

Uso combinado de calcio y pentagastrina en el diagnóstico y seguimiento del cáncer medular de tiroides

E. PUSIOL^a, M. ROQUÉ^b, H.A. PERINETTI^a y L.S. MAYORGA^b

^aInstituto de Patología de la Tiroides. ^bInstituto de Histología y Embriología (UN Cuyo-CONICET). Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina.

El cáncer medular de tiroides (CMT), en sus formas hereditaria y esporádica, es una neoplasia derivada de las células C tiroideas. Estas células se caracterizan por su capacidad para sintetizar la hormona calcitonina. La determinación de calcitonina plasmática tras estímulo combinado con calcio y pentagastrina es desde hace años un método sensible para la detección precoz del cáncer medular de tiroides. Sin embargo, desde que se demostró que mutaciones en el protooncogén *RET* son las responsables del CMT hereditario, el diagnóstico de los individuos portadores de la enfermedad se comenzó a realizar por técnicas de biología molecular. Desde 1988 hemos utilizado la prueba de estímulo combinado con calcio y pentagastrina para el diagnóstico y seguimiento del CMT. A partir de 1996 incorporamos el diagnóstico molecular en tres familias afectadas por neoplasia endocrina múltiple tipo 2A (NEM 2A). La prueba de estímulo se continuó utilizando para el seguimiento de los pacientes tratados por cirugía y para detectar el desarrollo de CMT en dos niños afectados cuyos padres demoraron la decisión de la cirugía profiláctica. Nuestros resultados demuestran que la prueba es un excelente marcador de la evolución de CMT en pacientes afectados y un método sensible para detectar CMT en sus estadios iniciales. Si bien la biología molecular es la herramienta de elección para diagnosticar el CMT hereditario e incluso para decidir sobre una tiroidectomía profiláctica, la prueba de estímulo mantiene una innegable vigencia en el seguimiento de individuos tratados por CMT hereditario y esporádico.

Palabras clave: Calcitonina. Pentagastrina. Neoplasia endocrina múltiple. Carcinoma medular de tiroides.

COMBINED PROVOCATIVE TEST WITH CALCIUM AND PENTAGASTRIN FOR CALCITONIN SECRETION IN THE DIAGNOSIS AND SURVEILLANCE OF MEDULLAR THYROID CARCINOMA

The sporadic or familial medullary thyroid carcinoma (MTC) is a neoplasia derived from the C-cells of the thyroid. These cells synthesize and secrete calcitonin. The calcium plus pentagastrin provocative test for calcitonin secretion has been used for several years for the early detection of MTC. However, since the identification of the *RET* protooncogen as the gene responsible for familial MTC, it has been possible to diagnose the affected members of the families by genetic screening. Since 1988 our laboratory has been involved in the diagnosis of members of MEN 2A families with the calcitonin secretion provocative test. In 1996, the genetic screening was incorporated, hence the provocative test was used only to monitor patients after surgery and to detect the onset of MTC in two children with mutations in the *RET* protooncogen whose parents did not accept prophylactic surgery. Our results indicate that the provocative test is a very useful tool for MTC evolution after thyroidectomy and for the early detection of C-cell neoplasia. Therefore, although the genetic test is the unquestionable method to detect familial MTC carriers, the combined provocative test with calcium and pentagastrin for calcitonin secretion is a useful tool for the detection of c cell neoplasia and follow-up of familial and sporadic MTC after surgery.

Key words: Calcitonin. Pentagastrin. Multiple endocrine neoplasia. Medullary thyroid carcinoma.

El carcinoma medular de tiroides (CMT) comprende aproximadamente del 5 al 10% de todos los cánceres tiroideos y se origina por una transformación neoplásica de las células parafoliculares tiroideas o células C. Puede presentarse en forma esporádica o hereditaria. La variante hereditaria se presenta en forma aislada (CMT familiar) o integrando asociacio-

Correspondencia: Dr. E. Pusiol.
Instituto de Patología de la Tiroides.
Don Bosco, 39. 5500 Mendoza. República Argentina.
Correo electrónico: pusiol@lanet.com.ar

Manuscrito recibido el 21-7-2000; aceptado para su publicación el 15-1-2001.

nes conocidas como neoplasias endocrinas múltiples tipo 2A (NEM 2A) y 2B (NEM 2B).

Las células C de tiroides tienen la capacidad de sintetizar y secretar en forma específica calcitonina, una hormona que cumple un papel metabólico en la homeostasis de la calcemia y cuya secreción es estimulada por diferentes sustancias, especialmente el calcio y la pentagastrina. Las células C neoplásicas del CMT conservan esta capacidad. Por tanto, esