durante estes 30 anos (1973-2002), sendo de aproximadamente 0,5 mortes por 100.000 habitantes. A sobrevida, de 20 anos, para o câncer papilífero é de 95% e para o câncer folicular é de 70 a 80% (Davies *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2006; Pacini *et al.*, 2008). Quando diagnosticados precocemente, são curáveis na maioria dos casos, mas quando recidivam, podem causar significativa morbidade e

mortalidade, especialmente quando se detecta presença de metástases no início do diagnóstico (Rosário *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006).

As metástases são, na maioria das vezes, ganglionares. As lesões extra-cervicais representam até 30% das recidivas e são, em sua maioria, pulmonares e, menos comumente ósseas. Estas últimas apresentam um pior prognóstico (Ditkoff *et al.*, 1996; Rosário *et al.*, 2004).

O tratamento de câncer de tireóide inclui tireoidectomia total, tratamento actínico (terapia com radioiodo – I^{131}) e reposição hormonal com L-Tiroxina, tendo o cuidado de manter o TSH suprimido por um longo período. A recidiva da doença que pode aparecer em 20 a 40% dos casos, na maioria das vezes, é cervical e geralmente ocorre nos três primeiros anos após a tireoidectomia. Por isso, é necessário avaliar os pacientes periodicamente, através de exames de imagens (pesquisa de corpo inteiro – PCI e Ultrassonografia - USG) e dosagens de tireoglobulina sérica (TGs) pelo método imunofluorimétrico. Em uma minoria dos casos a recorrência local ou distante pode se desenvolver após muitos anos do tratamento inicial (Spencer *et al.*, 1996; Ringel *et al.*, 1999; Savagner *et al.*, 2002; Frasoldati *et al.*, 2003; Pacini *et al.*, 2008). De acordo com a literatura, a dosagem da TGs é mais sensível que a PCI e pode identificar recidiva da doença precocemente. A TGs $>2 \mu\text{g/L}$ (após estímulo com TSH) é recomendada como um teste suficientemente sensível no acompanhamento destes pacientes (Mazzaferri *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2006).

Apesar dos cânceres de tireóide, em geral, serem tratáveis e de bom prognóstico, é necessário um constante monitoramento clínico,

principalmente nos casos em que se detecta presença de anticorpos anti-tireoglobulina (Acs anti-TG), ou ainda naqueles casos em que não ocorre a elevação desejada do TSH, mesmo após a retirada da levotiroxina (Rosário *et al.*, 2005; Milas *et al.*, 2007). Desta forma, a identificação de marcadores para a patogênese do câncer, pode contribuir com o diagnóstico precoce de metástases e colaborar com o tratamento clínico. A partir daí, vários pesquisadores têm se empenhado em encontrar aquele marcador que melhor reproduz a atividade da doença recorrente.

Tireoglobulina Sérica

A Tireoglobulina (TG), proteína sintetizada por células foliculares de tireóide, é codificada por gene de pelo menos 300 kb localizado no cromossomo 8, que contém 48 exons. A TG é uma glicoproteína homodimérica de 660 kDa, formada por 2 subunidades idênticas, unidas por ligação não-covalente, podendo apresentar-se de forma heterogênea em decorrência de processamento alternativo (*splicing* alternativo) do seu RNAm (Mendive *et al.*, 2001).

A TG sérica (TGs) é um marcador muito útil para detectar tecido tireóideo residual, recorrente ou metastático em pacientes com CDT, principalmente quando dosado após elevação do TSH pela suspensão da L-Tiroxina. Apesar da sua utilidade, a técnica pode apresentar algumas dificuldades que diminuem sua utilidade clínica conforme comentado por Spencer *et al.*, 1998 e 1999:

a) sensibilidade insuficiente de alguns estojos comerciais: pelo uso de coeficiente de variação interensaio de 20%, o que limita a detecção de níveis reduzidos de TGs, como por exemplo, em uma recorrência inicial do CDT;

b) efeito “gancho” quando a concentração de TG é muito alta: isso acontece principalmente nos ensaios imunométricos – IRMA, onde parte da proteína é levada na etapa de lavagem do ensaio;

c) grande variação inter-ensaio: ocorre pela mudança de reagentes e instrumentos de calibração, já que o intervalo do acompanhamento destes pacientes varia de 6 a 12 meses, uma variação de 2 para 4 ng/mL poderia representar uma duplicação da carga tumoral;

d) diferenças na padronização: muitos métodos de dosagem de TGs não são padronizados pelo *“European Community Bureau of Reference - CRM-457”*;

e) interferência de Ac anti-TG: leva a resultados falso-negativos.

O estímulo do TSH endógeno aumenta a sensibilidade na detecção desta proteína. No entanto, a interrupção da reposição hormonal, que leva o paciente ao hipotireoidismo, pode trazer conseqüências como a sensível queda na qualidade de vida, podendo afastar o paciente das suas atividades além da possibilidade de estimular o crescimento de células tumorais (Guasti *et al.*, 2007; Regalbuto *et al.*, 2006; Robbins *et al.*, 2006; Botella *et al.*, 2005).

Algumas modificações têm sido introduzidas nas técnicas de dosagem de TGs e no preparo do paciente, para assim tentar solucionar os problemas citados. Um exemplo é que radioimunoensaios (RIA) foram

substituídos por ensaios imunométricos mais sensíveis (IRMA). Os RIAs podem ser mais susceptíveis à interferência dos Acs anti-TG, enquanto os métodos IRMA têm melhor sensibilidade, períodos curtos de incubação e são mais fáceis de automatizar (Zophel *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 1998; Feldt-Rasmussen *et al.*, 1996).

Além disso, também foi introduzido o uso do TSH humano recombinante, para elevar as concentrações de TSH circulante capaz de estimular a síntese de TG, mas sem o desconforto causado pela interrupção da L-Tiroxina. Apesar de o TSH endógeno levar a níveis mais elevados de TG, do que os obtidos após estímulo com TSH recombinante, as duas metodologias são comparáveis quanto à sensibilidade (Pacini *et al.*, 2006; Bárbaro *et al.*, 2003; Pacini *et al.*, 2002; Robbins *et al.*, 2001).

Todavia a interferência do Ac anti-TG ainda não foi solucionada e representa um significativo obstáculo na dosagem de TGs (Torrens & Burch, 2001 e Spencer, 2004).

Há três variáveis que podem afetar os níveis de TGs no organismo: 1) a massa de tecido tireoidiano presente (benigno ou neoplásico), sendo o fator dominante na vigência de terapia supressiva com LT4; 2) o grau de estímulo do receptor de TSH e 3) a habilidade intrínseca do tumor em sintetizar e secretar TG.

O principal fator que influencia na concentração de TGs é a concentração de TSH sérico, apesar de sua secreção não ser totalmente dependente do TSH (administração de iodo, radioiodo e drogas anti-tireóide também elevam os níveis de TGs). Mesmo assim, o grau de resposta da TG

ao estímulo pelo TSH no tecido neoplásico é altamente variável de tumor para tumor (Spencer *et al.*, 1999; Gardner *et al.*, 1979).

Anticorpos Anti-Tireoglobulina

A tireoidectomia total, com posterior ablação de restos tireoidianos com radioiodo, pode levar a total eliminação de produção de TG e, conseqüentemente, da produção de Ac anti-TG devido à eliminação do tecido produtor do antígeno, portanto, os Ac devem diminuir gradativamente da circulação até desaparecer por completo. Sendo assim, a persistência de Acs anti-TG na circulação, por um longo período ou a sua elevação, sugere que há presença de tecido produtor de TG e, neste caso, alta probabilidade de metástase (Chiovato *et al.*, 2003).

Aproximadamente 15 a 25% dos pacientes com CDT apresentam Acs anti-TG circulantes, quando comparado com a população geral (11%) (Spencer, 2004 e Robbins & Schlumberger, 2005).

Há mais de trinta anos, é consenso que há interferência do Ac anti-TG na dosagem da TGs pelos ensaios imunométricos (IRMA) utilizando Acs monoclonais ou RIA (radioimunoensaios) com duplo Ac. A presença de Acs anti-TG é considerado o problema técnico mais sério que compromete o uso da TGs como marcador de recidiva do CDT (Spencer *et al.*, 2005; Spencer *et al.*, 1998; Coelho *et al.*, 2006).

Spencer e colaboradores (1998), avaliaram a interferência clínica e laboratorial dos Acs anti-TG nos valores de TGs, mostrando que a interferência dos Acs acontece tanto com seus títulos altos quanto baixos. Pacientes com metástases à distância e TGs indetectável ou pacientes

aparentemente livres da doença e sem remanescentes tireoidianos foram identificados entre os casos com Ac anti-TG positivo. A magnitude da interferência dos Acs na dosagem sérica da TG depende da afinidade e capacidade de ligação do Ac endógeno e também do ensaio utilizado para medida da TG. A técnica de RIA vem sendo substituída pela técnica de IRMA por ser mais sensível, mais rápida, portanto laboratorialmente mais prática e por melhorar a precisão interensaio, detectando o efeito gancho, (Spencer *et al.*, 1996).

RNA mensageiro de Tireoglobulina: um método alternativo

Um método alternativo proposto para identificar a recorrência da doença tireoidiana é a detecção de tireócitos circulantes em sangue periférico, através da mensuração de RNA mensageiro (RNAm) de TG (RNAm-TG) por RT-PCR. Através da técnica de citometria de fluxo, Ringel e colaboradores (1998) detectaram RNAm-TG em sangue periférico, sugerindo a presença de células tireoidianas na circulação. Descobriu-se que há aproximadamente, três células epiteliais tireoidianas por mililitro de sangue de indivíduos normais. O mesmo grupo, utilizando a metodologia de extração de RNA total, mostrou que o emprego do RT-PCR em tempo real aumenta a sensibilidade da detecção do RNAm-TG podendo indicar a presença de tecido residual, informação de grande valor no seguimento dos pacientes com câncer de tireóide.

Após estes trabalhos pioneiros, vários outros estudos foram realizados empregando técnicas quantitativas ou semi-quantitativas de RT-

PCR para detecção de RNAm-TG em sangue periférico. Alguns autores mostraram resultados favoráveis ao uso da quantificação do RNAm-TG para o acompanhamento destes pacientes:

- Mostrando que o RNAm-TG varia de acordo com o tipo histológico do CDT: Tallini *et al.*, 1998; Biscolla *et al.*, 2000; Bellantone *et al.*, 2001;
- Empregando a técnica de semi-quantificação por RT-PCR: Fugazzola *et al.*, (2002); Karavitaki *et al.*, 2005; Kaczka *et al.*, 2005;
- Empregando a técnica de quantificação por PCR em tempo real: Ringel *et al.*, 1999; Wingo *et al.*, 1999; Fenton *et al.*, 2001, Savagner *et al.*, 2002;
- Identificação de metástase através da PCI correlacionando-se melhor com o RNAm-TG do que com sua dosagem sérica: Grammatopoulos *et al.*, 2003.

No entanto, outros pesquisadores apresentaram resultados com valores de RNAm-TG não concordantes entre o estadio da doença:

- Empregando a técnica de semi-quantificação por RT-PCR: Bojunga *et al.*, 2000, Bugalho *et al.*, 2001 e Chinnappa *et al.*, 2004;
- Empregando a técnica de quantificação por RT-PCR em tempo real: Takano *et al.*, 2001; Eszlinger *et al.*, 2002; Span *et al.*, 2003; Kaufmann *et al.*, 2004, Verburg *et al.*, 2004 e Elisei *et al.*, 2004.

Outros genes também vêm sendo estudados com esta finalidade. Foi demonstrado, através da quantificação do RNAm do simportador de sódio e iodeto (NIS) por RT-PCR, que este gene não seria um marcador tão sensível quanto o RNAm-TG (Biscolla *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2003). O outro gene estudado é o receptor de TSH (rTSH). Chia e colaboradores (2007) mostraram que o RNAm do rTSH poderia ser detectado em sangue periférico com sensibilidade e especificidade comparável com o RNAm-TG. Outros estudos com o gene rTSH mostraram resultados positivos, mas apresentaram problemas técnicos que poderiam estar interferindo nas conclusões (Milas *et al.*, 2007). Apesar de Ishikawa *et al.*, 2006, mostrarem que a expressão do RNAm do rTSH é tecido-específica, discute-se a hipótese improvável se seria encontrada também em adipócitos e linfócitos (Francis *et al.*, 1991 e Endo *et al.*, 1995).

É consenso entre os pesquisadores da área que estes resultados conflitantes orientam para a necessidade de novos estudos com a finalidade de verificar a real importância desta metodologia no seguimento destes pacientes para o diagnóstico de metástases regionais e à distância. Também seria necessário definir o significado da elevação do RNAm-TG e seus valores de corte para poder realizar interpretações corretas da sua elevação em pacientes que não mostram evidência de recidiva da doença. Cabe mencionar que nenhum dos trabalhos publicados até o momento realizou um seguimento de pacientes operados por câncer de tireóide, através da quantificação do RNAm-TG por um longo do tempo. Em todos os casos

estudou-se somente um determinado período do acompanhamento clínico dos pacientes (Elisei *et al.*, 2004).

II. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi:

- Quantificar o RNAm-TG, em sangue periférico de pacientes com câncer de tireóide, através da técnica de RT-PCR em tempo real, para verificar sua significância como método diagnóstico complementar no acompanhamento destes pacientes, a longo prazo.

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Um total de 45 pacientes com CDT, atendidos na Unidade de Tireóide da Disciplina de Endocrinologia ou Disciplina de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram incluídos neste estudo. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de cada um dos pacientes.

A maioria era do sexo feminino (82%; 37/45) e 18% (8/45) do sexo masculino. A idade dos pacientes variou de 20 a 81 anos de idade (média: 47,8 anos). Todos haviam sido submetidos à tireoidectomia total e encaminhados para tratamento ablativo com radioiodo.

No início do projeto tinham sido incluídos no estudo, 54 pacientes. Por diferentes motivos, como: procura de outro serviço, mudança de endereço, desistência do protocolo de pesquisa ou não comparecimento às consultas, nove pacientes não continuaram o protocolo. Os pacientes 24-DCM, 39-MAS e 43-ALB foram a óbito no transcurso do estudo.

Dentre os quarenta e cinco pacientes, a maioria apresentava carcinoma papilífero (69%) e 27% carcinoma folicular de acordo com o resultado do anátomo-patológico. Não foi possível ter acesso ao laudo de dois pacientes (4%).

Os pacientes apresentavam os seguintes estádios clínicos da doença ao diagnóstico (pela PCI de 7 dias após RIT) :

- sem metástase (N0M0): n= 25 (57%)
- metástase ganglionar (N1): n= 14 pacientes (30%)
- metástase à distância (M1): n= 6 (13%)

Durante o acompanhamento a longo prazo, o estadiamento clínico de alguns pacientes mudou. Um paciente M1 foi reclassificado como SM 1 ano após RIT. Dos pacientes com MG, sete deles mudaram para o estadio clínico SM, respectivamente: três após 1 ano da RIT, 1 após 4 anos, 1 após 5 anos, 1 após 6 anos, 1 após 7 anos e 1 paciente mudou para o estadio MD 3 anos após RIT. Os pacientes SM não apresentaram mudança de estadio clínico durante o acompanhamento.

Os pacientes receberam doses de radioiodo entre 100mCi e 400mCi, conforme determinação do serviço de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da FMUSP. Todos os pacientes foram orientados a suspender o uso da L-tiroxina de 3 a 4 semanas antes do tratamento com radioiodo, com o intuito de elevar os níveis de TSH (>30 uU/mL) (Cooper *et al.*, 2006) e assim aumentar a captação do radionuclídeo. A dose de radioiodo foi estabelecida após realização de Pesquisa de Corpo Inteiro (PCI)/Captação antes da dose terapêutica de radioiodo. Após o tratamento, os pacientes foram submetidos a exames de sangue e PCI aproximadamente 7 dias após.

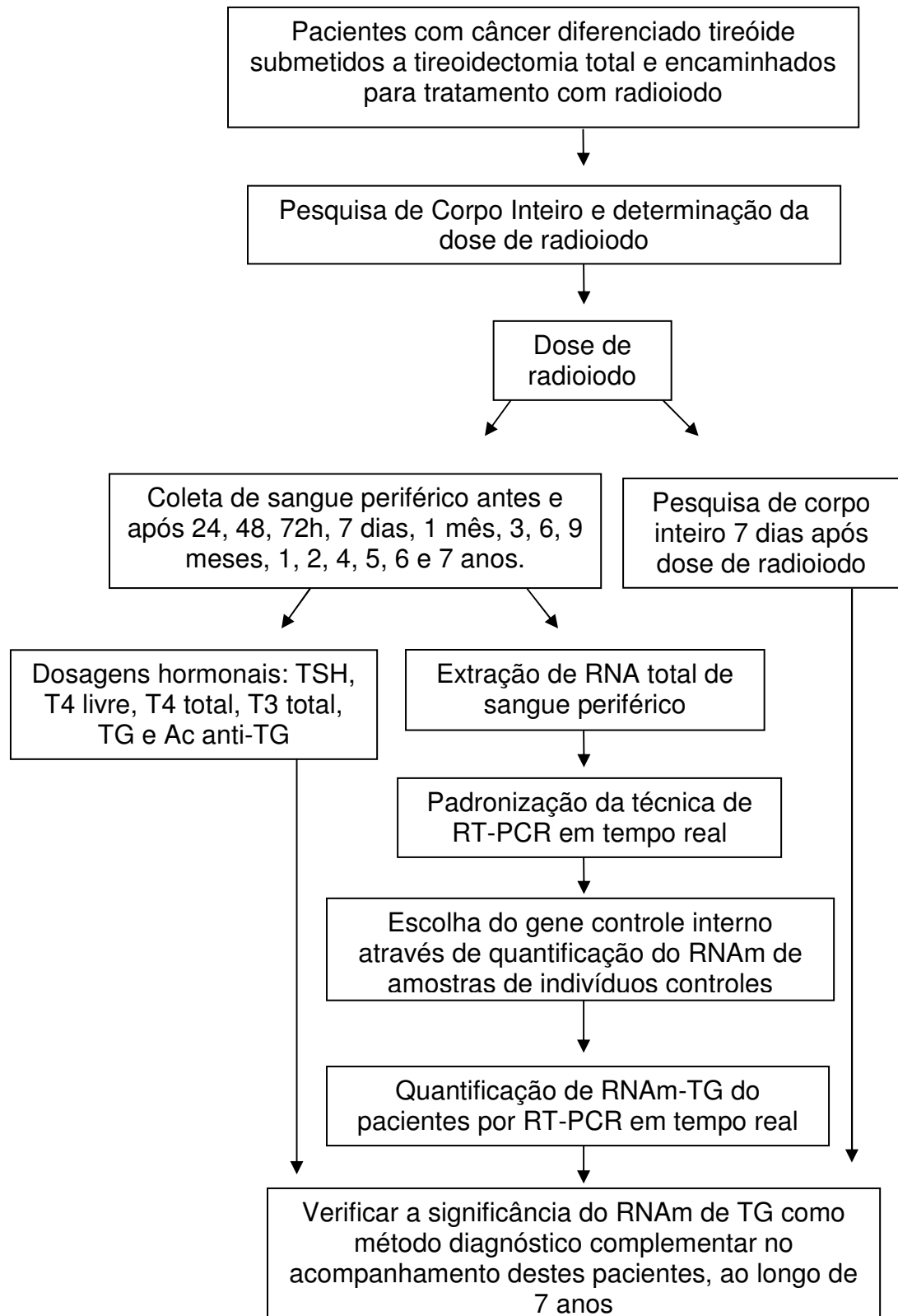
Durante o estudo, 6 pacientes foram submetidos a uma segunda dose de radioiodo. A paciente 36-NMS, a qual apresentava MG ao diagnóstico,

recebeu a segunda dose após 3,5 anos do início do estudo, quando desenvolveu MD. A paciente 40-BLS (MD), recebeu a segunda dose 1,5 anos após, 42-IOS (MD) após 1 ano e 2 meses, 26-MOF (MG) após 4 anos, 32-VON (SM ao diagnóstico, mas com desenvolvimento de MD após 5 anos) recebeu a segunda dose 6 anos e 3 meses após e a paciente 44-FFC (MD) após 1 ano e 5 meses. Duas pacientes foram incluídas no estudo quando iriam receber uma segunda dose do radioiodo (10-MAK e 12-APC). No momento da inclusão, ambas apresentavam apenas restos tireoidianos.

As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas nos seguintes períodos: basal (antes da RIT) e após 24, 48, 72 horas, 7 dias, 1, 3, 6, 9 meses, 1, 3, 4, 5, 6 e 7 anos. A coleta foi feita em seringa seca e o sangue imediatamente adicionado no trizol. No mesmo momento, coletou-se sangue para dosagens séricas dos hormônios tireoidianos (TSH, T3, T4, T4L), Tg sérica (IRMA) e Acs anti-TG (RIA) (conforme fluxograma).

Foram utilizadas também amostras de RNA total de sangue periférico de 12 indivíduos, sem doença maligna tireoidiana, como controles normais.

Fluxograma



MÉTODOS

Coleta de sangue para extração de RNA total

Foram colhidos 2 mL de sangue periférico em seringa seca de cada paciente, em cada tempo do estudo. Transferiu-se 1 mL sangue para tubo Falcon contendo 3 mL de TRI Reagente (Invitrogen). Imediatamente após, os tubos foram vigorosamente agitados durante 30 segundos.

Estas amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da extração de RNA total.

Extração de RNA total do sangue periférico

Adicionou-se 800 μL de clorofórmio ao tubo Falcon contendo 1 mL de sangue e 3 mL de Trizol. Agitou-se vigorosamente por 15 segundos e incubou-se a temperatura ambiente (25°C) por 15 minutos. Posteriormente, todo o material foi transferido para tubos tipo *Eppendorf* de 2,0 mL que foram centrifugados a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C . A fase aquosa foi transferida para novo tubo Falcon de 15 mL o qual continha 2,5 mL de álcool isopropílico, agitou-se gentilmente e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Transferiu-se este material para outro tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL e centrifugou-se a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C . Desprezou-se a fase líquida e adicionou-se 1000 μL de etanol a 70% (preparado com água Depec 0,04%). Após agitação, centrifugou-se novamente a 7.500 rpm por 5 minutos a 4°C . Desprezou-se o sobrenadante e, depois de seco, o RNA foi ressuscitado em 50 μL de água Depec. O material foi conservado a -80°C até a reextração.

Reextração do RNA total

Nos tubos contendo RNA adicionou-se 750 μL de Trizol, agitou-se vigorosamente e incubou-se a temperatura ambiente por 15 minutos. Adicionou-se 200 μL de clorofórmio com posterior agitação por 15 segundos. Após a incubação por 15 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se o material por 15 minutos, a 12.200 rpm a 4°C. Transferiu-se a fase aquosa para tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL, adicionou-se 500 μL de álcool isopropílico, agitou-se gentilmente e incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C o sobrenadante foi descartado. Etanol 70% foi adicionado e centrifugou-se novamente por 5 minutos a 12.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi removido e o excesso do álcool foi retirado com pipeta. Depois de seco, o RNA foi ressuspendido em 50 μL de água Depc e armazenado no freezer - 80°C até sua utilização.

Quantificação do RNA total

A quantidade e pureza do RNA foram avaliadas através de espectrofotometria no aparelho GeneQuant Pro (Pharmacia Biotech, Cambridge). A absorbância das amostras foi medida nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm, sendo que $\text{DO}_{260}=1$ corresponde a 40ng/ μL de concentração. Foi considerado RNA de boa qualidade quando a razão $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$, era 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989).

Avaliação da integridade do RNA

Para avaliar a integridade do RNA realizou-se eletroforese em gel de agarose 1,5% em solução tampão de TAE 1X e 0,001mg/mL de brometo de etídio. A visualização das bandas que correspondem ao RNA 28S e RNA 18S indica assim a boa qualidade da amostra (figura 1).

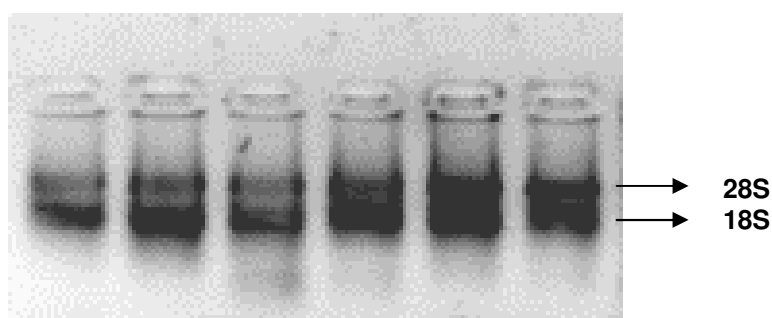


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,5% de amostras de RNAs.

Purificação do RNA

As amostras de RNA dos indivíduos controles normais foram desalinizadas empregando-se as colunas *Centricon -10 concentrators* (Amicon) seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante.

Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada no aparelho: PTC-100 (MJ Research Inc. EUA), empregando-se: 2 μ L de *Random* hexâmeros (50 μ M), 1 μ L de dNTP (10 mM) (Applied Biosystems, Branchburg, NJ), 1 μ g de RNA e água Depc q.s.p. 13,5 μ L. Após homogeneização, incubou-se a reação a 65°C por 5 minutos e em seguida a 4°C por mais de um minuto. Acrescentou-se 4 μ L de tampão da reação (*Buffer 5X*), 1 μ L de DTT (0,1 M), 1 μ L de *RNAse Out*

(20 U/ μ L) e 0,5 μ L de *Super Script III* RNA H transcriptase reversa (200 U/ μ L) (Invitrogen, Carlsbad, Ca). Incubou-se esta reação por 60 minutos a 50°C seguida por 15 minutos a 70°C. O cDNA foi aliquoteado e conservado a -20°C.

Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real

A quantificação da expressão do gene TG foi realizada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real, empregando-se o aparelho Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Austrália). A expressão gênica é calculada a partir do valor do *threshold cycle* (CT), número do ciclo em que a reação de PCR entra em fase exponencial, que é proporcional à quantidade de RNAm do gene em estudo.

Foi avaliada também a expressão gênica de GAPDH, HPRT1 e β G, considerados genes controles internos e utilizados para a normalização dos valores de expressão de TG. Todos os oligonucleotídeos iniciadores empregados eram homólogos a seqüências de exons consecutivos "*intron spanning primers*", para evitar amplificação de DNA genômico (Tabela 1).

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes estudados.

Gene	Iniciador "senso" Posição	Iniciador "antisenso" posição	Tamanho do amplificado (pb)	Referência
GAPDH	GCTGGCATTGCCCTCAACGA exon 8	GGCAGGGACTCCCCAGCAGT exon 9	187	Beillard <i>et al.</i> , 2003
HPRT1	TGACACTGGCAAACAATGCA exon 5	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT exon 6	92	Vandesompele <i>et al.</i> , 2002
β G	GAGAAGTCTGCCGTTACTGC exon 1	GGTGAGCCAGGCCATCACTA exon 2	214	Elenitoba-Johnson <i>et al.</i> , 2002
TG	GAGCCCTACCTCTTCTGGCA exon 10	GAGGTCCTCATTCTCAGCC exon 11	321	Savagner <i>et al.</i> , 2002

Os iniciadores do gene da TG foram escolhidos porque amplificam uma região entre os exons 10 e 11, na qual não foi identificado *splicing* alternativo (Savagner *et al.*, 2002).

A reação de PCR em tempo real inicialmente foi padronizada considerando-se os seguintes parâmetros: melhor temperatura de anelamento para cada gene, concentração final dos iniciadores, quantidade de magnésio e quantidade de cDNA. As melhores condições de amplificação foram: concentração de iniciadores de 300 nm para o gene TG e 600 nm para os genes GAPDH, HPRT1 e β G; concentração de cDNA de 1000 ng por reação e temperatura de anelamento de 62°C.

Todas as reações foram feitas em duplicatas num volume final de 15 μ L contendo: 1,0 μ L de cDNA; 7,5 μ L de *Absolute Syber Green (2X)* (Invitrogen, Carlsbad, CA); 0,45 μ L de cada iniciador "senso" e "antisenso" a 10 μ M (tabela 1). Incubou-se inicialmente por 20 segundos a 95°C e

posteriormente por 40 ciclos repetidos de 30 segundos a 62° C e 30 segundos de 72°C cada.

Nestas condições todos os genes foram amplificados eficientemente (figura 2) com curva de denaturação (curva de *Melting*) com único pico (figura 3) confirmando a especificidade da reação.

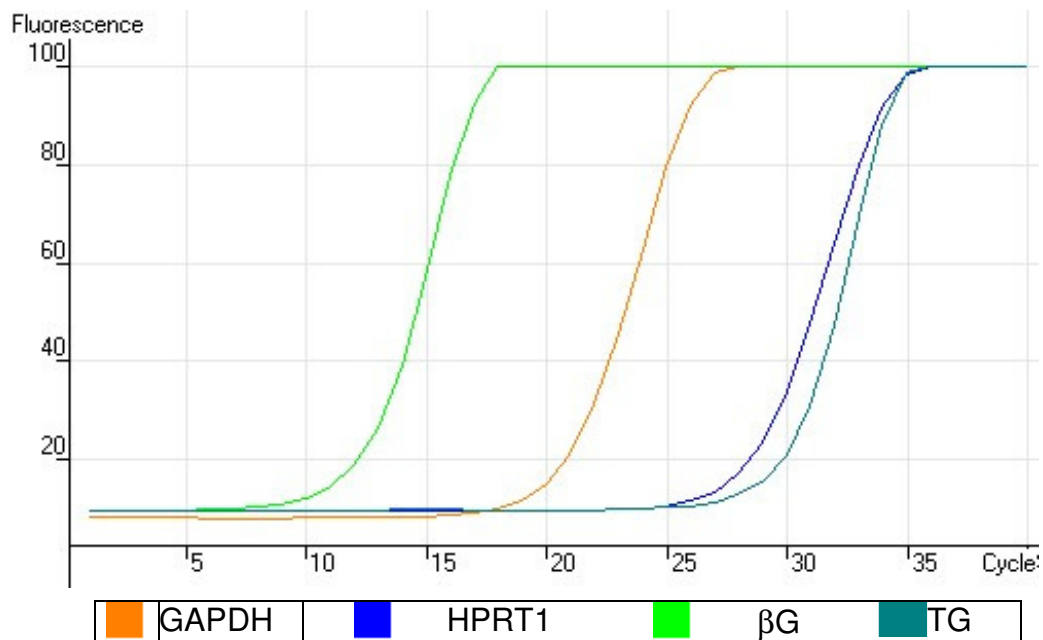


Figura 2: Amplificação dos genes GAPDH, HPRT1, β G, TG.

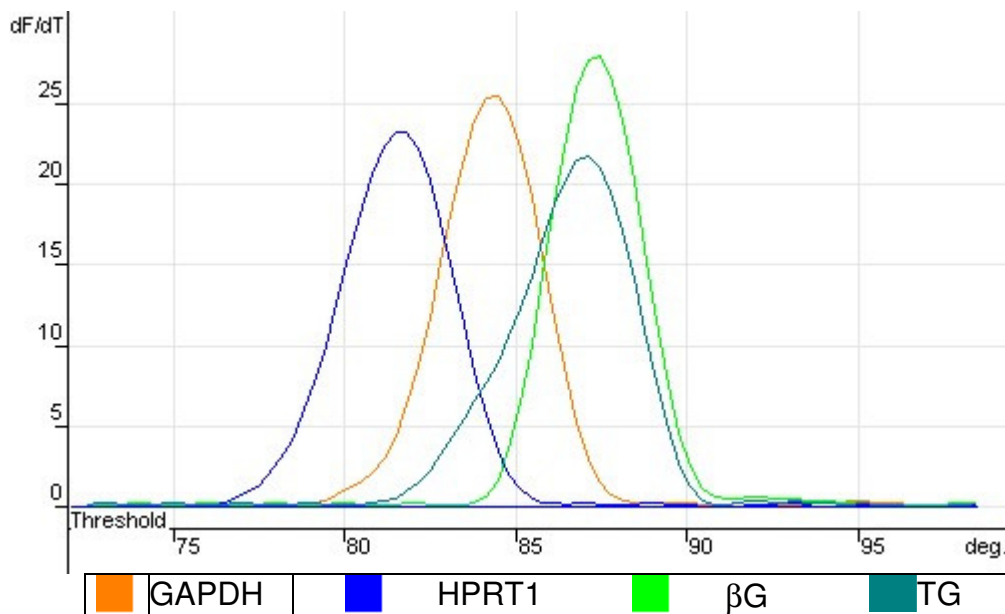


Figura 3: Gráfico de denaturação (curva de Melting) para os fragmentos amplificados dos genes GAPDH, HPRT1, βG e TG.

Estas análises evitaram a necessidade de tratamento do RNA com DNase.

Para completar a padronização das reações de PCR em tempo real de cada gene foi realizada curva padrão de concentração de cDNA, empregando-se diluição seriada de uma mesma amostra. Em todos os casos, as curvas apresentaram valor de coeficiente de correlação (R^2) e eficiência (E) próximos de 1. (Figuras 4; 5 e 6).

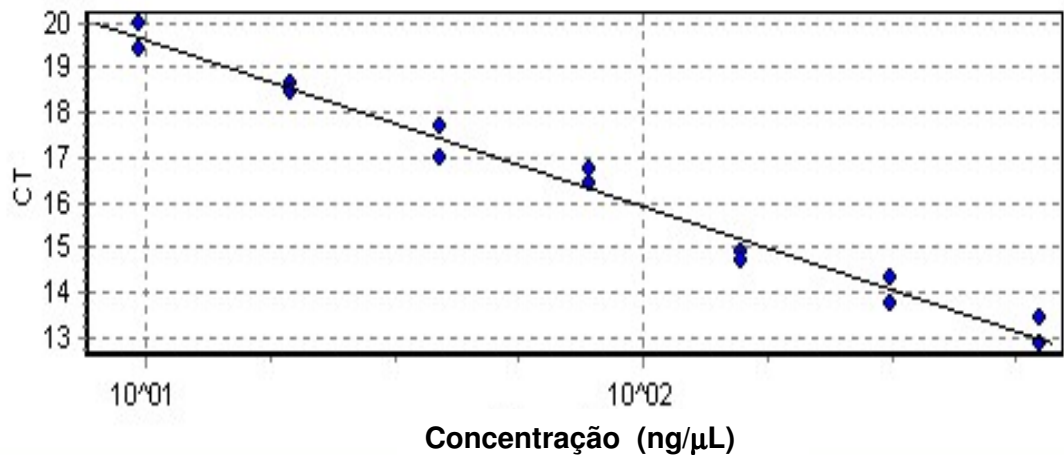


Figura 4: curva padrão de amplificação do gene β G ($R^2=0,99079$; $E=0,86429$).

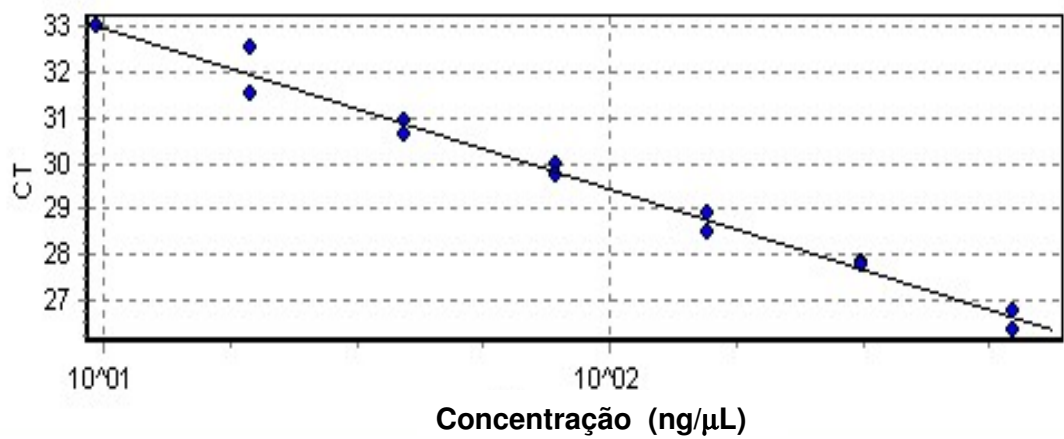


Figura 5: curva padrão de amplificação do gene HPRT1 ($R^2=0,99213$; $E=0,91677$).

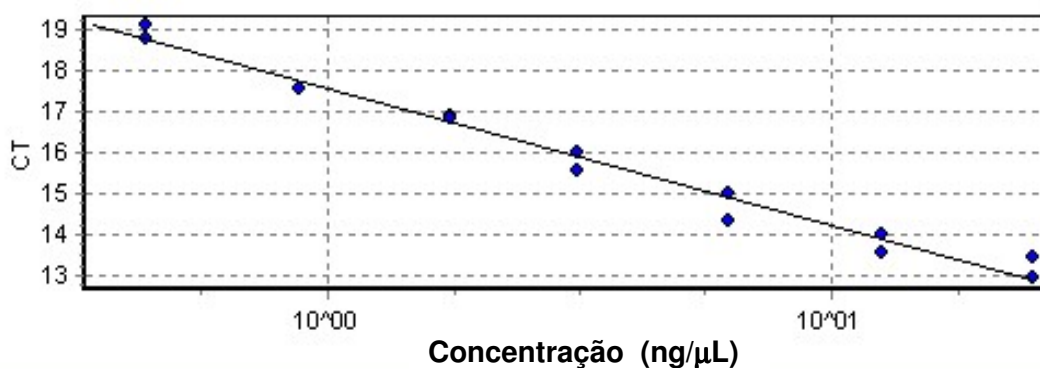


Figura 6: curva padrão de amplificação do gene GAPDH ($R^2=0,98855$; $E=1$).

Escolha do gene controle interno

Posteriormente, realizou-se a escolha dos genes controle interno a serem empregados no estudo. Para isso, foi avaliada a expressão dos genes, GAPDH, HPRT1 e β -Globina (β G) em amostras de RNA de sangue periférico de 12 indivíduos controles normais.

Verificou-se que o gene β G encontrava-se altamente expresso se comparado com os outros dois genes (média \pm DP do CT: β G 6,82 \pm 1,27, HPRT1: 24,59 \pm 0,93 e GAPDH: 18,19 \pm 2,23), sendo HPRT1 o gene com menor coeficiente de variação (CV): HPRT1: 3,78%; GAPDH: 12,26%; β G 18,63%) (tabela 2, figura 7).

Tabela 2: Valores de expressão gênica (em CT) dos genes HPRT1, β G e GAPDH de amostras de RNA de sangue periférico de indivíduos controles normais.

	GAPDH	HPRT1	β G
NORMAL 1	21,09	24	7,04
NORMAL 2	16	24,67	6,86
NORMAL 3	22,26	24,79	9,59
NORMAL 4	17,02	23,57	7,33
NORMAL 5	21,5	25,2	8,15
NORMAL 7	16,95	23,27	6,33
NORMAL 8	18,84	24,72	6,62
NORMAL 9	17,55	25,31	7,55
NORMAL 13	15,77	23,05	5,2
NORMAL 15	17,97	25,1	6,46
NORMAL 19	16,73	26,15	5,63
NORMAL 20	16,69	25,22	5,08
MÉDIA	18,20	24,59	6,82
DESVIO PADRAO	2,23	0,93	1,27
CV	12,26%	3,78%	18,63

CV: coeficiente de variação

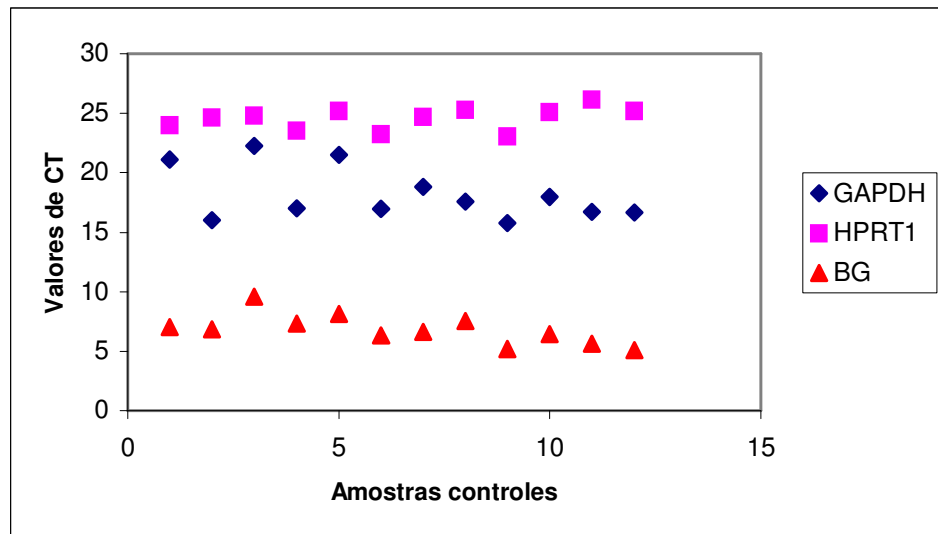


Figura 7: Valores de expressão gênica (em CT) dos genes HPRT1, β G e GAPDH de amostras de RNA de sangue periférico de indivíduos controles normais.

Para confirmar estes resultados e evitar erros devido à quantificação do RNA, as amostras foram dessalinizadas. Após a dessalinização das amostras de RNA, as médias dos valores de CT dos três genes mostraram-se mais homogêneos: β G: $10,54 \pm 0,61$; GAPDH: $21,85 \pm 0,93$ e HPRT1: $29,79 \pm 0,98$ (tabela 3, figura 8) com menor CV (HPRT1: 3,30; GAPDH: 4,16; β G: 2,27).

Tabela 3: Valores de expressão gênica em CT dos genes HPRT1, β G e GAPDH de amostras de RNA de sangue periférico de indivíduos normais após purificação em coluna.

	GAPDH	HPRT1	β G
NORMAL 1	21,17	30,32	10,77
NORMAL 2	21,31	30,81	11,12
NORMAL 4	20,74	29,95	10,8
NORMAL 7	21,71	29,75	10,86
NORMAL 8	22,53	30,85	10,74
NORMAL 9	22,51	30,36	10,56
NORMAL 10	21,45	29,5	10,48
NORMAL 11	23,05	29,29	9,21
NORMAL 12	-	28,51	9,8
NORMAL 14	20,37	28,89	10,31
NORMAL 17	22,38	28,06	11,57
NORMAL 20	23,16	31,22	10,33
MÉDIA	21,85	29,79	10,56
DESVIO PADRÃO	0,932	0,982	0,61
CV (%)	4,16	3,30	2,27

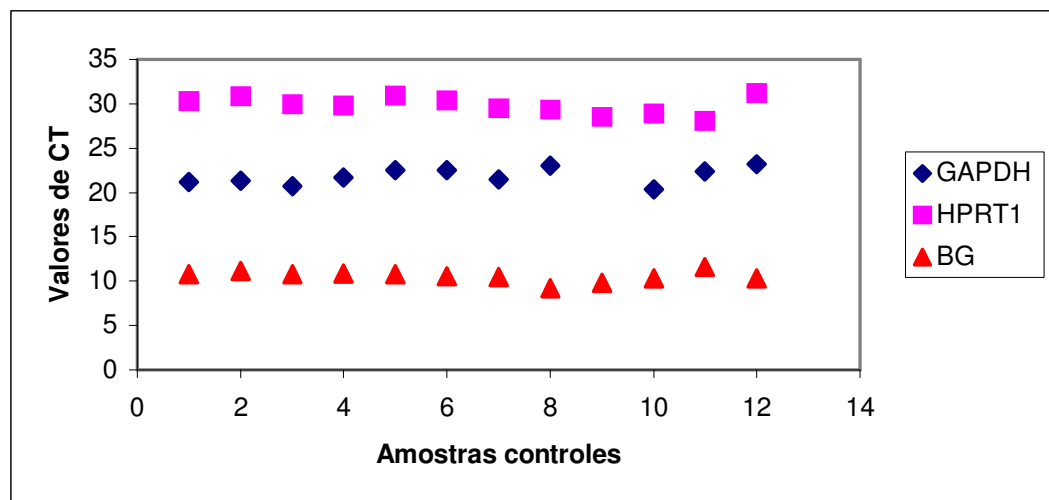


Figura 8: Valores de expressão gênica (em CT) dos genes HPRT1, β G e GAPDH de amostras de RNA de sangue periférico de indivíduos controles normais após purificação em coluna.

Estes resultados mostraram que a expressão gênica dos três genes foi mais homogênea após dessalinização das amostras. Contudo, como em

ambos os experimentos o CV foi menor que 20% (valor de CV limite), decidiu-se desenvolver o projeto com amostras não dessalinizadas.

Foram escolhidos como controles internos os genes: HPRT1, com expressão mais homogênea e GAPDH com valores de expressão semelhantes aos do gene em estudo (TG). O gene β G não foi utilizado por estar altamente expresso nas amostras estudadas, se comparado com os valores de expressão de TG.

Para determinar o método de cálculo do RNAm-TG, foi feita análise de correlação entre os valores de CT do gene TG e dos dois genes controle interno. Em ambos os casos, o coeficiente de inclinação da reta foi menor que 0,1 (em valores absolutos), confirmando que as eficiências de amplificação de todos os genes foram similares, o que permitiu o uso do método de análise $\Delta\Delta$ CT (Figuras 9 e 10) (*User Bulletin #2: ABI, 1997*). Para aplicação deste método, em todos os experimentos foi utilizado como calibrador uma mesma amostra de cDNA obtida a partir de RNA de sangue periférico de indivíduo não portador de doença tireoidiana. Os valores de concentração de RNAm-TG foram calculados como o quociente entre RNAm-TG e o RNAm de GAPDH ($\text{RNAm-TG}_{\text{GAPDH}}$) e entre o RNAm-TG e o RNAm de HPRT1 ($\text{RNAm-TG}_{\text{HPRT1}}$) e expressos em Unidades Arbitrárias (UA).

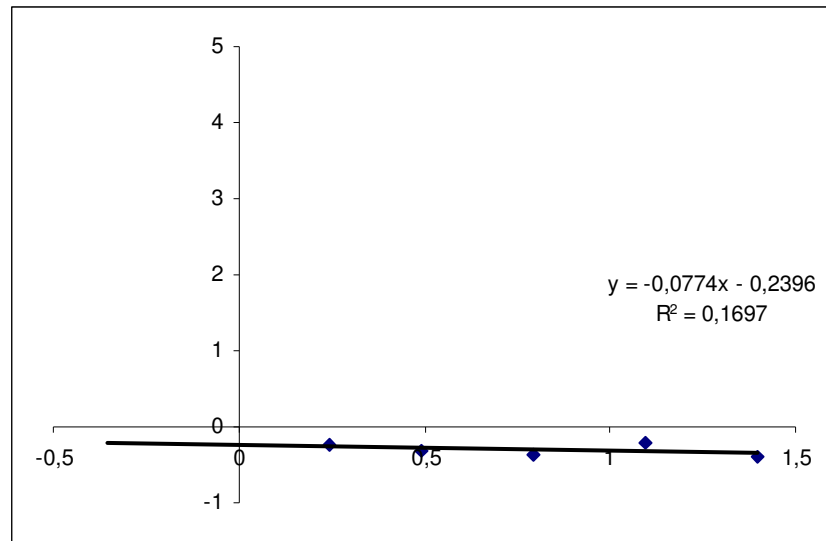


Figura 9: correlação do logaritmo da concentração de amostra e o ΔCT dos genes TG e HPRT1.

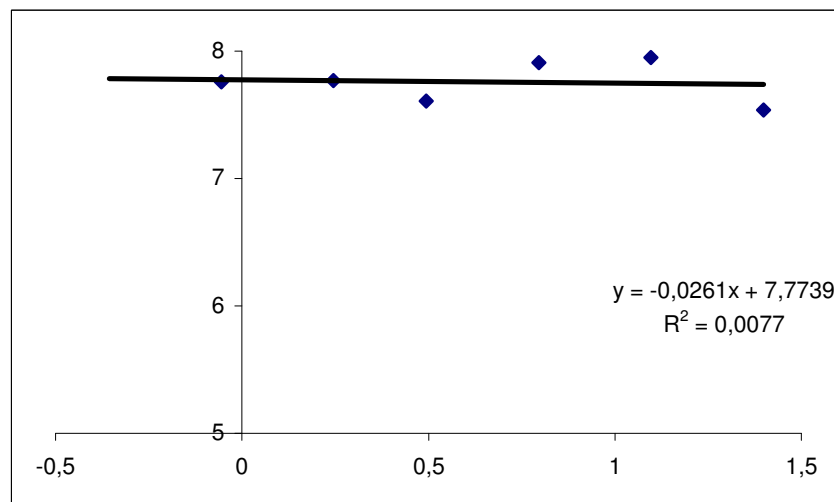


Figura 10: correlação do logaritmo da concentração de amostra e o ΔCT dos genes TG e GAPDH.

Validação do gene controle interno

Para verificar se os resultados de quantificação de RNAm-TG poderiam sofrer interferência do gene controle interno, análise de correlação de Spearman, dos valores de CT dos genes GAPDH e HPRT1 das amostras

de RNA controles, mostrou não haver correlação entre eles ($r=0,34$) (Figura 11).

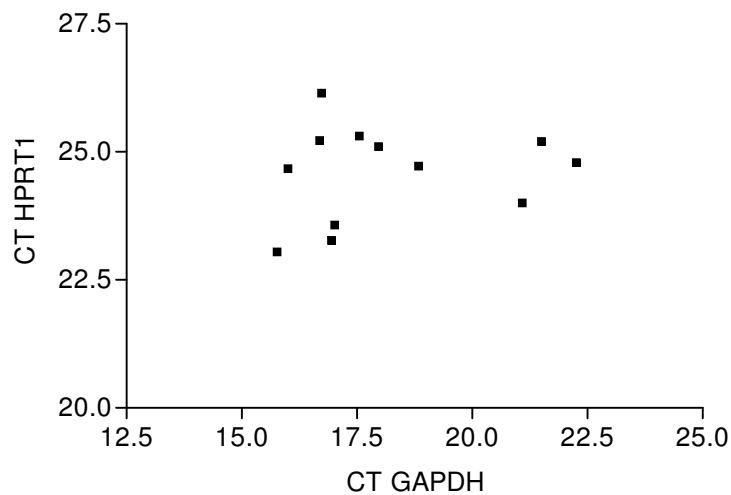


Figura 11: correlação dos valores de amplificação (CT) entre os genes GAPDH e HPRT1 em amostras de indivíduos controles normais ($r=0,34$).

Avaliação da função tireoidiana e auto-anticorpos

As dosagens de T3 (ng/dL), T4 ($\mu\text{g/dL}$), T4L (ng/dL), TSH ($\mu\text{U/mL}$), TGs (ng/mL) foram realizadas por método imunofluorométrico utilizando os estojos comerciais Auto-Delfia (Perkin Elmer, Wellesley, MA, EUA). Os Ac anti-TG (U/mL) foram dosados por fluoroimunoensaio indireto (Perkin Elmer, Wellesley, MA, EUA).

Ultrassonografia de tireóide

Durante o acompanhamento dos pacientes foi realizada ultrassonografia de tireóide, utilizando-se aparelho ALOKA SSD 500 com transdutor linear de 7,5 MHz (Tóquio, Japão). Os pacientes foram examinados em decúbito dorsal, com leve hiper-extensão do pescoço.

Utilizou-se gel para impedir a presença de ar entre o transdutor e a pele o que permite um contato adequado entre as duas superfícies.

IV. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores de expressão de RNAm-TG e TGs não apresentaram distribuição normal e portanto foram expressos em medianas. Para análise dos dados foram utilizados os seguintes métodos: correlação de Spearman, (Conover, 1980) para verificar a existência de correlação entre as variáveis RNAm-TG, segundo os subgrupos de interesse. Foi aplicado ANOVA com dois fatores, empregando transformação logarítmica da TG, por possuir variabilidades bastante diferentes (Neter *et. al.*, 1996). Após a análise de variâncias foram realizadas comparações múltiplas de Bonferroni (Neter *et. al.*, 1996).

Foi utilizado o teste Mann-Whitney (Conover, 1980) e curva ROC (Hosmer e Lemeshow, 2000) para determinar valor de corte para o RNAm-TG.

O nível de significância dos testes foi de $\alpha=0,05$.

V. RESULTADOS

Função Tireoidiana dos Pacientes

Os resultados das dosagens de TSH, T3 total, T4 total, T4 livre de todas as amostras colhidas dos pacientes para avaliação da função tireoidiana estão apresentados nos anexos 1-3.

A média dos valores de TSH e T4L mostraram que os pacientes apresentavam-se em hipotireoidismo do período basal até 1 semana após RIT (figuras 12 e 13).

No tempo pré-RIT (basal), 5 pacientes, embora em hipotireoidismo, apresentavam TSH menor que 30 μ U/mL (Pacientes 44-FFC: 5,3 μ U/mL; 39-MAS: 11,2 μ U/mL; 22-MVB: 21,8 μ U/mL; 38-SOS: 29,4 μ U/mL; 19-MSA: 28,7 μ U/mL) com níveis de T4L baixos ou no limite inferior da normalidade (pacientes 44-FFC: 0,4 ng/dL; 39-MAS: 0,7 ng/dL; 22-MVB: 0,2 ng/dL; 38-SAS: <0,2 ng/dL; 19-MSA: <0,2 ng/dL) (anexos 1-3).

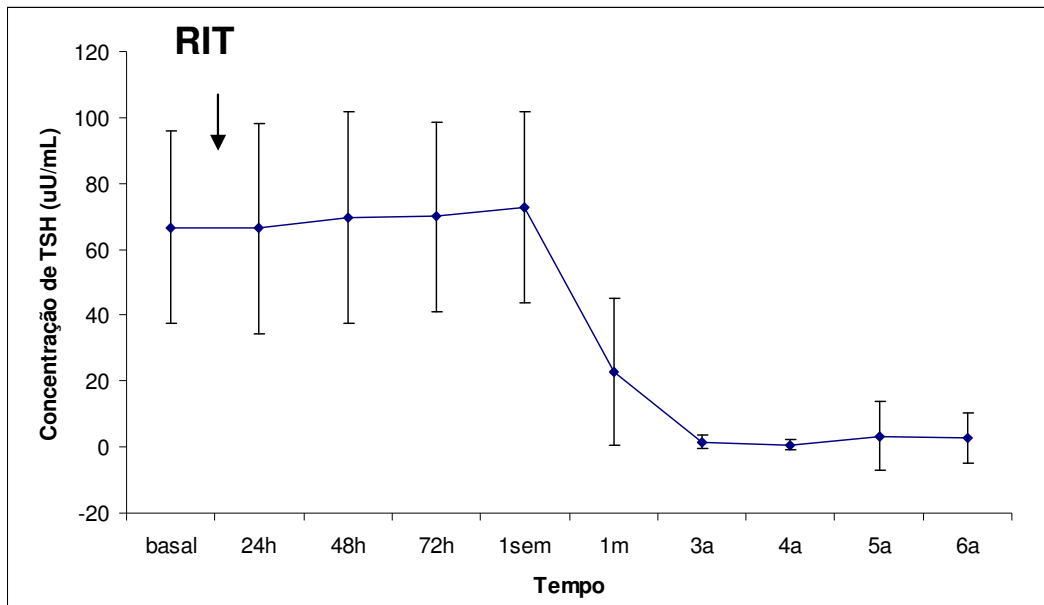


Figura 12: concentrações de TSH antes e após a RIT de todos os pacientes (média±DP).

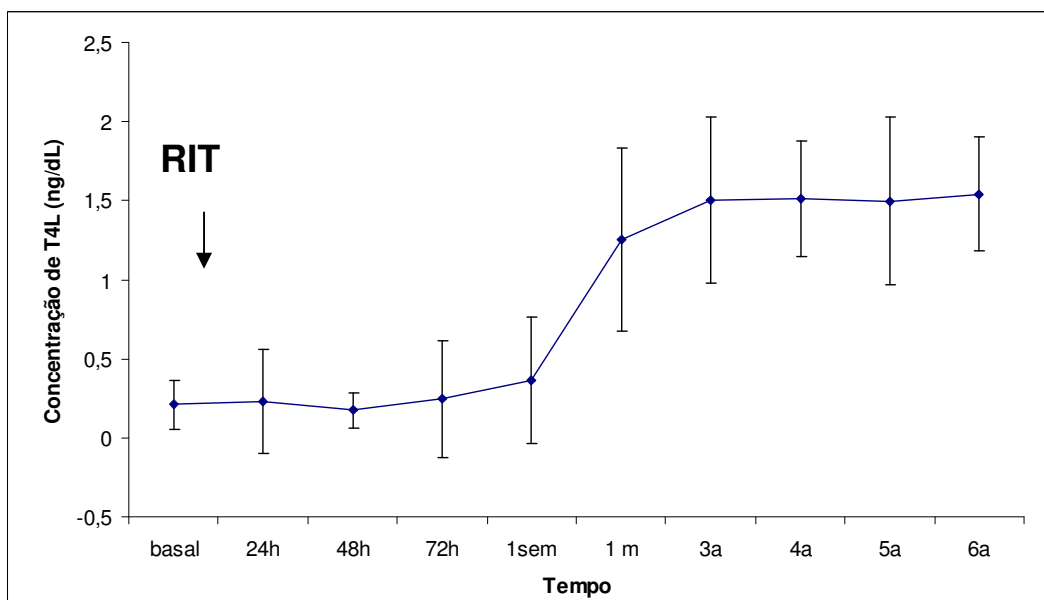


Figura 13: concentrações de T4L antes e após a RIT de todos os pacientes (média±DP).

Pesquisa de corpo inteiro

A Pesquisa de Corpo Inteiro (PCI), foi realizada em 45 pacientes para definir seu estadiamento clínico após 7 dias da dose de RIT. Em 6 pacientes foi diagnosticada metástase à distância, que tinham sido observadas na PCI pré-dose. Em 14 pacientes, a PCI pós-dose detectou metástases ganglionares, sendo que na PCI pré-dose, 4 deles já a apresentavam e 10 deles apresentavam apenas restos tireoidianos.

Dos outros 26 pacientes, 16 apresentavam restos tireoidianos na PCI de 7 dias pós dose, 8 apresentavam ausência de tecido e 2 não realizaram o exame ou o realizaram em outro serviço, mas apresentavam restos tireoidianos na PCI pré-dose.

Aproximadamente 2 a 3 anos após a primeira RIT 3 pacientes realizaram a PCI novamente e ainda foi detectada presença de restos tireoidianos (2 dos quais apresentavam na PCI pós-dose e um apresentava MG neste mesmo período).

Ultrassonografia

Durante o acompanhamento, os pacientes que compareceram ao serviço de Endocrinologia a tireóide não foi identificada em sua projeção habitual com ausência de imagens tumorais na projeção da loja tireoidiana e ausência de adenomegalia cervical, com exceção dos pacientes 15-FSV, 16-L-F, 5-CVV, 21-RLS (SM) e 44-FFC (MD), que apresentavam gânglios no nível 2 e dos pacientes 22-MVB, 6-D-C, 14-CBB, 45-MLF, 13-AGT (SM); 25-

GPG, 26-MOF (MG) e 43-ALB (MD) que apresentavam gânglios no nível 3 em algum momento do acompanhamento entre o quarto e sétimo ano após RIT.

QUANTIFICAÇÃO DO RNAm DE TIREOGLOBULINA E DA TIREOGLOBULINA SÉRICA

Correlação dos valores de RNAm-TG_{GAPDH} e RNAm-TG_{HPRT1}

Uma vez concluídas as quantificações foi realizada análise de correlação do RNAm-TG_{GAPDH} e RNAm-T_{GHPRT1} (figura 14).

Verificou-se que independente do tempo, estadio clínico, tipo histológico, valor de TSH ($\leq 0,3$ $\mu\text{U/mL}$; $>3,0 < 30,0$ $\mu\text{U/mL}$ e ≥ 30 $\mu\text{U/mL}$) e presença de Ac anti-TG, o gene TG normalizado tanto com GAPDH quanto com HPRT1, estavam diretamente correlacionados ($p < 0,001$ e $r = 0,6$).

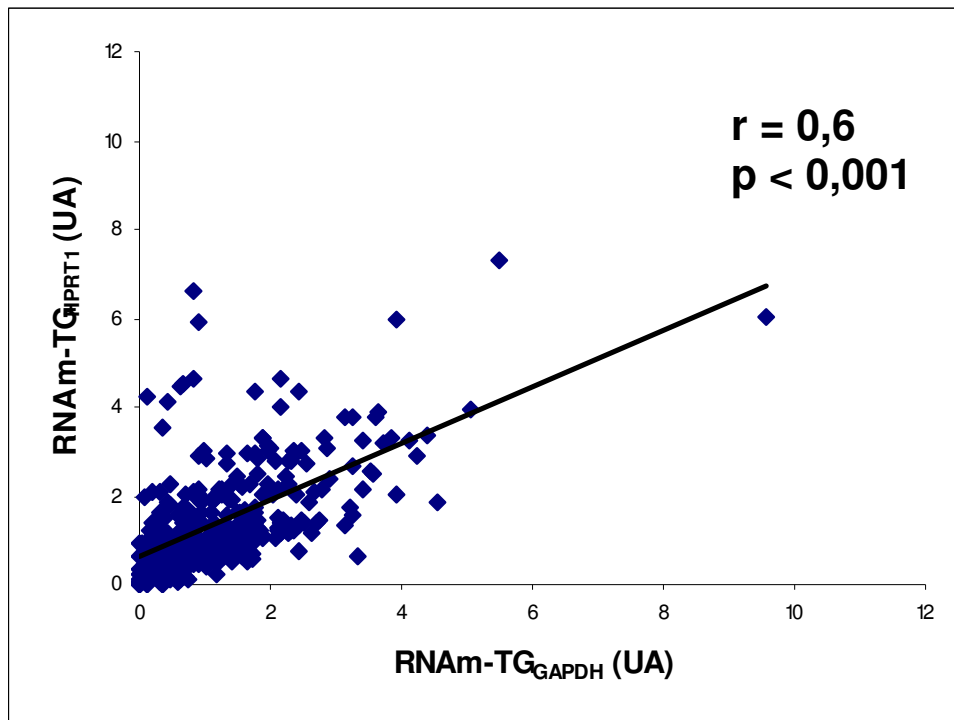


Figura 14: Correlações de Spearman dos valores das concentrações de RNAm-TG_{GAPDH} e de RNAm-TG_{HPRT1} de todas as amostras ($p=0,001$; $r=0,6$).

Foi avaliada também a distância quartílica dos dados de RNAm-TG_{GAPDH} e RNAm-TG_{HPRT1} através do Teste de Wilcoxon, verificando-se não haver diferença significativa da dispersão dos dados ($p = 0,2061$). Contudo, verificou-se que nos momentos 24, 48, 72 horas e 1 semana após RIT, os valores de RNAm-TG_{HPRT1} eram significativamente mais elevados que os calculados com RNAm-TG_{GAPDH} ($p < 0,05$).

Devido aos resultados conflitantes obtidos, decidiu-se analisar os resultados de expressão gênica de RNAm-TG_{GAPDH} e RNAm-TG_{HPRT1} de forma independente.

Quantificação do RNAm-TG_{GAPDH}

Nos pacientes SM, as medianas do RNAm-TG_{GAPDH}, apresentaram discreta elevação 48h após a RIT [basal: 0,70(0,04-4,23) UA; 48h: 1,10(0,01-2,31) UA]. Posteriormente, os valores diminuíram gradativamente, atingindo níveis similares aos basais. Novo aumento foi observado nas amostras de 1-2 anos e 6-7 anos [1,41(0,27-3,94) UA e 2,15(0,81-5,49) UA, respectivamente] (figura 15).

No grupo dos pacientes com MG, a mediana do RNAm-TG_{GAPDH}, 24h após RIT, elevou-se [basal: 1,00(0,05-3,71) UA; 24h: 1,79(0,03-3,32) UA]. Um mês e 6-7 anos após RIT verificou-se novo aumento do RNAm-TG_{GAPDH} [1m: 1,22(0,16-9,56) UA; 6-7 anos: 2,41(1,17-3,27) UA] ($p=0,453$) e ($p=0,121$), respectivamente (figura 15).

No grupo de pacientes com MD, o valor mediano de RNAm-TG_{GAPDH}, elevou-se 72h após RIT [basal: 0,69(0,01-3,26) UA; 72h: 1,32(0,09-2,44) UA]. Após 6-7 anos observou-se novo aumento, com valores significativamente maiores [RNAm-TG_{GAPDH}: 3,41(1,78-3,56) UA] ($p=0,048$) (figura 15).

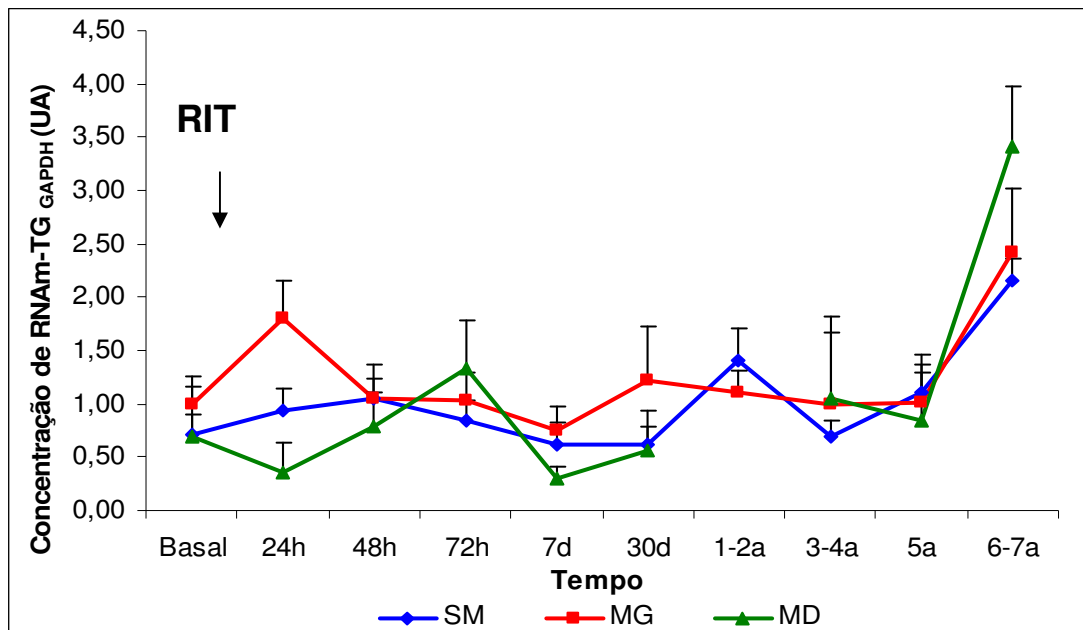


Figura 15: Estadio clínico em relação aos valores de RNAm-TG_{GAPDH}. Valores expressos em Unidades Arbitrárias (UA). SM: pacientes sem metástase; MG: pacientes com metástase ganglionar; MD: pacientes com metástase à distância.

Quantificação do RNAm-TG_{HPRT1}

Os valores de RNAm-TG_{HPRT1} também aumentaram 48h após RIT, [mediana basal: 0,86(0,11-4,10) UA; 48h: 1,29(0,08-5,92) UA], nos pacientes SM. Novo aumento foi verificado 6-7 anos após [1,41(0,40-7,28) UA]. Nos pacientes com MG, observou-se elevação do RNAm-TG_{HPRT1} 24h após a dose de RIT [mediana basal: 0,81(0,21-3,16) UA; 24h: 1,84(0,21-3,33) UA] e novamente após 5 anos [1,78(0,41-4,65) UA] e 6-7 anos [2,04(0,21-2,67)] ($p=0,327$) e ($p=0,276$) respectivamente (figura 16).

No grupo de pacientes com MD, as medianas do RNAm-TG_{HPRT1} apresentaram comportamento semelhante às do RNAm-TG_{GAPDH}. Observou-se aumento 72h após RIT [basal: 1,00(0,93-3,79) UA; 72h: 1,58(1,97-4,35)

UA]. Após 6-7 anos observou-se novo aumento, com valores mais elevados, [RNAm-TG_{HPRT1}: 2,52(1,61-3,26) UA] ($p=0,262$) (figura 16).

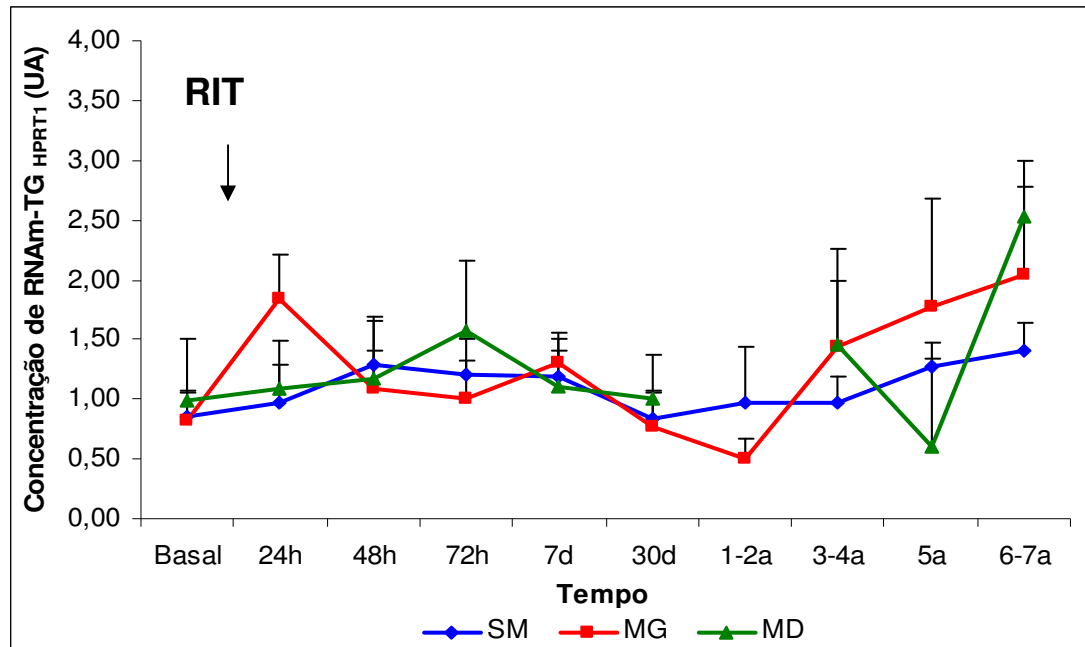


Figura 16: Estadio clínico em relação aos valores de RNAm-TG_{HPRT1}. Valores expressos em Unidades Arbitrárias (UA). SM: pacientes sem metástase; MG: pacientes com metástase ganglionar; MD: pacientes com metástase à distância.

O RNAm-TG, independente do gene controle interno empregado, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os estadios clínicos.

Quantificação da Tireoglobulina sérica

Nos pacientes sem metástase, a mediana da TGs apresentou pequena elevação 1 semana após RIT [basal 1,8 (0,3-308,2) ng/mL; 1 semana: 3,0 (0,5-85,9) ng/mL] ($p = 0,153$) e manteve-se com valores baixos ou indetectáveis ao longo do tempo (figura 17).

Nos pacientes com metástase ganglionar, não se observou elevação de TGs. O valor apresentado no período basal foi 30,9 (0,5-83,0) ng/mL com

diminuição gradativa posterior. Os valores de TGs mantiveram-se semelhantes nos tempos de 3 a 7 anos após RIT (figura 17).

Nos pacientes com metástase à distância, a mediana da TGs basal foi elevada [253,2 (1,8-1.536,0) ng/mL]. Posteriormente, observou-se discreto aumento 1 semana após [223,9 (54,7-741,1) ng/mL]. Um a 2 anos após, foram detectados valores elevados de TGs [2505,0 (300,0-17.380,0) ng/mL] ($p=0,381$) os quais decaíram posteriormente (figura 17).

Observou-se que os valores de TGs foram estatisticamente diferentes ($p<0,001$) entre os pacientes com diferentes estadios clínicos (SM, MD e MG) em todos os tempos ($p<0,001$) com exceção dos valores dos pacientes SM e MG no tempo 6-7 anos [0,5 (0,5-6,3) ng/mL e 0,5 (0,5-0,5) ng/mL] (figura 17).

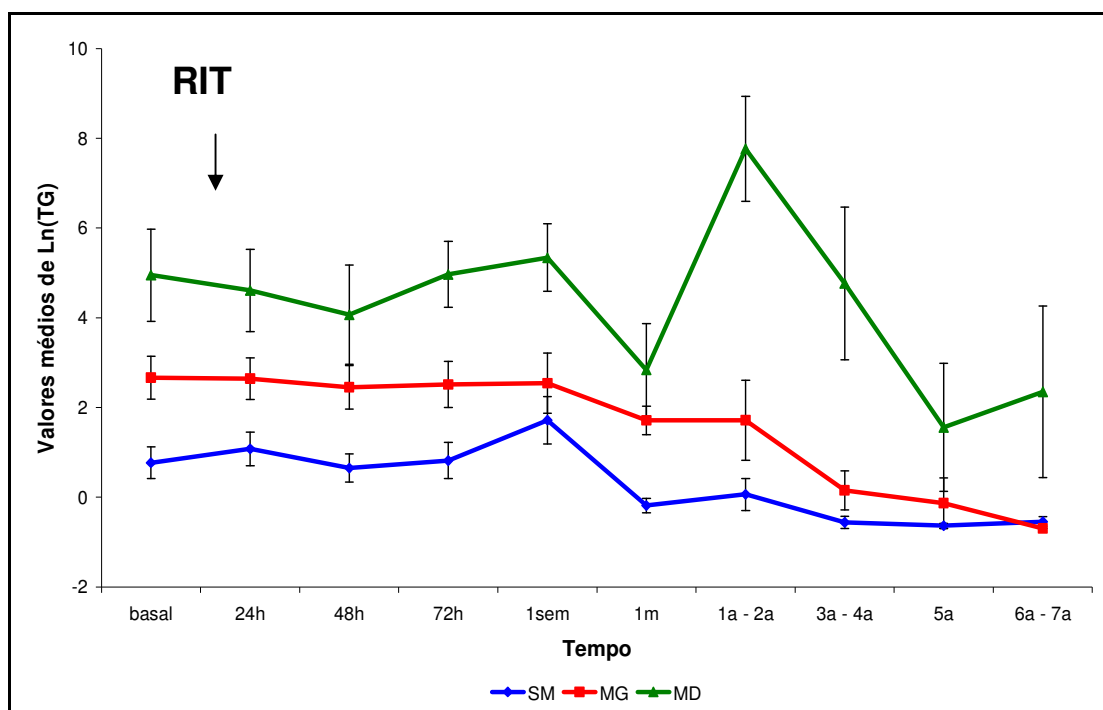


Figura 17: estadio clínico em relação à concentração de TGs ao longo do tempo. Resultados expressos em log da concentração sérica de TG (IRMA). SM: pacientes sem metástase; MG: pacientes com metástase ganglionar; MD: pacientes com metástase à distância.

Anticorpos anti-TG

Em dezessete pacientes (37,8%) foram identificados Ac anti-TG em algum momento do estudo, 4 dos 6 pacientes com metástase à distância (66,67%), 7 de 14 pacientes com metástase ganglionar (50%) e 6 de 25 sem metástase (24%). Em 13 pacientes verificou-se persistência do título de Acs até um ano após RIT e em 5 pacientes os Acs permaneceram positivos após 1 ano. Nove deles já tinham Acs positivos antes da dose de RIT. Em 5 pacientes, os títulos de Acs foram maiores que 1000 U/mL (anexos 1-3).

RNA_m-TG, Tireoglobulina sérica e Anticorpos anti-TG

Foram analisados os valores de RNA_m-TG_{GAPDH}, RNA_m-TG_{HPRT1} e TGs das amostras dos pacientes SM, com MG e MD com Acs anti-TG positivos e níveis de TSH $\geq 30\mu\text{U/mL}$.

Verificou-se que os valores de RNA_m, em cada estadio clínico, apresentaram grande variação. Quando se comparou os resultados do RNA_m-TG_{GAPDH}, nem no RNA_m-TG_{HPRT1} entre os estadios não se observou diferenças significativas, havendo, em alguns casos, sobreposição de valores (figuras 18 e 19).

Para as amostras dos pacientes SM (n=16) encontraram-se os seguintes valores: RNA_m-TG_{GAPDH}: 1,07(0,01-2,31) UA; RNA_m-TG_{HPRT1}: 1,10(0,005-4,43) UA. Nas amostras de pacientes com MG (n=12), os valores foram: RNA_m-TG_{GAPDH}: 1,83(0,36-3,71) UA e RNA_m-TG_{HPRT1}: 2,02(0,21-3,33) UA. E as cinco amostras de pacientes com MD apresentaram os

valores: RNAm-TG_{GAPDH}: 0,33(0,03-3,41) UA, RNAm-TG_{HPRT1}: 1,61(0,93 e 3,26) UA, menores ou semelhantes que os valores das amostras dos pacientes SM (figuras 18 e 19).

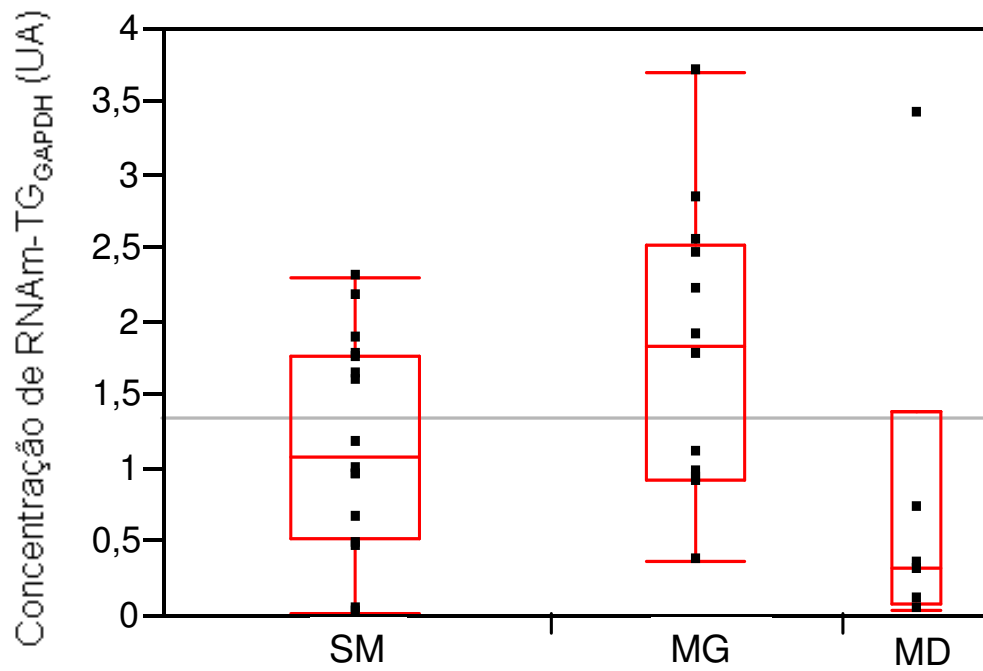


Figura 18: concentração de RNAm-TG_{GAPDH} em amostras de pacientes SM, com MG e MD na presença de Acs anti-TG e níveis de TSH \geq 30 μ U/mL.

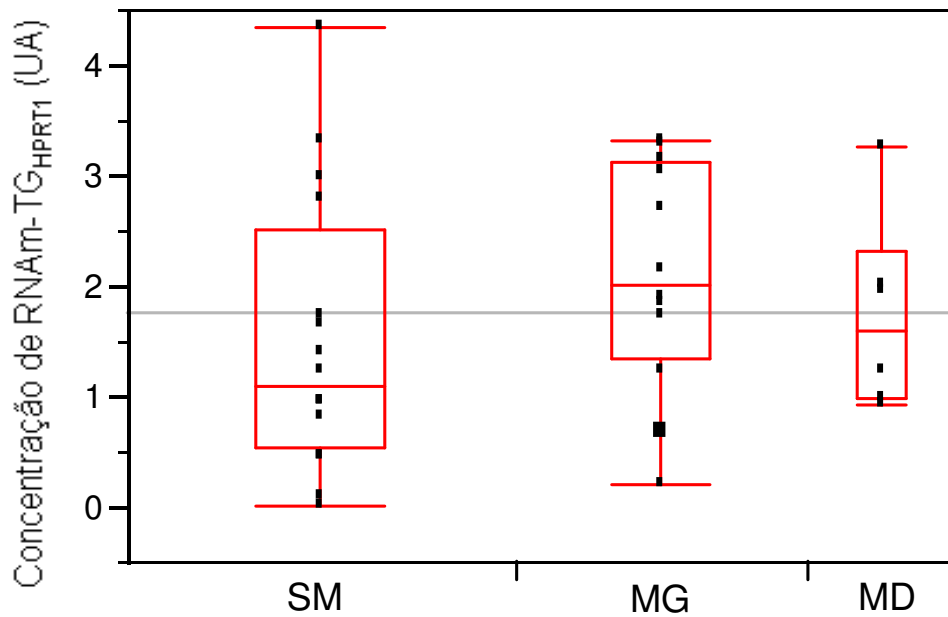


Figura 19: concentração de RNAm-TG_{HPRT1} em amostras de pacientes SM, com MG e MD na presença de Acs anti-TG e níveis de TSH \geq 30 μ U/mL.

Os valores de TGs, mesmo nas amostras com Acs anti-TG positivos e níveis de TSH \geq 30 μ U/mL, foram capazes de diferenciar os estadios clínicos dos pacientes.

Para as amostras dos pacientes SM (n=16) o valor de TGs foi praticamente indetectável [0,5(0,50-2,80) ng/mL]. Nos MG (n=12), os valores de TGs foram de 17,25(0,50-53,20) ng/mL, mas com algumas amostras com TGs indetectável. Nas cinco amostras de pacientes com MD, os valores de TGs foram extremamente elevados [301,80(6,50-1487,00) ng/mL]. Os valores de TGs nos diferentes estadios foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,01$) (Figura 20).

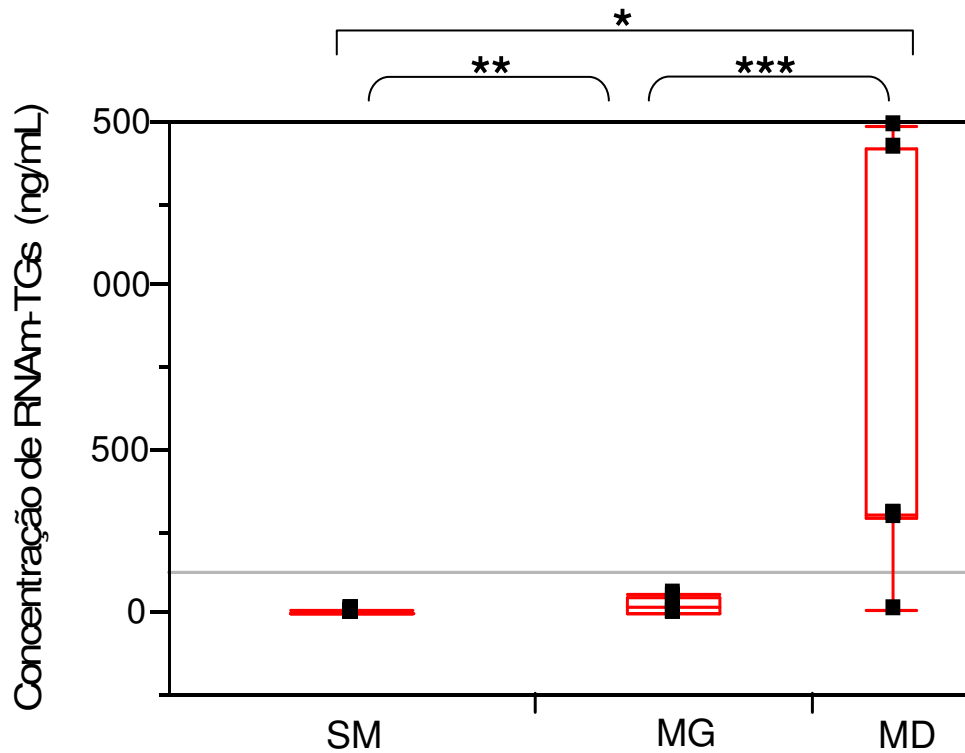


Figura 20: concentração de TGs em amostras de pacientes SM, com MG e MD na presença de Ac anti-TG e níveis de TSH \geq 30 μ U/mL. (*p=0,0001 **p=0,0127 e ***p=0,0023).

Resultados similares aos do RNAm-TG foram observados quando analisou-se os dados das amostras com TGs indetectável (por possível interferência dos anticorpos). Nos pacientes SM (N=9) o valor de RNAm-TG_{GAPDH} foi 1,59(0,46-2,31) UA e de RNAm-TG_{HPRT1}: 0,97(0,47- 2,78) UA. Nos pacientes com MG, somente três amostras apresentaram TGs indetectável com valores de RNAm-TG_{GAPDH}: 0,36 UA; 1,11 UA e 2,55 UA e RNAm-TG_{HPRT1} 0,21 UA; 0,68 UA e 2,71 UA, respectivamente (figuras 21 e 22). Nenhuma amostra de pacientes com MD e TSH \geq 30 μ U/mL apresentou TGs indetectável. Nestas amostras também foi verificada valores similares de RNAm-TG nos dois estadios.

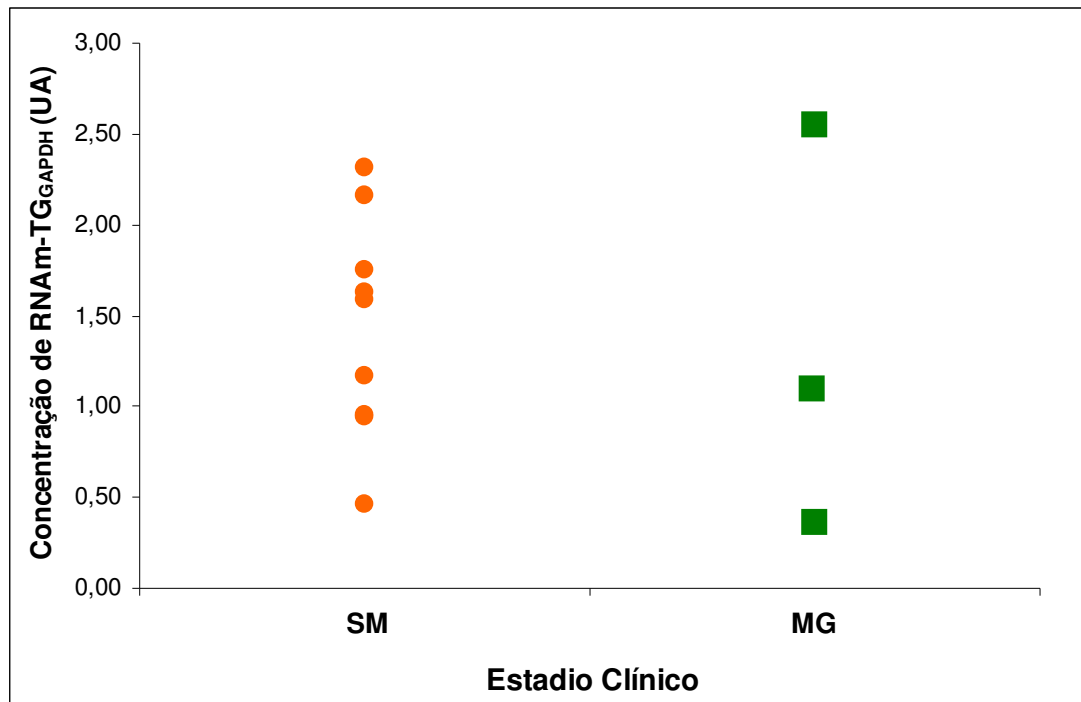


Figura 21: concentração de RNAm-TG_{GAPDH} de amostras com TGs indetectável, em pacientes SM e com MG. Nenhum paciente com MD teve TGs indetectável.

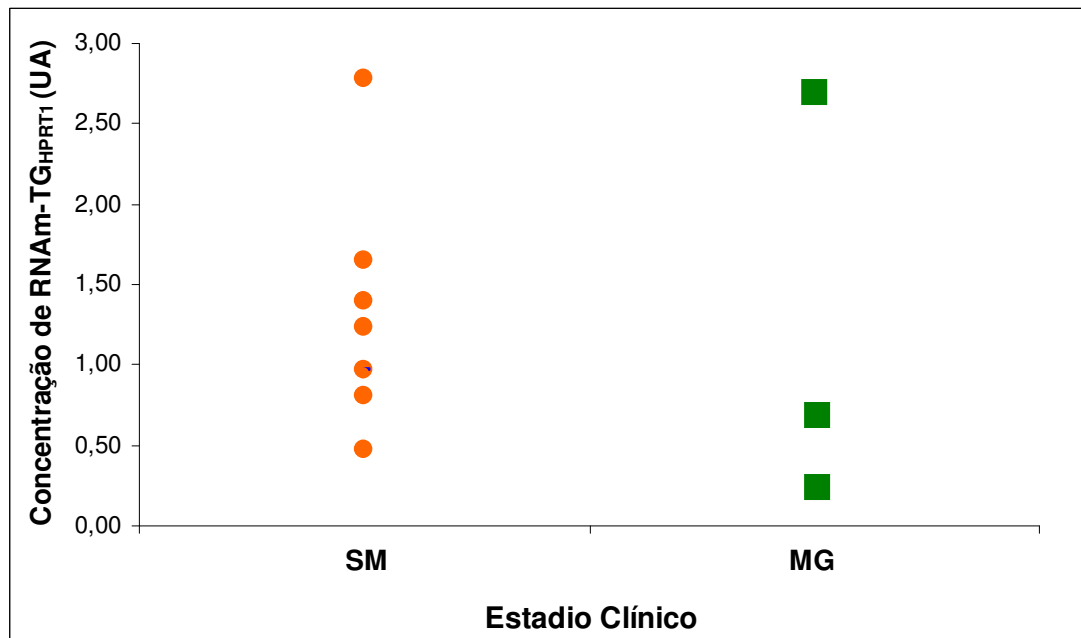


Figura 22: concentração de RNAm-TG_{HPRT1} de amostras com TGs indetectável, em pacientes SM e com MG. Nenhum paciente com MD teve TGs indetectável.

Avaliação de casos

Em 30 das 63 amostras com Acs positivos (47,62%), os níveis de TGs eram indetectáveis, contudo, em somente dois pacientes suspeitou-se da interferência dos Acs na dosagem da TGs. Porém, nestes pacientes os níveis de RNAm TG não acompanharam sua clínica.

Caso 1

Paciente 44-FFC com MD, após 48h da RIT apresentou Acs anti-TG positivos com TGs indetectável e valores de RNAm-TG_{GAPDH} e RNAm-TG_{HPRT1} de 1,56 UA e 2,20 UA, respectivamente. Porém em amostra colhida 1 semana após RIT, a TGs estava elevada na presença de Acs positivos e concentração de RNAm-TG diminuída, (RNAm-TG_{GAPDH} 0,60 UA e RNAm-TG_{HPRT1} 1,57 UA) (anexo 1).

Caso 2

Paciente 31-KCM, com MG apresentou Acs persistentes em todas as amostras, a TGs foi indetectável 1 semana e 1 mês após RIT e valores de RNAm-TG indetectáveis (RNAm-TG_{GAPDH}: 1,11 UA e 0,89 UA; RNAm-TG_{HPRT1}: 0,68 UA 0,79 UA, respectivamente) . Na amostra de 6 meses após RIT, a TGs elevou-se (13,2 ng/mL) e os valores de RNAm foram menores ou iguais aos de 1 semana e 1 mês (anexo 2).

Caso 3

A paciente 36-NMS de 43 anos, com diagnóstico inicial de MG, apresentou TGs de 13,0 ng/mL, Ac negativo e RNAm-TG_{GAPDH} e RNAm-TG_{HPRT1} de 1,73 UA e 0,56 UA, respectivamente. Três anos após RIT, a TGs elevou-se para 23,4 ng/mL, quando em hipotireoidismo (TSH: 41,4 uU/mL), com Acs anti-TG negativos e valores de RNAm-TG baixos (RNAm-TG_{GAPDH}: 0,44 UA e RNAm-TG_{HPRT1}: 1,19 UA). Nova PCI indicou a presença de metástase à distância, sendo encaminhada para nova dose de RIT. Três anos após a segunda RIT, a TGs elevou-se (6,5 ng/mL) na presença e Acs anti-TG com valores de RNAm-TG também elevados (3,41 UA para RNAm-TG_{GAPDH} e 3,26 UA para RNAm-TG_{HPRT1}). Estes resultados sugeriram nova recidiva da doença. Exames de imagens confirmaram a presença de MD (anexo 2).

RNAm-TG e Tipo Histológico

Considerando o tipo histológico, nos carcinomas papilíferos não se verificou correlação entre TGs e o RNAm-TG_{GAPDH} e RNAm-TG_{HPRT1} ($r = -0,094$ e $p = 0,166$; $r = 0,047$ e $p = 0,493$ respectivamente), nem nos carcinomas foliculares (RNAm-TG_{GAPDH} $r = -0,143$ e $p = 0,255$; RNAm-TG_{HPRT1} $r = -0,042$ e $p = 0,741$).

VALOR DE CORTE PARA O RNAm DE TIREOGLOBULINA

Na tentativa de se estabelecer um valor de corte para a concentração de RNAm-TG como marcador de recidiva do câncer de tireóide foi feita curva ROC considerando os valores de RNAm-TG, agrupados segundo as categorias de TGs (TGs >2 ng/mL que indica presença de doença e TGs <2 ng/mL que indica ausência de doença), e Acs anti-TG negativo (figura 23) (Feldt-Rasmussen *et al.*, 1996).

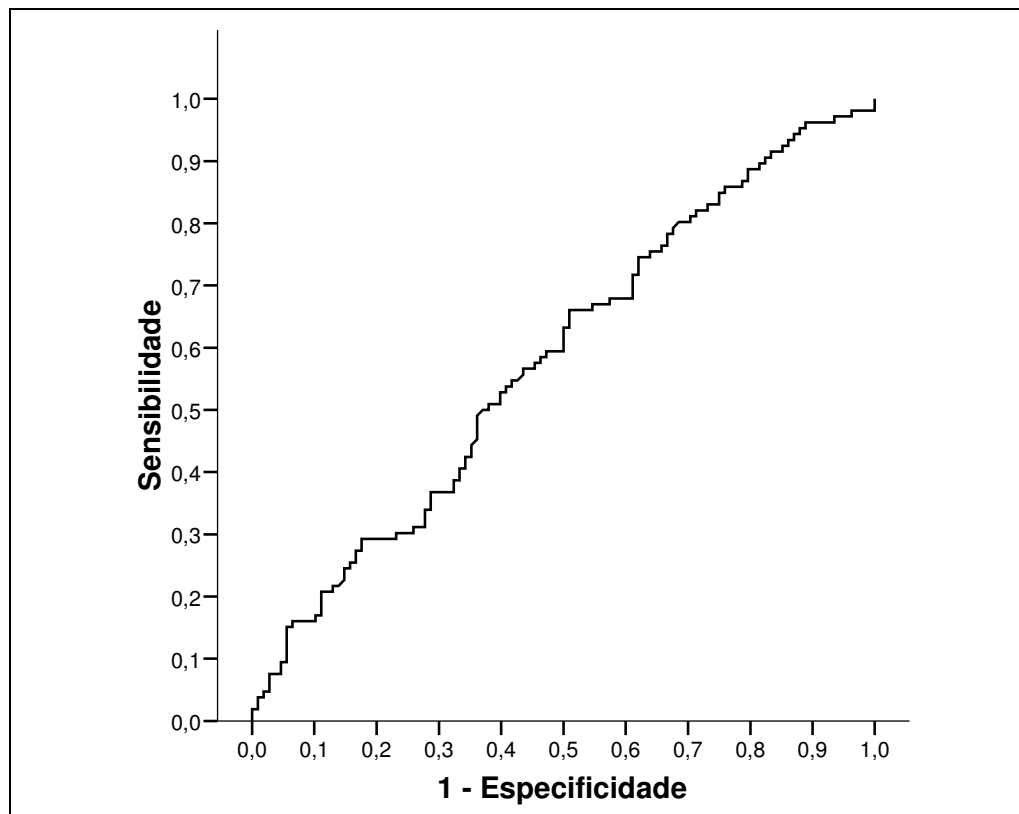


Figura 23: Curva ROC para RNAm-TG_{GAPDH} segundo categorias de TG.

O RNAm-TG_{GAPDH} mostrou-se estatisticamente diferente entre as categorias de TGs, sendo possível realizar curva ROC ($p=0,039$). O ponto que forneceu melhor sensibilidade e especificidade foi 0,8095, ou seja,

valores menores que este ponto espera-se que a TG seja $< 2,0$ ng/mL e para valores maiores que este ponto de corte espera-se que a TG seja ≥ 2 ng/mL, contudo a sensibilidade foi 0,651 com especificidade de 0,491.

Não foi possível realizar uma curva ROC com o RNAm-TG_{HPRT1} ($p=0,116$).

ANÁLISE SISTEMÁTICA E METANÁLISE

Estratégia de Busca

Há doze anos, pesquisadores da área de endocrinologia oncológica vêm estudando a utilização do RNAm-TG como um marcador de recidiva do CDT. Durante estes anos de estudos, foram publicados trabalhos com resultados positivos e negativos. A fim de identificar possíveis interferentes que geraram a divergência nos resultados, pensou-se na necessidade de realizar uma busca sistemática de todos os trabalhos e assim, analisar seus critérios de inclusão e exclusão para identificar as possíveis causas na inexatidão dos resultados.

Dois investigadores (integrantes do grupo de pesquisa em tireóide) fizeram buscas em diferentes bases de dados eletrônicas, incluindo: PubMed, Clinical Queries, Embase, Lilacs, Cochrane BVS (Library e Plus). A procura não se restringiu a publicações em língua inglesa, ao tempo e foram utilizados os seguintes termos: "*RNA, messenger*" AND *thyroglobulin* AND *thyroid neoplasms* como estratégia de busca.

Seleção dos dados

Para as análises, quando o artigo científico era em outra língua, que não o inglês e português, utilizaram-se somente os dados do seu resumo.

Os dados selecionados para análise dos trabalhos escolhidos foram:

- Número de pacientes com CDT e/ou com outras doenças;
- Número de controles normais;
- Tireoidectomia;
- Terapia com radioiodo;
- Supressão do TSH;
- Método de quantificação do RNAm;
- Uso de gene controle interno adequado;
- Pacientes com Acs Anti-TG positivos;
- Método de extração do RNA;
- Tubo de coleta do material;

Resultados da análise sistemática

No total, foram obtidos 137 resumos e títulos através das procuras eletrônicas. Destes, apenas 24 artigos foram relevantes para os pesquisadores e foram analisados em detalhes, considerando os dados de escolha citados acima.

Após análise, ambos revisores concordaram que, nenhum dos trabalhos selecionados mostrou concordância em relação aos critérios de inclusão (anexo 4).

VI. DISCUSSÃO

A detecção da TGs é empregada para o seguimento de pacientes com CDT. Contudo, métodos mais sensíveis e abordagens moleculares vêm sendo pesquisadas na tentativa de aumentar a eficiência de detecção de doença recorrente.

Desde 1996 se intensificaram os trabalhos para verificar o uso da quantificação do RNAm-TG em sangue periférico, no acompanhamento de pacientes com câncer de tireóide. Resultados discordantes foram publicados, tornando esta abordagem laboratorial muito controversa. Alguns trabalhos mostraram correlação entre a quantificação do RNAm-TG e o estadiamento da doença e outros não detectaram tal correlação (Bojunga & Zeuzem, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilidade da quantificação do RNAm-TG em sangue periférico de pacientes com câncer de tireóide para verificar sua significância como método diagnóstico complementar no acompanhamento destes pacientes em longo prazo. Para isso, foram estudadas amostras de sangue periférico de pacientes com CDT, antes e seriadamente após ablação com radioiodo.

Uma das variáveis que pode afetar a quantificação do RNAm-TG é a padronização da técnica (Ringel *et al.*, 2004; Huggett *et al.*, 2005). Elisei *et al.* (2004), utilizaram criteriosamente, iniciadores selecionados para evitar formas variantes do gene TG e tratamento com DNase para evitar amplificação do DNA genômico. Li *et al.* (2004), além de também utilizar

amplificadores específicos, realizaram o primeiro estudo utilizando tubo especial para coleta de RNAm, PAXgene®, o qual mantém o RNA estável, mostrando que a coleta de sangue é o primeiro e importante passo nos ensaios moleculares utilizando RNA. O volume de sangue utilizado para a extração de RNA (1,0 a 10 mL) e o preparo deste sangue para extração (separação por gradiente ou a partir de sangue total), também foram considerados fatores de importância (Coelho *et al.*, 2006), assim como o tipo de amplificação (PCR qualitativo, semi-quantitativo ou quantitativo) e o número de ciclos da reação. Além desses, o emprego de um ou mais genes controles internos, a escolha do mais adequado, as diferentes normalizações e a escolha de diferentes valores de corte também foram questionadas (Ringel, 2004).

Sendo assim, na primeira etapa deste estudo foi realizada padronização extensiva das técnicas a serem empregadas. Foram consideradas as seguintes variáveis:

- 1- Volume da amostra: foram coletadas amostras de sangue periférico de todos os pacientes do mesmo volume (2 ml) em trizol, para extração do RNA;
- 2- Qualidade do RNA: só foram empregadas amostras de RNA de boa qualidade confirmada por espectrometria e eletroforese em gel de agarose;
- 3- Iniciadores para a reação de RT-PCR em tempo real: foram escolhidos iniciadores que amplificassem regiões do gene TG que

não sofrem "splicing" alternativo, evento observado em algumas células neoplásicas de tireóide (Savagner *et al.*, 2002);

- 4- Controle interno: foi realizado profundo estudo da amplificação dos genes GAPDH , HPRT1 e β G.
- 5- Análise dos resultados dos valores de RNAm-TG utilizando dois genes controle interno (GAPDH e HPRT1).

O uso de gene controle interno para normalizar os resultados das quantificações por PCR em tempo real, está amplamente descrito e aceito na literatura. Porém, a escolha do mais adequado tem sido muito discutida por diversos pesquisadores, por haver-se detectado regulação de expressão de algum destes genes (Vandesompele *et al.*, 2002; Pfaffl *et al.*, 2004).

No presente trabalho, foi inicialmente estudada a amplificação de três genes controle interno: o gene GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) da via glicolítica, o gene β -Globina (β G), ambos muito utilizado na literatura (Beillard *et al.*, 2003 Kojo *et al.*, 2002) e o gene HPRT1, envolvido no metabolismo das purinas em mamíferos, com expressão altamente estável em linfócitos (Vandesompele *et al.*, 2002);

A expressão dos três genes, em amostras de RNA de sangue periférico de indivíduos sem doença maligna tireoidiana mostrou-se homogênea (CV<20%), porém, o gene β G estava altamente expresso, dificultando seu uso. Estes resultados motivaram a escolha de GAPDH e HPRT1 para realizar o estudo. A análise dos dados não permitiu determinar qual desses dois genes era o mais adequado. Por esse motivo decidiu-se

analisar os resultados de quantificação de RNAm-TG empregando ambos genes, individualmente.

A maioria dos trabalhos publicados na literatura compararam os valores de RNAm-TG, TGs e estadiamento do câncer de tireóide em um único momento da evolução da doença (Takano *et al.*, 2001). Em apenas um estudo, foi avaliado o RNAm-TG de pacientes, no sétimo ano após início da doença (Elisei *et al.*, 2004). Por esse motivo, no presente estudo foi realizada a dosagem de RNAm-TG e TGs durante o acompanhamento dos pacientes com CDT ao longo de sete anos após tratamento com radioiodo. Foram incluídos pacientes com diferentes estadios da doença: sem metástases (com restos tireoidianos), com metástase ganglionar e metástases a distância.

Os valores de RNAm-TG, independentemente do gene controle interno utilizado, não permitiram diferenciar os estadios clínicos dos pacientes deste estudo. Por outro lado, verificou-se paralelismo dos valores de TGs ao longo do tempo entre os três estadios, com exceção do período de 1-2 anos quando houve considerável aumento de TGs nos pacientes com MD, pela recidiva do câncer em um paciente deste grupo. Além disto, os valores de TGs nos diferentes estadios clínicos foram estatisticamente diferentes em todos os tempos e capazes de diferenciar os estadios da doença (com exceção do tempo de 6-7anos).

Nos pacientes SM foi observada elevação dos valores de TGs na primeira semana após RIT. A exposição à radiação poderia provocar esse aumento como consequência da liberação da TG acumulada nos restos

tireoidianos remanescentes, as quais ainda estão organizadas em folículos. Nestes tecidos a TG seria secretada proporcionalmente ao tamanho da massa de tecido remanescente (Coelho *et al.*, 2006). Nos pacientes com MG e MD não foi observada tal elevação, por provável desorganização estrutural do tecido neoplásico que perderia a capacidade de armazenar TG.

Já o RNAm-TG elevou-se nos tempos anteriores aos da TGs, possivelmente pelo aumento do número de células foliculares em circulação (Ringel *et al.*, 1998). Resultado similar foi observado por nosso grupo (Rubio *et al.*, 2007) após tratamento com radioiodio em paciente com bócio multinodular.

Durante a avaliação em longo prazo dos pacientes com metástase, observaram-se valores elevados de RNAm-TG e TGs, provavelmente pela recorrência da doença em alguns pacientes, apesar dos valores do RNAm não se elevarem na mesma proporção que os da TGs.

Vários grupos de pesquisas mostraram que Acs anti-TG interferem na dosagem da TGs (Spencer *et al.*, 2005; Spencer *et al.*, 1998; Robbins *et al.*, 2002). Neste estudo foram detectadas, 63 amostras de sangue com AC positivos. Os valores de RNAm-TG na presença de anticorpos e TSH \geq 30 μ U/mL foram semelhantes nos pacientes dos três estádios da doença, enquanto a TGs, quando detectável, apresentou valores mais elevados nos pacientes com metástase dos que naqueles sem metástases. Analisando os dados dos pacientes individualmente foi observada possível interferência dos Acs na quantificação da TGs (pacientes 10-KCM e 49-FFC, 18-NMS com metástase e TGs baixa). Nesses casos o RNAm-TG_{GAPDH} ou o

RNA_m-TG_{HPRT1} não auxiliaram no acompanhamento clínico das pacientes. Em um único caso, paciente 36-NMS com MD persistente após 6 anos de acompanhamento, foi possível detectar valores de RNA_m-TG que se elevaram significativamente se comparados com os valores nos tempos anteriores, quanto que a elevação da TGs foi moderada na presença de anticorpos antiTG.

Apesar dos resultados negativos, prosseguiu-se na busca de uma alternativa para verificar a possibilidade do RNA_m-TG ser um marcador complementar de recidiva do CDT. Em 2004, Ringel criticou os estudos que não utilizaram valor de corte para comparar os resultados quantitativamente. Um teste estatístico capaz de auxiliar no encontro destes valores é a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), a qual avalia a sensibilidade e especificidade de um determinado método diagnóstico, para diferentes valores de corte (Martinez *et al.*, 2003). Neste estudo foi possível identificar somente o valor de corte de 0,8 UA para o RNA_m-TG_{GAPDH}. Porém a curva ROC mostrou baixa especificidade e sensibilidade da técnica, o que impossibilita sua utilização.

Várias poderiam ser as causa que explicariam a discordância nos valores de TGs e RNA_m-TG no acompanhamento dos pacientes com CDT. Neste estudo foi possível identificar amplificação do RNA_m-TG em todas as amostras, enquanto que em algumas a TGs foi indetectável.

Fuhrer *et al.* (2005), procurando encontrar marcadores específicos da tireóide para diferenciar neoplasia folicular benigna ou maligna, concluíram que no CDT ocorreria diminuição da expressão do RNA_m-TG. Já Leoni *et al.*

(2007), mostraram que o excesso de iodo modula a expressão gênica nas células tireoidianas e particularmente diminui a expressão do RNAm-TG. Além disso, existe a possível interferência dos restos tireoidianos na avaliação da TGs (Ringel & Landenson, 2004), interferindo no seguimento do pacientes. Por outro lado, Caballero-Calabuig (2008) mostraram que a existência de tecido tireoidiano nem sempre estaria associada à TGs detectável. Resultados similares foram encontrados no presente estudo, quando se verificou que 2 pacientes com restos tireoidianos, confirmado por PCI de 2 a 3 anos após ablação, apresentavam TGs indetectável, porém com valores elevados de mRNA-TG.

Por outro lado, nos estudos de Kaufmann *et al.* (2004) foi detectado produto de amplificação do RNAm-TG em sangue periférico de pacientes atireóticos enquanto que a TGs, dosada pelo método IRMA, não foi identificada, sugerindo transcrição ectópica e/ou ilegítima do gene TG em tecido extra-tireoidiano, contribuindo para a detecção do RNAm-TG no sangue dos pacientes atireóticos (Verburg *et al.*, 2004).

Para finalizar, a análise sistemática da quantificação do mRNA de TG como marcador nesta pesquisa confirmou que nenhum dos trabalhos publicados até setembro de 2008 apresentou padronização adequada e concordante para realizar uma metanálise e se chegar a conclusões satisfatórias quanto a utilização do RNAm-TG como marcador no acompanhamento destes pacientes.

Mesmo assim, os resultados deste estudo, mostraram que os valores de RNAm-TG de sangue periférico, na maioria dos casos não foram

concordantes com a clínica dos pacientes e tampouco com os níveis séricos de TG, indicando que o RNAm-TG não é um bom marcador da doença tireoidiana, mesmo havendo realizado extensiva padronização da técnica, tendo considerados a maioria das variáveis que podem interferir na técnica de RT-PCR em tempo real.

Este estudo demonstra que a técnica de RT-PCR em tempo real é muito sensível que perde especificidade, tornando inviável sua utilização no acompanhamento dos pacientes com CDT.

Perspectivas futuras

Pesquisadores continuam se empenhando em encontrar outras ferramentas que possam auxiliar na identificação da recidiva do câncer de tireóide. Nos últimos anos, iniciou-se o estudo do uso da TGs ultra-sensível (sensibilidade 0,1 µg/l) como novo marcador de recidiva da doença (Cooper *et al.*, 2006; Iervasi *et al.*, 2007).

VII. CONCLUSÃO

Definitivamente, o RNAm-TG não é um bom marcador de recidiva do carcinoma diferenciado de tireóide, mesmo na avaliação a longo prazo e na presença de Acs anti-TG, não podendo ser utilizado como método diagnóstico complementar no acompanhamento de pacientes com CDT.

VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arturi F, Russo D, Giuffrida D, Ippolito A, Perrotti N, Vigneri R, Filetti S. Early diagnosis by genetic analysis of differentiated thyroid cancer metastases in small lymph nodes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(5):1638-41.

Barbaro D, Boni G, Meucci G, Simi U, Lapi P, Orsini P, Pasquini C, Piazza F, Caciagli M, Mariani G. Radioiodine treatment with 30 mCi after recombinant human thyrotropin stimulation in thyroid cancer: effectiveness for postsurgical remnants ablation and possible role of iodine content in L-thyroxine in the outcome of ablation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(9):4110-5.

Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P, Gabert J. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia.* 2003;17(12):2474-86.

Bellantone R, Lombardi CP, Bossola M, Ferrante A, Princi P, Boscherini M, Maussier L, Salvatori M, Rufini V, Reale F, Romano L, Tallini G,

Zelano G, Pontecorvi A. Validity of thyroglobulin mRNA assay in peripheral blood of postoperative thyroid carcinoma patients in predicting tumor recurrences varies according to the histologic type: results of a prospective study. *Cancer*. 2001;92:2273-9.

Bergé-Lefranc JL, Cartouzou G, De Micco C, Fragu P, Lissitzky S. Quantification of thyroglobulin messenger RNA by in situ hybridization in differentiated thyroid cancers. Difference between well-differentiated and moderately differentiated histologic types. *Cancer*. 1985;56(2):345-50.

Biscolla RP, Cerutti JM, 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.

Bojunga J, Roddiger S, Stanisch M, Kusterer K, Kurek R, Renneberg H, Adams S, Lindhorst E, Usadel KH, Schumm-Draeger PM. Molecular detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease by RT-PCR. *Br J Cancer*. 2000;85(10):1650-5.

Bojunga J, Zeuzem S. Molecular detection of thyroid cancer: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004;61(5):523-30.

Botella-Carretero JI, Prados A, Manzano L, Montero MT, Escribano L, Sancho J, Escobar-Morreale HF. The effects of thyroid hormones on circulating markers of cell-mediated immune response, as studied in patients with differentiated thyroid carcinoma before and during thyroxine withdrawal. *Eur J Endocrinol.* 2005;153(2):223-30.

Bugalho MJ, Domingues RS, Pinto AC, Garrao A, Catarino AL, Ferreira T, Limbert E, Sobrinho L. Detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of individuals with and without thyroid glands: evidence for thyroglobulin expression by blood cells. *Eur J Endocrinol.* 2001;145:409-13.

Caballero-Calabuig E, Cano-Terol C, Sopena-Monforte R, Reyes-Ojeda D, Abreu-Sánchez P, Ferrer-Rebolleda J, Sopena-Novales P, Plancha-Mansanet C, Félix-Fontestad J. Influence of the thyroid remnant in the elevation of the serum thyroglobulin after thyroidectomy in differentiated thyroid carcinoma. Importance of the diagnostic iodine total-body scanning. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2008;35(8):1449-56.

Chia SY, Milas M, Reddy SK, Siperstein A, Skugor M, Brainard J, Gupta MK. Thyroid-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid measurement in blood as a marker for circulating thyroid cancer cells and its role in the preoperative diagnosis of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(2):468-75.

Chinnappa P, Taguba L, Arciaga R, Faiman C, Siperstein A, Mehta AE, Reddy SK, Nasr C, Gupta MK. 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.* 2004;89(8):3705-9.

Chiovato L, Latrofa F, Braverman LE, Pacini F, Capezzone M, Masserini L. Disappearance of humoral autoimmunity after complete removal of thyroid antigens. *Ann Intern Med.* 2003;139:346-51.

Coelho SM, Vaisman M, de Carvalho DP. Thyroglobulin mRNA amplification in peripheral blood of patients with differentiated thyroid carcinoma: what does it really mean? *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(3):427-35.

Conover WJ. *Practical nonparametric statistics.* 2a. ed. New York: Wiley; 1980.

Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Sherman SI, Tuttle RM. The American Thyroid Association Guidelines Taskforce. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2006;16(2):109-42.

Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA*. 2006;295(18):2164-7.

Denizot A, Delfino C, Dutour-Meyer A, Fina F, Ouafik L. Evaluation of quantitative measurement of thyroglobulin mRNA in the follow-up of differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2003;13(9):867-72.

Ditkoff BA, Marvin MR, Yemul S, Shi YJ, Chabot J, Feind C, Lo Gerfo PL. Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood. *Surgery*. 1996;120(6):959-65.

Elisei R, Vivaldi A, Agate L, Molinaro E, Nencetti C, Grasso L, Pinchera A, Pacini F. 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*. 2004;89(1):33-9.

Endo T, Ohta K, Haraguchi K, Onaya T. Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor cDNA from rat fat cells. *J Biol Chem*. 1995;270(18):10833-7.

Eszlinger M, Neumann S, Otto L, Paschke R. 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*. 2002;147(5):575-82.

Feldt-Rasmussen U, Profilis C, Colinet E, Black E, Bornet H, Bourdoux P, Carayon P, Ericsson UB, Koutras DA, Lamas de Leon L, DeNayer P, Pacini F, Palumbo G, Santos A, Schlumberger M, Seidel C, Van Herle AJ, De Vijlder JJ. Human thyroglobulin reference material (CRM 457). 1st Part: Assessment of homogeneity, stability and immunoreactivity. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1996;54(10-11):337-42.

Fenton C, Anderson JS, Patel AD, Lukes Y, Solomon B, Tuttle RM, Ringel MD, Francis GL. Thyroglobulin messenger ribonucleic acid levels in the peripheral blood of children with benign and malignant thyroid disease. *Pediatr Res*. 2001;49(3):429-34.

Francis T, Burch HB, Cai WY, Lukes Y, Peele M, Carr FE, Wartofsky L, Burman KD. Lymphocytes express thyrotropin receptor-specific mRNA as detected by the PCR technique. *Thyroid*. 1991;1(3):223-8.

Frasoldati A, Pesenti M, Gallo M, Caroggio A, Salvo D, Valcavi R. Diagnosis of neck recurrence in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer*. 2003;97:91-6.

Fugazzola L, Mihalich A, Persani L, Cerutti N, Reina M, Bonomi M, Ponti E, Mannavola D, Giammona E, Vannucchi G, di Blasio AM, Beck-Peccoz P. 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.* 2002;87(7):3201-8.

Fuhrer D, Eszlinger M, Karger S, Krause K, Engelhardt C, Hasenclever D, Dralle H, Paschke R. Evaluation of insulin-like growth factor II, cyclooxygenase-2, ets-1 and thyroid-specific thyroglobulin mRNA expression in benign and malignant thyroid tumours. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(5):785-90.

Gardner DF, Rothman J, Utiger RD. Serum thyroglobulin in normal subjects and patients with hyperthyroidism due Graves' disease: Effects of T3, iodide, ¹³¹I and antithyroid drugs. *Clin Endocrinol.* 1979;11(6):585-94.

Grammatopoulos D, Elliott Y, Smith SC, Brown I, Grieve RJ, Hillhouse EW, Levine MA, Ringel MD. Measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood as an adjunctive test for monitoring thyroid cancer. *Mol Pathol.* 2003;56(3):162-6.

Guasti L, Marino F, Cosentino M, Cimpanelli M, Rasini E, Piantanida E, Vanoli P, De Palma D, Crespi C, Klersy C, Maroni L, Loraschi A, Colombo C, Simoni C, Bartalena L, Lecchini S, Grandi AM, Venco A. Pain perception, blood pressure levels, and peripheral benzodiazepine receptors in patients followed for differentiated thyroid carcinoma: a

longitudinal study in hypothyroidism and during hormone treatment. *Clin J Pain*. 2007;23(6):518-23.

Gubała E, Handkiewicz-Junak D, Zeman M, Chmielik E, Wiench M, Jarzab B. Thyroglobulin RT-PCR method for detection of lymph node metastases during the course of differentiated thyroid cancers. *Wiad Lek*. 2001;54(1):349-56.

Hoang-Vu C, Dralle H, Scheumann G, Maenhaut C, Horn R, von zur Mühlen A, Brabant G. Gene expression of differentiation- and dedifferentiation markers in normal and malignant human thyroid tissues. *Exp Clin Endocrinol*. 1992;100(1-2):51-6.

Hosmer D, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. 2a. ed. New York: Wiley&Sons; 2000.

Hu S, Ewertz M, Tufano RP, Brait M, Carvalho AL, Liu D, Tufaro AP, Basaria S, Cooper DS, Sidransky D, Ladenson PW, Xing M. Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: a novel diagnostic tool for thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(1):98-104.

Huang SH, Wang PW, Huang YE, Chou FF, Liu RT, Tung SC, Chen JF, Kuo MC, Hsieh JR, Hsieh HH. Sequential follow-up of serum thyroglobulin

and whole body scan in thyroid cancer patients without initial metastasis.

Thyroid. 2006;16(12):1273-8.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*. 2005;6(4):279-84.

Iervasi A, Iervasi G, Ferdeghini M, Solimeo C, Bottoni A, Rossi L, Colato C, Zucchelli GC. Clinical relevance of highly sensitive Tg assay in monitoring patients treated for differentiated thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;67(3):434-41.

Ishikawa T, Miwa M, Uchida K. Quantitation of thyroid peroxidase mRNA in peripheral blood for early detection of thyroid papillary carcinoma. *Thyroid*. 2006;16(5):435-42.

Kaczka K, Wójcik I, Matejkowska M, Kuzdak K, Pomorski L. Lymph node metastases of papillary thyroid cancer in immunohistochemical and molecular examination-preliminary report. *Endokrynol Pol*. 2005;56(2):160-7.

Karavitaki N, Lembessis P, Tzanela M, Vlassopoulou V, Thalassinou N, Koutsilieris M. Molecular staging using qualitative RT-PCR analysis detecting thyroglobulin mRNA in the peripheral blood of patients with

differentiated thyroid cancer after therapy. *Anticancer Res.* 2005;25(4):3135-4.

Kaufmann S, Schmutzler C, Schomburg L, Körber C, Luster M, Rendl J, Reiners C, Köhrle J. Real time RT-PCR analysis of thyroglobulin mRNA in peripheral blood in patients with congenital athyreosis and with differentiated thyroid carcinoma after stimulation with recombinant human thyrotropin. *Endocr Regul.* 2004;38(2):41-9.

Elenitoba-Johnson KS, Bohling SD, Jenson SD, Lin Z, Monnin KA, Lim MS. Fluorescence PCR quantification of cyclin D1 expression. *J Mol Diagn.* 2002;4(2):90-6.

Leoni SG, Galante PA, Ricarte-Filho JC, Kimura ET. Differential gene expression analysis of iodide-treated rat thyroid follicular cell line PCCI3. *Genomics.* 2008;91(4):356-66.

Li D, Butt A, Clarke S, Swaminathana R. Real-time quantitative PCR measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of thyroid cancer patients and healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1022:147-51.

Martinez AZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cadernos de Saúde Coletiva*. 2003;11(1):7-3

Mazzaferri EL, Robbins RJ, Spencer CA, Braverman LE, Pacini F, Wartofsky L, Haugen BR, Sherman SI, Cooper DS, Braunstein GD, Lee S, Davies TF, Arafah BM, Ladenson PW, Pinchera A. A consensus report of the role of serum thyroglobulin as a monitoring method for low-risk patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(4):1433-41.

Mendive FM, Rivolta CM, Moya CM, Vassart G, Targovnik HM. Genomic organization of the human thyroglobulin gene. The complete intron–exon structure. *Eur J Endocrinol* 2001;145:485–96.

Milas M, Mazzaglia P, Chia SY, Skugor M, Berber E, Reddy S, Gupta M, Siperstein A. The utility of peripheral thyrotropin mRNA in the diagnosis of follicular neoplasms and surveillance of thyroid cancers. *Surgery*. 2007;141(2):137-46.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. (1996). *Applied Linear Statistical Models*. 4a ed. Illinois: Richard D. Irwing; 1996.

Ohta K, Endo T, Onaya T. The mRNA levels of thyrotropin receptor, thyroglobulin and thyroid peroxidase in neoplastic human thyroid tissues.

Biochem Biophys Res Commun. 1991;174(3):1148-53.

Pacini F, Molinaro E, Castagna MG, Lippi F, Ceccarelli C, Agate L, Elisei R, Pinchera A. Ablation of thyroid residues with 30 mCi (¹³¹I): a comparison in thyroid cancer patients prepared with recombinant human TSH or thyroid hormone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(9):4063-8.

Pacini F, Ladenson PW, Schlumberger M, Driedger A, Luster M, Kloos RT, Sherman S, Haugen B, Corone C, Molinaro E, Elisei R, Ceccarelli C, Pinchera A, Wahl RL, Leboulleux S, Ricard M, Yoo J, Busaidy NL, Delpassand E, Hanscheid H, Felbinger R, Lassmann M, Reiners C. Radioiodine ablation of thyroid remnants after preparation with recombinant human thyrotropin in differentiated thyroid carcinoma: results of an international, randomized, controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):926-32.

Pacini F, Castagna MG, Brilli L, Jost L; ESMO Guidelines Working Group. Differentiated thyroid cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2008;19(2):ii99-101.

Parthasarathy KL, Crawford ES. Treatment of thyroid carcinoma: Emphasis on high dose ¹³¹I out patient therapy. *J Nucl Med Tech.* 2002;30(4):165-71.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004;26(6):509-15.

Regalbuto C, Alagona C, Maiorana R, Di Paola R, Cianci M, Alagona G, Sapienza S, Vigneri R, Pezzino V. Acute changes in clinical parameters and thyroid function peripheral markers following L-T4 withdrawal in patients totally thyroidectomized for thyroid cancer *J Endocrinol Invest.* 2006;29(1):32-40.

Ringel MD, Ladenson PW. Controversies in the follow-up and management of well-differentiated thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(1):97-116.

Ringel MD, Ladenson PW, Levine ML. Molecular diagnosis of residual and recurrent thyroid cancer by amplification of thyroglobulin Messenger ribonucleic acid in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:435-42.

Ringel MD, Balducci-Silano PL, Anderson JS, Spencer CA, Silverman J, Sparling YH, Francis GL, Burman KD, Wartofsky L, Ladenson PW, Levine MA, Tuttle RM. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of circulation thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(11):4037-42.

Ringel MD. Editorial: Molecular detection of thyroid cancer: differentiating “signal” and “noise” in clinical assays. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(1):29-32.

Robbins RJ, Schlumberger MJ. The evolving role of (131)I for the treatment of differentiated thyroid carcinoma. *J Nucl Med.* 2005;46 Suppl 1:28S-37S.

Robbins RJ, Tuttle RM, Sharaf RN, Larson SM, Robbins HK, Ghossein RA, Smith A, Drucker WD. Preparation by recombinant human thyrotropin or thyroid hormone withdrawal are comparable for the detection of residual differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(2):619-25.

Robbins RJ, Chon JT, Fleisher M, Larson SM, Tuttle RM. Is the serum thyroglobulin response to recombinant human thyrotropin sufficient, by

self, to monitor for residual thyroid carcinoma? *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3242-7.

Robbins RJ, Driedger A, Magner J; U.S. and Canadian Thyrogen Compassionate Use Program Investigator Group. Recombinant human thyrotropin-assisted radioiodine therapy for patients with metastatic thyroid cancer who could not elevate endogenous thyrotropin or be withdrawn from thyroxine. *Thyroid*. 2006;16(11):1121-30.

Rosário PWS, Maia FFR, Fagundes TA, Vasconcelos FP, Cardoso LD, Purish S. Antithyroglobulin autoantibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma: methods of detection, interference with serum thyroglobulin measurements and clinical significance. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004;48(4):487-92.

Rosário PWS, Fagundes TA, Purish S, Padrão EL, Rezende LL, Barroso AL. TSH Recombinante no tratamento e seguimento de pacientes com carcinoma diferenciado de tireóide: Uso na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005;49(3):350-8.

Rosário PWS, Maia FCP, Barroso AL, Purish S. Abordagem dos pacientes com carcinoma diferenciado de tireóide com tireoglobulina sérica elevada e pesquisa de corpo inteiro negativa. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005;49(2):246-52.

Rosário PW, Cardoso LD, Fagundes TA, Barroso AL, Padrão EL, Rezende LL, Purisch S. Revisiting serum thyroglobulin in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004;48(4):480-6.

Rubio IG, Silva MN, Knobel M, Romão R, Possato R, Gebrin EM, Buchpiguel C, Medeiros-Neto G. Peripheral blood levels of thyroglobulin mRNA and serum thyroglobulin concentrations after radioiodine ablation of multinodular goiter with or without pre-treatment with recombinant human thyrotropin. *J Endocrinol Invest.* 2007;30(7):535-40.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Enzymes used in molecular cloning, p 5.83. In: *Molecular cloning, A laboratory manual.* 2^o ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Savagner F, Rodien P, Reynier P, Rohmer V, Bigorgne JC, Malthiery Y. Analysis of TGs transcripts by real-time RT-PCR in the blood of thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(2):635-9.

Span PN, Slegers MJ, Van den Broek WJ, Ross HA, Nieuwlaat WA, Hermus AR, Sweep CG. Quantitative detection of peripheral thyroglobulin mRNA has limited clinical value in the follow-up of thyroid cancer patients. *Ann Clin Biochem.* 2003;40:94-9.

Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M. Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays. *Clin Chem*. 1996;42(1):164-73.

Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M, Wang C, Guttler RB, Singer PA, Fatemi S, LoPresti JS, Nicoloff JT. Serum thyroglobulin autoantibodies: Prevalence, influence on serum thyroglobulin measurements and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocr Metab*. 1998;83:1121-7.

Spencer CA, LoPresti JS, Fatemi S, Nicoloff JT. Detection of residual and recurrent differentiated thyroid carcinoma by serum thyroglobulin measurement. *Thyroid*. 1999;9(5):435-41

Spencer CA. Editorial: Challenges of serum thyroglobulin (Tg) measurement in the presence of Tg autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):3702-4.

Spencer CA, Bergoglio LM, Kazarosyan M, Fatemi S, LoPresti JS. Clinical impact of thyroglobulin (Tg) and Tg autoantibody method differences on the management of patients with differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocr Metab*. 2005;90(10):5566-75.

Takano T, Miyauchi A, Yoshida H, Hasegawa Y, Kuma K, Amino N. Quantitative measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of patients after total thyroidectomy. *Br J Cancer*. 2001;85:102-6.

Tallini G, Ghossein RA, Emanuel J, Gill J, Kinder B, Dimich AB, Costa J, Robbins R, Burrow GN, Rosai J. Detection of thyroglobulin, thyroid peroxidase, and RET/PTC1 mRNA transcripts in the peripheral blood of patients with thyroid disease. *J Clin Oncol*. 1998;16(3):1158-66.

Torrens JI, Burch HB. Serum thyroglobulin measurement. Utility in clinical practice. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2001;30:429-67.

User Bulletin #2 – ABI Prism 7700 Sequence Detection System. December 11, 1997 (updated 10/2001). Disponível em: http://www.ukl.uni-freiburg.de/core-facility/taqman/user_bulletin_2.pdf.

Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, Roy NV, Paepe DA, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002;3(7):RESEARCH0034.

Verburg FA, Lips CJ, Lentjes EG, de Klerk JM. Detection of circulating Tg-mRNA in the follow-up of papillary and follicular thyroid cancer: how useful is it? *Br J Cancer*. 2004;91(2):200-4.

Zöphel K, Wunderlich G, Smith BR. Serum thyroglobulin measurements with a high sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay: is there a clinical benefit in patients with differentiated thyroid carcinoma? *Thyroid*. 2003;13(9):861-5.

Ward LS, Santarosa PL, Granja F, da Assumpção LV, Savoldi M, Goldman GH. Low expression of sodium iodide symporter identifies aggressive thyroid tumors. *Cancer Lett*. 2003;200(1):85-91.

Wingo ST, Ringel MD, Anderson JS, Patel AD, Lukes YD, Djuh YY, Solomon B, Nicholson D, Balducci-Silano PL, Levine MA, Francis GL, Tuttle RM. Quantitative reverse transcription-PCR measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of healthy subjects. *Clin Chem*. 1999;45:785-9.

IX. ANEXOS

ANEXO 1: DOSAGENS SÉRICAS HORMONAIAS DE TG, Ac anti-TG e RNAm de TG DE PACIENTES SEM METÁSTASE (SM)

Paciente 1-MVS

TEMPO	RNAm-TG _{HPRT1} (UA)	RNAm-TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	4,23	2,92	<35	308,2	46,9	< 19,0	< 2,0	< 0,2
24	2,15	4,65	<35	334,6	42,6	< 19,0	< 2,0	< 0,2
48	0,13	4,24	-	-	-	-	-	-
72	1,66	2,97	-	-	-	-	-	-
3m	-	-	-	-	0,08	149	15,4	1,8

Paciente 2-AMR

TEMPO	RNAm-TG _{HPRT1} (UA)	RNAm-TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,43	4,1	<35	-	106,2	< 20,0	< 2,0	< 0,02
24	0,21	1,41	<35	-	105,3	< 20,0	< 2,0	< 0,02
48	0,01	0,24	<35	-	105,2	< 20,0	< 2,0	< 0,02
72	0,01	0,62	<35	-	104,6	< 20,0	< 2,0	< 0,02
1sem	0,42	1,84	<35	-	100	< 20,0	< 2,0	< 0,02
1m	0,22	1,24	<35	<1,0	10	36,3	5,1	0,6
3m	-	-	<35	<1,0	38,6	180	9	1,3
4a	0,4	1,48	<35	<1,0	0,14	86	18,2	2,2
5a	1,13	1,39	<35	<1,0	0,26	69	21	3,21

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL
T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL
TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 3-AVC

TEMPO	RNAm-TG _{HPRT1} (UA)	RNAm-TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,66	1,74	42,9	2,2	80,7	< 20,0	< 2,0	< 0,02
24	1,76	4,34	42,3	2,8	81,7	< 20,0	< 2,0	< 0,02
48	1,88	3,33	45,2	2,8	72,6	< 20,0	< 2,0	< 0,02
72	0,98	3,00	46	2,7	80,2	< 20,0	< 2,0	< 0,02
1sem	1,04	2,84	<35	2,1	73,5	40	4,4	0,6
1m	3,85	3,29	<35	1,1	1,2	91,3	9,6	1,9
3m	0,31	1,65	-	-	1	88	8,5	1,4
4m	0,19	1,13	<35	<1,0	-	-	-	-
9m	-	-	-	-	5,43	104	7,8	0,9
2a	-	-	-	-	0,49	106	9,4	1,3
4a	1,35	2,98	<35	<1,0	0,21	122	10,3	1,25
5a	2,9	2,39	<35	<1,0	<0,03	126	11,8	1,82
6a	3,52	2,56	<35	<1,0	<0,03	135	12,5	1,92

Paciente 4-A-I

TEMPO	RNAm-TG _{HPRT1} (UA)	RNAm-TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	2,26	2,25	-	<1,0	83,7	28,4	< 2,0	< 0,02
24	3,62	3,78	-	<1,0	57	19,5	< 2,0	< 0,02
48	2,05	2,02	-	<1,0	100	< 19,5	< 2,0	< 0,02
72	2,12	2,14	<35	2,5	100	< 19,5	< 2,0	< 0,02
1sem	-	-	-	67,6	100	< 19,5	< 2,0	< 0,02
1m	-	-	1745	1,4	54,1	70,4	7,4	1
3m	1,9	2,01	1504,6	<1,0	7,3	96,8	8,7	1,5
9m	0,5	0,91	218	<1,0	0,2	141	13,2	2,3
1a	1,6	1,69	93,6	<1,0	0,023 CL	112	13	2,4
1a6m	-	-	56	-	0,06	119	12,5	1,9
2a	-	-	-	-	0,49	120	12,1	1,4

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 5-CVV

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	1,52	1,64	<35	1	50	< 80,0	< 2,0	< 0,2
24	1,52	2,25	<35	4	50	< 80,0	< 2,0	< 0,2
48	1,48	2,44	<35	5	50	> 80,0	< 2,0	< 0,2
72	0,31	2,08	<35	31	50	80	0,9	< 0,2
1sem	1,80	2,47	<35	80	50	< 80,0	< 2,0	< 0,2
1m	1,24	2,04	<35	<1,0	50	140	7	1,1
1a	0,27	0,50	<35	<1,0	0,005	151,9	16,1	2,9
5a	1,1	1,9	<35	<1,0	1,08	92	10,3	1,08
6a	3,15	3,78	<35	<1,0	1,12	130	18	1,66
7a	5,49	7,28	<35	<1,0	4,39	126	14,2	1,37

Paciente 6-D-C

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,88	0,61	<35	<1,0	83,8	20	< 2,0	< 0,2
24	1,49	0,90	<35	1,2	98,8	< 20,0	< 2,0	< 0,2
48	1,35	1,35	<35	1	100	< 20,0	< 2,0	< 0,2
72	-	-	<35	<1,0	91,2	< 20,0	< 2,0	< 0,2
1sem	0,58	0,45	<35	2,2	100	< 20,0	< 2,0	< 0,2
1m	0,82	0,64	<35	-	68,1	81,3	4	0,5
3m	0,41	0,30	<35	<1,0	0,5	84,5	7,7	1,4
6m	-	-	-	-	0,16	146	12,1	1,1
9m	-	-	-	-	0,03	115	11,2	1,2
1a6m	-	-	-	-	0,03	127	10,5	1,2
2a	-	-	-	-	0,03	128	9,8	1,4
5a	1,72	1,34	<35	<1,0	0,63	106	10,8	1,21
6a	2,66	2,08	<35	<1,0	0,4	131	10,7	1,32
7a	4,11	3,23	35	<1,0	0,63	100	11,1	1,28

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 7-FFP

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	-	-	<35	3,5	100	< 20,0	< 2,0	< 0,2
24	-	-	<35	5,4	100	< 20,0	< 2,0	< 0,2
48	-	-	<35	4,3	100	< 20,0	< 2,0	< 0,2
72	0,85	1,34	<35	5,5	100	< 20,0	< 2,0	< 0,2
1sem	0,48	2,28	<35	23,1	100	< 20,0	< 2,0	< 0,2
1m	0,92	2,91	<35	2,8	21,4	90	6,2	0,7
3m	-	-	-	-	4,21	137	11,1	1
6m	-	-	-	-	8,53	109	9,9	0,8
9m	-	-	-	-	3,51	126	11,2	1,1
1a	-	-	-	-	2,44	96	7,8	0,9
1a6m	-	-	-	-	0,03	137	14,2	2,3
2a	-	-	-	-	0,03	145	15	2,4
3a	-	-	-	-	5,88	98	5,3	0,7
5a	0,36	3,54	<35	<1,0	<0,03	164	15,3	1,94
6a	1,99	3,08	<35	<1,0	<0,03	132	13,1	1,79
7a	1,81	1,47	<35	<1,0	0,09	135	10,4	1,15

Paciente 8-HBF

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,33	0,62	<35	<1,0	110	80	2	0,2
24	0,53	0,89	<35	-	120	-	-	-
48	0,16	0,82	<35	-	100	-	-	-
1sem	0,44	0,90	-	-	85	-	-	-
1m	0,52	0,86	-	-	-	-	-	-
6a	0,99	0,84	<35	<1,0	0,04	104	11,8	1,71

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 9-IPS

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,71	0,50	<35	3	50	< 80,0	< 2,0	< 0,2
24	0,45	0,09	<35	3	50	< 80,0	< 2,0	< 0,2
48	0,60	0,08	<35	6	50	< 80,0	< 2,0	< 0,2
72	0,63	0,12	<35	6	50	< 80,0	< 2,0	< 0,2
1sem	0,73	0,11	<35	4	-	-	-	-
1m	0,30	0,08	<35	8	39,6	190	13	0,9
3m	-	-	-	-	68,1	98	6,7	0,6
6m	-	-	-	-	0,67	155	15	1,6
9m	-	-	-	-	1,38	110	10	1,1
1a	-	-	-	1,4	0,5	94,2	7,9	1,3
1a6m	-	-	-	-	0,73	138	12,8	1,2
2a	-	-	-	-	8,33	112	10,4	1
5a	3,23	1,72	<35	1,8	15,9	95	12	1,18
6a	1,59	0,62	<35	<1,0	0,1	72	10,1	1,59
7a	1,68	1,29	<35	4,2	16,15	100	10	1,01

Paciente 10-MAK

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	-	-	79,5	19	35,6	<80,0	< 2,0	< 0,2
24	1,63	0,97	67,5	<1,0	39,4	< 80,0	< 2,0	< 0,2
48	2,31	2,78	68,1	<1,0	50	> 80,0	> 2,0	< 0,2
72	-	-	-	<1,0	45,7	> 80,0	> 2,0	< 0,2
1sem	0,95	1,39	45,7	<1,0	50	< 80,0	< 2,0	< 0,2
1m	0,26	0,34	54,5	<1,0	0,05	190	15	2,2
3m	-	-	-	-	0,06	106	10,1	1,5
6m	-	-	-	-	0,06	140	12,5	1,4
1a	0,83	1,15	<35	<1,0	0,009	122,7	11,2	2,4
1a6m	1,1	1,6	-	-	6,54	97	7,7	0,7
2a	-	-	-	-	1,33	113	10	1
3a	-	-	-	-	0,04	135	10,9	1,5
4a	-	-	-	-	0,12	119	9,9	1,4
5a	0,61	0,75	<35	<1,0	0,2	117	12,9	1,56
6a	1,26	0,92	<35	<1,0	0,09	112	12,7	1,62
7a	2,42	1,35	<35	<1,0	0,51	125	11,7	1,6

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: >12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: >20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL; TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: <35 U/mL

Paciente 11-V-V

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	1,38	1,92	<35	1,8	85,23	46	2,1	<0,3
1sem	1,14	1,89	-	-	-	-	-	-
1m	0,83	0,85	<35	<1,0	-	-	-	-
3m	1,27	0,62	<35	-	30,95	100	10,9	1,24

Paciente 12-APC

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	1,33	0,96	-	<1,0	100	<19	<24	<0,02
24	-	-	-	-	87,8	<33	<1,5	0,3
1m	-	-	-	-	20,9	110	11,2	1,2
1a	-	-	-	-	0,37	140	14,2	1,4
3a	1,84	1,19	<35	<1,0	0,07	132	18,2	2,17
4a	1,65	1,02	<35	<1,0	0,13	105	17	2,36
5a	1,21	1,27	<35	<1,0	5,43	112	12,5	1,2

Paciente 13-AGT

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,78	0,72	-	-	-	-	-	-
48	1,33	2,7	-	-	-	-	-	-
72	1,37	2,19	-	-	-	-	-	-
1sem	3,94	2,03	-	-	-	-	-	-
1m	-	-	-	-	36,1	83	4,2	0,4
3m	-	-	121	-	5,5	124	8,7	0,9
6m	-	-	-	-	3,3	139	9,7	0,9
9m	-	-	<35	-	0,03	104	11,4	1,4
3a	-	-	<35	-	0,15	115	13	1,9
4a	-	-	-	-	0,21	130	11,5	1,6
5a	0,94	1,42	42	<1,0	12,32	98	10,5	1,15
6a	2,30	1,22	<35	<1,0	<0,03	101	11,5	1,7
7a	4,56	1,83	<35	<1,0	<0,03	134	13	1,79

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 14-CBB

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,29	0,31	<35	<1,0	50	<80	<2,0	<0,2
24	0,56	0,70	<35	<1,0	50	<80	<2,0	<0,2
48	0,08	0,15	<35	<1,0	50	<80	<2,0	<0,2
72	0,29	0,24	<35	5	-	-	-	-
1sem	0,22	0,31	<35	<1,0	50	<80	<2,0	<0,2
1m	-	-	-	<1,0	12,5	110	14,4	1,8
6m	-	-	-	-	0,03	166	18,7	2,2
9m	-	-	-	-	0,03	156	17,3	2,5
3a	-	-	-	-	0,03	150	16,1	2,54
5a	0,23	0,96	<35	<1,0	0,29	118	14	1,62

Paciente 15-FSV

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	1,46	1,06	<35	21,9	48,9	<70	<2,0	<0,2
24	2,64	1,16	<35	22,7	50	<70	<2,0	<0,2
48	1,64	1,16	<35	27,5	-	-	-	-
72	2,52	1,41	<35	53,6	50,7	<70	2	<0,2
1sem	2,17	1,14	<35	85,9	50,5	<70	3	2
3m	-	-	-	-	18,3	85	4,9	0,6
6m	-	-	-	-	4,78	156	8,1	0,9
9m	-	-	-	-	-	99	9,7	1,1
1a	-	-	-	-	0,83	86	7,3	0,9
1a6m	-	-	-	-	0,13	112	9,7	1,1
2a	-	-	-	-	1,28	96	8,4	1
4a	-	-	-	-	0,49	109	9,6	1,1
5a	2,13	1,28	<35	<1,0	0,54	109	11	1,18
6a	0,81	1,13	<35	<1,0	0,25	85	8,7	1,28

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 16-L-F

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,70	0,76	<35	3,6	93	86,2	3,7	0,3
24	1,64	1,02	<35	4,1	110	65,9	3,1	0,3
48	0,99	0,95	<35	4	110	65,9	3,1	0,3
72	1,37	1,01	<35	6	108	65,3	3	0,3
1sem	0,87	0,70	<35	44,7	102	75,7	3,2	0,3
1m	1,32	0,83	<35	1,3	55,9	135	11	1,1
3m	1,23	0,61	<35	<1,0	1	202	16,5	2
6m	-	-	-	-	0,04	151	16,3	1,8
1a	-	-	-	-	0,03	165	17,8	1,8
1a6m	-	-	-	-	3,28	121	11,6	1
3a	-	-	-	-	2,29	147	12,8	1,3
4a	0,54	0,85	<35	<1,0	0,15	155	15,5	1,21
5a	1,88	1,12	<35	<1,0	0,07	142	16,6	1,45
6a	4,39	3,36	<35	<1,0	0,2	141	14,6	1,22

Paciente 17-LAS

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,51	1,01	<35	22,9	-	-	-	-
24	0,93	1,39	-	-	-	-	-	-
48	1,12	1,92	-	-	-	-	-	-
72	1,24	1,20	-	-	-	-	-	-
1sem	0,62	-	-	-	-	-	-	-
1m	-	-	-	-	39,6	69	7,2	0,6
3m	-	-	-	-	4,57	92	8,7	1,1
6m	-	-	-	-	0,23	123	11,1	1,6
9m	-	-	-	-	-	143	13,1	1,7
1a	-	-	<35	22,9	0,47	343	2,7	0,3
2a	-	-	<35	<1,0	0,49	81	8,8	1,1
4a	0,62	0,88	<35	<1,0	0,87	14,4	14,4	1,54
5a	2,26	2,79	<35	<1,0	0,38	10,9	10,9	1,68
6a	2,75	1,46	<35	<1,0	0,18	98	16	2,23

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 18-MTC

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,81	2,10	<35	<1,0	96,5	<20	<2,0	<0,02
24	-	-	-	-	88,7	<19	0,6	<0,02
48	0,90	5,92	<35	2,4	100	<19,5	0,6	<0,02
72	0,63	4,47	<35	<1,0	100	<19,5	0,58	<0,02
1sem	0,82	6,59	<35	46,6	90,8	<19,5	1,78	0,2
1m	0,68	4,51	-	<1,0	37,8	40	6	0,9
3m	-	-	<35	1,3	6,1	79,5	6,5	1,2
6m	-	-	<35	17,1	2,2	90	8	-
9m	1,41	1,93	<35	<1,0	0,8	114	9	1,5
1a	3,94	5,99	<35	78,3	0,15	90	12	2,1
1a6m	-	-	-	-	1,16	109	9,6	1,1
3a	-	-	-	-	0,1	96	12,4	1,4
4a	0,91	2,04	<35	<1,0	0,83	90	9,9	1,09
5a	2,8	2,17	<35	<1,0	0,4	92	13,1	1,79
6a	2,59	1,88	<35	<1,0	0,44	118	11,3	1,07

Paciente 19-MSc

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	-	-	<35	<1,0	28,7	<80	< 2,0	< 0,2
24	-	-	<35	<1,0	32,3	<80	< 2,0	< 2,0
48	-	-	<35	<1,0	44,6	<80	< 2,0	0,3
72	0,05	0,12	<35	<1,0	50	<80	< 2,0	< 2,0
1sem	0,15	1,24	-	-	-	-	-	-
1m	0,30	0,17	<35	<1,0	27,8	80	9	0,8
3m	-	-	-	-	46	81	5,1	0,5
9m	-	-	<35	<1,0	94,3	<33	<1,5	<0,2
1a	-	-	<35	<1,0	1,47	131	14,4	1,4
1a6m	-	-	<35	<1,0	0,03	150	16,2	2,8
2a	-	-	<35	<1,0	13,2	84	8,2	0,9
3a	-	-	<35	<1,0	0,03	111	10,3	1,5
4a	-	-	<35	<1,0	0,14	88	9,4	1,4
5a	0,88	0,59	<35	<1,0	<0,03	127	12,8	1,4
7a	2,17	1,46	<35	<1,0	0,87	96	8,6	1

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 20-MLO

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,05	0,05	<35	3,3	63,2	<20	<2,0	<0,2
24	0,06	0,03	<35	3	59,5	<20	<2,0	<0,2
5a	0,4	0,61	<35	<1,0	0,07	121	13,2	1,35
6a	2,13	1,21	<35	<1,0	0,07	89	13,2	1,49
7a	2,32	1,35	<35	<1,0	6,5	70	9,1	0,94

Paciente 21-RLS

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	1,27	2,17	<35	6,3	100	<20	<2,0	<0,2
24	0,68	0,33	<35	6,1	100	<20	<2,0	<0,2
5a	0,83	0,47	<35	<1,0	0,03	134	12,2	1,29
6a	1,54	1,41	<35	<1,0	0,03	105	10	1,22

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

**ANEXO 2: DOSAGENS SÉRICAS HORMONAIS DE TG, Ac anti-TG e RNAm de TG DE PACIENTES
COM METÁSTASE GANGLIONAR (MG)**

Paciente 22-MVB

TEMPO	RNAm-TG _{HPRT1} (UA)	RNAm-TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	0,39	0,18	<35	2	29,6	<80,0	<2,0	<0,2
48	0,64	0,31	<35	<1,0	25,8	<80,0	<2,0	<0,2
72	0,43	0,22	<35	1	28,2	<80,0	<2,0	<0,2
1sem	0,41	0,23	<35	3	41,5	<80,0	<2,0	<0,2
1m	0,61	0,33	-	3	25,6	110	8	1,2
6m	-	-	-	-	0,07	88	8,4	1,4
5a	0,53	0,9	<35	<1,0	0,93	88	9,1	1,28

Paciente 23-CGS

TEMPO	RNAm-TG _{HPRT1} (UA)	RNAm-TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,48	0,45	35,8	<1,0	50	<80,0	<2,0	<0,2
24	0,95	1,65	37,8	<1,0	50	<80,0	<2,0	<0,2
48	2,16	1,23	34,9	<1,0	VR		VR	VR
72	1,17	0,81	56,2	<1,0	50	<80,0	<2,0	<0,2
1sem	0,46	0,47	36,7	<1,0	50	<80,0	<2,0	<0,2
1m	0,51	0,67	69,4	<1,0	1,3	180	12	1,6
4m	1,70	1,46	31,4	<1,0	-	-	-	-
6m	-	-	-	-	0,005	120	12	2
7m	1,75	0,97	84,3	<1,0	-	-	-	-
9m	-	-	-	-	0,03	135	14,6	1,4
1a	-	-	-	<1,0	0,02	140	12,5	2,4
1a6m	1,59	0,95	39,4	<1,0	65,5	38,3	1	0,2
3a	-	-	-	-	0,03	112	10,6	1,4
5a	0,62	0,65	<35	<1,0	<0,03	115	12,9	1,74
7a	2,72	1,42	<35	<1,0	1,44	-	9,9	1,27

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 24-DCM

TEMPO	RNAm-TG _{HPRT1} (UA)	RNAm-TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	1,78	2,96		54,4	100	<19,5	0,5	<0,023
48	0,57	0,67	<35	58,4	VR	<19,5	0,5	<0,023
72	0,48	0,72	<35	61,5	100	<19,5	0,5	<0,023
1sem	0,22	0,86	<35	77,7	100	<20,0	3	0,4
1m	0,22	0,86	<35	15,2	0,1	91	12,7	2,5
3m	0,33	0,80	<35	7,1	0,006	113	7,9	2,8

Paciente 25-GPG

TEMPO	RNAm-TG _{HPRT1} (UA)	RNAm-TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	0,74	0,67	<35	-	-	-	-	-
48	0,70	0,75	<35	-	-	-	-	-
72	0,44	0,47	<35	-	-	-	-	-
1m	0,46	0,61	-	6,4	0,2	110	11,6	2,1
5a	0,83	4,65	<35	<1,0	0,14	105	11,9	1,42

Paciente 26-MOF

TEMPO	RNAm-TG _{HPRT1} (UA)	RNAm-TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	-	-	-	42,7	-	-	-	-
48	1,08	0,55	21,7	44,3	-	-	-	-
72	1,43	0,49	<35	41,8	-	-	-	-
1sem	1,41	1,21	24,4	-	-	-	-	-
1m	1,47	0,74	<35	22,5	-	-	-	-
3m	9,56	6,03	<35	1,4	-	-	-	-
7m	0,35	0,02	<35	74,6	-	-	-	-
1a	1,02	0,74	<35	1,2	-	-	-	-
3a	1,67	2,26	<35	2,1	317,8	39	<1,5	0,2
4a	0,31	0,97	<35	<1,0	<0,03	139	14,9	1,7
5a	1,95	2,28	<35	<1,0	<0,03	159	16,2	1,91
6a	0,92	0,46	<35	<1,0	0,05	145	16,9	1,42

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 27-VPS

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	1,81	2,84	-	48,9	50	<20,0	<2,0	0,3
48	3,64	3,88	-	57	50	<20,0	<2,0	0,2
72	2,09	2,81	-	70,3	50	<20,0	<2,0	0,3
1sem	0,18	2,10	-	107,2	50	30	5	0,5
1m	-	-	-	-	50,5	70	9	1,2
3m	-	-	-	-	1,01	100	10,6	1,5
9m	-	-	-	-	7,37	89	7,4	0,9
1a	-	-	-	-	0,03	96	10,6	1,6
5a	1,2	2,09	<35	<1,0	0,65	111	11,6	1,29

Paciente 28-ACB

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
48	2,26	1,14	-	-	-	-	-	-
1sem	0,75	1,3	<35	-	-	-	-	-
1m	1,49	1,63	-	-	-	-	-	-

Paciente 29-ILS

TEMPO	RNA _m -TG _{HPRT1} (UA)	RNA _m -TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	-	-	-	0,6	100	54,4	11	0,14
48	-	-	-	<1,0	100	50	1,1	0,14
1sem	-	-	-	<1,0	100	61,6	3,5	0,4
1m	-	-	142	-	0,8	156	12,8	1,9
3m	-	-	-	-	0,008	199,1	16,3	2,6
6m	-	-	-	-	0,006	182	17,3	2,2
9m	-	-	-	-	0,05	200	13	2
1a	-	-	-	-	100	30,2	1,1	0,09
1a6m	-	-	-	-	0,03	151	12,7	1,8
2a	-	-	-	-	0,03	170	14,2	2
4a	0,85638811	0,535105987	<35	<1,0	0,03	137	15,3	1,42
6a	1,08	1,14	<35	<1,0	<0,03	139	11,2	1,15

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 30-JAS

TEMPO	RNA_m-TG_{HPRT1} (UA)	RNA_m-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	0,91	2,14	1098	50,5	51,7	<19,5	0,5	<0,023
48	1,89	3,30	1001,8	47,5	53,2	<19,5	0,5	<0,023
72	-	-	-	-	53,7	<19,5	0,5	<0,023
1sem	0,96	1,84	1273,4	53,2	28,5	<19,5	1,4	0,3
1m	-	-	-	-	0,2	80	7,9	1,8
3m	-	-	-	-	3,5	68,2	5	
1a6m	-	-	-	-	0,01	136	14,4	

Paciente 31-KCM

TEMPO	RNA_m-TG_{HPRT1} (UA)	RNA_m-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	3,24	1,54		4	112	37	1,6	0,2
48	2,22	1,23	38,4	5,2	108	44,6	1,6	0,3
72	-	-	-	-	110	40	1,5	0,2
1sem	1,11	0,68	27,8	<1,0	100	54,1	4,6	0,6
1m	0,89	0,79	35,8	<1,0	7,5	138	12	1,8
3m	2,34	1,21	36,7	2,1	0,7	114,8	13,2	1,8
6m	1,17	0,49	38,8	13,2	0,1	153	14,6	2,1
1a	-	-	-	-	96,1	<33,0	<1,5	0,2
1a6m	-	-	-	-	0,03	103	12,2	2
5a	-	-	-	-	-	-	-	2,44
6a	-	-	-	-	-	-	-	1,24

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 32-VON

TEMPO	RNA_m-TG_{HPRT1} (UA)	RNA_m-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	2,83	3,33	6130,2	29,6	50,9	<70,0	<2,0	<0,2
48	-	-	-	29,6	49,9	<70,0	<2,0	<0,2
72	2,46	3,04	>3000	1,5	48	70	2	0,3
1sem	2,55	2,71	>3000	<1,0	-	-	-	-
1m	1,77	1,75	>3000	2,6	31,4	94	9,1	0,7
3m	-	-	-	-	0,26	111	12,4	1,4
1a6m	-	-	-	-	1,02	64	15,5	1,7
2a	-	-	-	-	0,81	88	10,7	1,3
4a	-	-	-	-	0,1	125	13	1,7
6a	3,27	2,67	>3000	<1,0	<0,03	97	10,5	1,14
7a	2,41	2,04	2166	<1,0	<0,03	117	13	1,51

Paciente 33-EMS

TEMPO	RNA_m-TG_{HPRT1} (UA)	RNA_m-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	0,43	0,82	-	6,3	80,8	25	<2,0	<0,2
48	0,02	0,18	-	4,5	100	<20,0	<2,0	<0,2
72	0,00	0,04	-	<1,0	100	20	<2,0	<0,2
1sem	0,00	0,11	<35	1,2	93,6	38	2,4	0,2
1m	0,17	0,40	<35	4,2	0,9	13	10	1,5
6m	-	-	-	-	0,03	155	12,5	1,4
1a	-	-	-	-	0,03	148	14,2	1,4
1a6m	-	-	-	-	0,7	106	7,3	0,7
2a	-	-	-	-	2,43	121	8,8	0,8
3a	-	-	-	-	4,9	140	8,5	0,9
5a	0,709605357	0,19	<35	<1,0	52,32	103	7,6	0,59
6a	1,03	0,40	<35	<1,0	2,82	109	10,5	0,94
7a	1,28	0,83	<35	<1,0	0,05	145	10,2	0,97

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 34-GSP

TEMPO	RNAm-TG_{HPRT1} (UA)	RNAm-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	1,96	3,14	<35	2,2	100	<19,5	<0,4	-
48	0,84	1,03	<35	2,5	100	<19,5	0,9	-
72	1,04	0,83	<35	2,9	100	21,3	1,3	-
1sem	1,75	1,37	<35	9,2	98,6	35	2,4	-
1m	1,79	1,29	<35	-	0,4	163	16,7	-
3m	0,45	0,55	<35	<1,0	0,03	210	14	2,2
6m	1,51	0,86	<35	<1,0	0,03	145	12,1	1,2
9m	-	-	-	-	0,02	109,3	10,6	1,4
1a	1,05	0,70	<35	<1,0	0,77	120	11,5	1,2
1a6m	-	-	-	-	0,32	135	11,6	1,3
2a	-	-	-	-	0,03	144	13,5	1,9

Paciente 35-IFO

TEMPO	RNAm-TG_{HPRT1} (UA)	RNAm-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	0,65	0,80	<35	48,9	100	<20,0	<2,0	0,2
48	3,13	1,35	<35	39,7	100	<20,0	<2,0	0,2
72	0,90	1,04	<35	40,2	100	32,1	1	0,002
1sem	0,66	1,38	<35	42,2	100	39,8-	1,3	0,07
1m	0,56	0,69	<35	24	29,8	105,8	7,8	1,1
4m	0,25	0,38	<35	7,5	1,61	101	12,9	1,5
4a	0,31	0,63	<35	1,5	0,03	149	20,7	2,44
5a	2,19	1,47	<35	4,7	6,58	99	12,4	1,24
6a	3,42	2,12	<35	<1,0	<0,03	152	19,3	2,27

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 36-NMS.

TEMPO	RNA_m-TG_{HPRT1} (UA)	RNA_m-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	3,32	0,65	<35	14	45	50	3	0,3
48	1,03	0,59	<35	13,7	40,8	40	2,4	0,2
72			<35	13,1	39,2	40	2,1	0,2
1sem	0,23	0,68	<35	14,1	45,9	40	<2,0	0,2
1m	2,45	0,76	<35	7,1	9,5	110	8	1,2
3m	0,68	0,41	<35	13,5	-	-	-	-
1a	1,74	1,29	<35	9,0	44,6	51,3	2,5	0,3
3a	0,44	1,19	<35	15	40	<33	1,6	0,4
4a	0,00	0,00	<35	1,2	0,08	114	10,9	2,2
5a	0,11	0,03	42	1,3	0,27	106	11,1	1,54
6a	3,41	3,26	99	6,5	29,8	78	9,5	0,83
7a	3,56	2,52	161	<1,0	<0,03	154	14,7	2,63

Paciente 37-WAS

TEMPO	RNA_m-TG_{HPRT1} (UA)	RNA_m-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24			<35					
48	0,83	1,36	<35	<1,0	94,3	46,3	1,7	0,2
72	1,55	1,30	6,5	1,7	85,6	46	1,6	0,2
1sem	-	-	<35	-	-	-	-	-
1m	1,17	1,06	-	0,6	0,13	162	15,8	1,8
3m	1,26	0,67	-	28,8	0,01	130	13,3	2,3
9m	0,749747375	0,42	50,5	-	-	-	-	-
4a	0,48	1,77	<35	<1,0	0,03	148	17	1,76
5a	2,86	3,10	<35	<1,0	0,31	127	11,9	1,3
6a	2,15	1,42	<35	<1,0	0,31	125	12,6	1,44

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 38-SAS

TEMPO	RNAm-TG_{HPRT1} (UA)	RNAm-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	0,03	0,21	<35	7	42,6	30	<2,0	<0,2
48	0,11	0,46	<35	8,7	53,4	40	<2,0	<0,2
72	0,25	1,01	<35	9,3	57,5	<20	<2,0	<0,2
1sem	0,07	0,39	<35	14,1	80,3	50	5,1	0,5
1m	0,16	0,28	<35	3,2	40,1	50	4,4	0,4
3m	1,73	0,68	<35	14	11,7	102	8,6	0,8
1a	1,66	0,50	-	<1,0	0,03	146	12,8	1,5
1a6m	-	-	-	-	4,73	112	10,1	1
3a	-	-	-	<1,0	-	-	-	-
5a	0,58	0,41	<35	<1,0	<0,03	153	13,6	1,56
6a	1,17	0,21	44	<1,0	0,04	118	9,2	1,13
7a	1,67	0,92	73	<1,0	0,1	110	10,7	1,46

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

ANEXO 3: DOSAGENS SÉRICAS HORMONAIS DE TG, Ac anti-TG e RNAm de TG DE PACIENTES COM METÁSTASE À DISTÂNCIA (MD)

Paciente 39-MAS

TEMPO	RNAm-TG _{HPRT1} (UA)	RNAm-TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
basal	0,80	0,75	<35	221	11,2	180	10	0,7
24	0,11	0,24	<35	250	9,8	140	2	0,3
48	0,78	0,66	<35	210	2,9	120	2	0,2
72	1,32	1,58	<35	151	6,4	120	< 2,0	0,2

Paciente 40-BLS

TEMPO	RNAm-TG _{HPRT1} (UA)	RNAm-TG _{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	0,01	0,33	<35	1620	54,3	30	< 2,0	< 0,2
48	0,03	0,93	40,3	1487	56,7	30	< 2,0	< 0,2
72	0,09	1,97	71,9	1415	59,7	40	< 2,0	< 0,2
1sem	0,29	1,10	<35	741,1	49,8	30	3	0,3
1m	0,34	0,96	<35	190,7	1,2	100	10	1,7
3m	0,12	0,41	<35	38	0,04	78,6	10,4	2,2
6m	-	-	-	-	59	< 33	< 1,5	< 0,2
9m	-	-	-	-	63,1	33	< 1,5	< 0,2
1a	-	-	-	-	0,03	110	15	2,1
2a	-	-	-	-	52,3	34	1,5	0,3
3a	2,48	1,47	<35	22200	1,08	118	16,9	1,9

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 41-LCM

TEMPO	RNA_m-TG_{HPRT1} (UA)	RNA_m-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	0,40	0,91	<35	2,2	12,2	84,9	11,3	0,4
48	0,78	1,36	<35	13,5	84,5	82,9	4,5	0,5
72	0,42	1,01	<35	20,9	75,9	78,5	5,1	0,7
1sem	0,23	0,52	<35	54,7	72,4	104,5	5,5	0,7
1m	0,49	0,88	<35	<1,0	0,05	84,6	8,8	1,6
3m	0,65	1,23	<35	<1,0	10,5	56,6	5,6	1
6m	-	-	-	-	0,05	124	12,5	1,8
9m	-	-	-	-	0,03	88	10,7	1,5
1a	-	-	-	-	0,03	114	12,9	2
2a	-	-	-	-	0,03	128	11	1,9
3a	-	-	-	-	2,03	86	8,6	1,2
4a	0,82	0,69	<35	<1,0	6,17	109	11,5	0,9
5a	0,68	0,41	<35	<1,0	1,54	94	10,9	1,83
6a	1,08	0,75	<35	6,3	6,45	78	11,4	1,67

Paciente 42-IO

TEMPO	RNA_m-TG_{HPRT1} (UA)	RNA_m-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	0,30	1,25	1553,7	303,8	83	< 19,5	< 2,0	< 0,023
48	0,35	0,99	1820,4	299,8	78,3	< 19,5	< 2,0	< 0,023
72	-	-	1303,7	299,4	74,1	< 19,5	< 2,0	< 0,023
3m	-	-	<35	>300	0,05	111	10,9	1,1
6m	-	-	<35	>300	0,03	143	16,4	2,2
1a	-	-	<35	17380	0,03	149	18	2,6
2a	-	-	<35	2505	25,44	40	< 1,5	0,3
3a	5,04	3,96	<35	>6000	0,03	123	14,7	2,4

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 43-ALB

TEMPO	RNA_m-TG_{HPRT1} (UA)	RNA_m-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	1,94	2,99	26,8	38,4	26,2	60,9	2	0,2
48	2,16	4,01	<35	45,1	26,2	71,7	1,8	0,2
72	2,44	4,35	<35	45,7	28	62,9	1,6	0,13
2a	-	-	-	-	17,3	86	5,5	0,8
3a	-	-	-	-	3,26	78	8,5	1
4a	0,88	1,43	<35	541	51,74	<33	<1,5	<0,2
5a	0,85	0,60	<35	81,7	0,07	91	10,8	1,47
6a	1,78	1,61	<35	354	0,03	105	13,9	2,5

Paciente 44-FFC

TEMPO	RNA_m-TG_{HPRT1} (UA)	RNA_m-TG_{GAPDH} (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	0,61	1,57	<35	98,4	5,5	122		
48	1,56	2,20	118,8	<1,0	3,4	152		
72	2,14	1,52						
1sem	0,60	1,57	237,2	223,9	1,5	105,1		
1m	1,87	1,03	<35	114,2	1,99	85	10,9	1
3m	2,35	3,04	<35	7,1	0,3	106	12,2	1,9
6m					0,06	107	12	1,4
1a					0,04	108	12,4	1,5
1a6m					24,9	34	2,4	0,4
4a	1,23	2,17	<35	2,0	6,72	83	10,5	1,18
5a	2,23	2,46	<35	1,0	6,35	68	8,5	1,09

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

Paciente 45-MLF

TEMPO	RNAm-TGHPRT1 (UA)	RNAm-TGGAPDH (UA)	AC (U/mL)	TG (ng/mL)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)	T4L (ng/dL)
24	0,01	0,005	1191,1	2,8	99,6	<19	0,5	0,04
3m	-	-	-	-	0,6	90	11,6	1,5
6m	-	-	-	-	0,08	90	11,6	1,6
9m	-	-	-	-	0,05	98	13,6	2,1
1a	-	-	-	-	1,24	76	9,5	1,3
2a	-	-	-	-	1,2	97	11,9	1,8
3a	0,70	0,42	106		0,55	81	9,2	1,3
4a	0,13	0,10	359	<1,0	1,59	80	10	1,24

Valores de referência: T3 total: 20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL; > 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4 total: > 12 anos: 4,5 a 12,0 ug/dL; T4 livre: 0,7 a 1,5 ng/dL; TSH: > 20 anos: 0,4 a 4,5 uU/mL

TG: 1,7 a 35 ng/mL; Anticorpos Anti-TG: < 35 U/mL

ANEXO 4 - ANÁLISE SISTEMÁTICA

Autor	Pacientes (n°)			Controles normais (n°)	Tireoidectomia	Coleta da amostra	TSH	Método de quantificação do RNAm	gene controle interno	Ac Anti-TG	
	Total	CDT	ODT							positivo	negativo
Bergé-Lefranc <i>et al.</i> ,1985	9	9	-	-	-	-	-	HS	-	-	-
Ohta <i>et al.</i> ,1991	13	7	6	-	-	-	-	NB,SB	-	-	-
Hoang Vu <i>et al.</i> ,1992	-	-	-	-	-	-	-	NB	B-actina	-	-
Elisei <i>et al.</i> ,1994	39	22	17	12	-	-	-	HS	B-actina , calcit	-	-
Ditkoff <i>et al.</i> ,1996	100	87	6	7	P , T	A , D	S , NS	SQ	GAPDH	-	-
Arturi <i>et al.</i> ,1997	37	22	12	-	-	-	-	SQ	GAPDH	-	-
Ringel <i>et al.</i> ,1998	77	77	-	10	P , T	A , D	S , NS	SQ	Gsα , IL2	4	73
Tallini <i>et al.</i> ,1998	44	24	35	11	P , T	A , D	-	SQ	GAPDH	-	-
Ringel <i>et al.</i> ,1999	107	107	-	16	T	A , D	S , NS	Q	Gsα	15	92
Wingo <i>et al.</i> ,1999	-	-	-	32	-	-	-	Q	-	0	32
Biscolla <i>et al.</i> ,2000	34	34	-	6	T	A , D	S	SQ	B-actina	5	29
Bojunga <i>et al.</i> ,2000	235	150	85	50	T	D	S	SQ	GAPDH	-	-
Ringel <i>et al.</i> ,2001	77	77	-	10	T	D	S , NS	SQ	IL 2 , Gsα	4	73
Gubala <i>et al.</i> ,2001 (Polish)	60	60	-	-	-	D	-	SQ	GAPDH	-	-
Bellantone <i>et al.</i> ,2001	66	66	-	1	T	A , D	NS	SQ	aldolase	20	46
Fenton <i>et al.</i> ,2001	38	5	32	1	-	A , D	S , NS	Q	-	4	34
Bugalho <i>et al.</i> ,2001	10	-	10	10	T	-	S	SQ	GAPDH	0	10
Takano <i>et al.</i> ,2001	57	53	4	17	T	A , D	S , NS	Q	GAPDH	4	53
Fugazzola <i>et al.</i> ,2002	36	36	-	7	T	A , D	NS	SQ	HGPRT	0	36
Eszlinger <i>et al.</i> ,2002	112	69	43	42	T	A , D	-	Q	GAPDH, B-Actina	-	-
Savagner <i>et al.</i> ,2002	60	40	20	10	T	D	S	Q	PSA	1	59
Grammatopoulos <i>et al.</i> ,2003	28	28	6	5	P , T	D	S	SQ	B-actina	4	24
Span <i>et al.</i> ,2003	58	58	-	2	T	A , D	S , NS	Q	B-actina	9	49
Denizot <i>et al.</i> ,2003	26	26	-	11	T	D	-	Q	RNA 18S	2	24
Chinnappa <i>et al.</i> ,2004	153	75	27	51	T(n=67)	A , D	S , NS	SQ	GAPDH	14	139
Kaufmann <i>et al.</i> ,2004	20	16	4	10	-	D	S , NS	Q , SQ	GAPDH	-	-
Elisei <i>et al.</i> ,2004	80	80	-	20	T	D	S , NS	Q	-	0	80
Li <i>et al.</i> ,2004	42	42	-	20	-	-	-	SQ	B-actina	1	41
Wagner <i>et al.</i> ,2005	72	36	36	-	-	A , D	-	SQ	GAPDH	-	-
Kaczka <i>et al.</i> ,2005 (Polish)	24	24	-	-	-	-	-	Q	B-actina	-	-
Karavitaki <i>et al.</i> ,2005	95	95	-	-	-	-	S	SQ	-	-	-

CDT: Carcinoma Diferenciado de Tireoide; ODT: Outras Doenças Tireoideanas; P: parcial; T: total; A: antes da Radioiodo Terapia (RIT); D: após RIT; S: TSH suprimido; NS: TSH não suprimido; tec: tecido; sang: sangue; linf: linfonodos; HS: hibridização in situ; NB: Northern blot; SB: Slot blot; Q: quantitativo; SQ: semi-quantitativo.

continuação

Autor	Amostra		
	Tipo	Método de extração do RNA	Tubo de coleta
Bergé-Lefranc <i>et al.</i> ,1985	tec	-	-
Ohta <i>et al.</i> ,1991	tec	-	-
Hoang Vu <i>et al.</i> ,1992	tec	-	-
Elisei <i>et al.</i> ,1994	tec	Fenol clorofórmio / tiocianato de guanidina	
Ditkoff <i>et al.</i> ,1996	san , tec	Kit RNA STAT-60	RNA STAT-60
Arturi <i>et al.</i> ,1997	tec	Kit Purificação de RNAm	-
Ringel <i>et al.</i> ,1998	sang	Trizol LS	Trizol LS reagent
Tallini <i>et al.</i> ,1998	san , tec	Fenol clorofórmio / tiocianato de guanidina	heparinizado
Ringel <i>et al.</i> ,1999	sang	Trizol	trizol
Wingo <i>et al.</i> ,1999	sang	Kit <i>PUREscript</i>	EDTA
Biscolla <i>et al.</i> ,2000	sang	Trizol LS	Trizol LS reagent
Bojunga <i>et al.</i> ,2000	sang	Kit <i>Rneasy blood</i>	EDTA
Ringel <i>et al.</i> ,2001	sang	Trizol LS	trizol
Gubala <i>et al.</i> ,2001 (Polish)	tec	-	-
Bellantone <i>et al.</i> ,2001	sang	Trizol	heparina / EDTA
Fenton <i>et al.</i> ,2001	sang	Kit <i>PUREscript</i>	EDTA
Bugalho <i>et al.</i> ,2001	sang	Trizol LS / Kit <i>Rnesy blood mini</i>	-
Takano <i>et al.</i> ,2001	sang	Fenol clorofórmio / tiocianato de guanidina	heparina
Fugazzola <i>et al.</i> ,2002	sang	Kit <i>RNAzol B Tel-Test</i>	RNAzol
Eszlinger <i>et al.</i> ,2002	sang	kit <i>QIAamp RNA blood mini</i>	citrato
Savagner <i>et al.</i> ,2002	sang	Trizol	Trizol LS reagent
Grammatopoulos <i>et al.</i> ,2003	sang	Kit <i>PUREscript</i>	EDTA
Span <i>et al.</i> ,2003	sang	Kit <i>Qiagen Rneasy blood mini</i>	EDTA
Denizot <i>et al.</i> ,2003	sang	Fenol clorofórmio / tiocianato de guanidina	isocianato guanidina
Chinnappa <i>et al.</i> ,2004	sang	Trizol	EDTA
Kaufmann <i>et al.</i> ,2004	sang	kit <i>QIAamp RNA blood mini</i>	EDTA
Elisei <i>et al.</i> ,2004	sang	Kit <i>PUREscript</i>	-
Li <i>et al.</i> ,2004	sang	Kit <i>PAXgene Blood RNA</i>	PAXGENE
Wagner <i>et al.</i> ,2005	sang	Trizol LS	-
Kaczka <i>et al.</i> ,2005 (Polish)	linf	-	-
Karavitaki <i>et al.</i> ,2005	-	-	-

CDT: Carcinoma Diferenciado de Tireoide; ODT: Outras Doenças Tireoideanas; P: parcial; T: total; A: antes da Radioiodo Terapia (RIT); D: após RIT; S: TSH suprimido; NS: TSH não suprimido;

tec: tecido; sang: sangue; linf: linfonodos; HS: hibridização in situ; NB: Northern blot; SB: Slot blot; Q: quantitativo; SQ: semi-quantitativo.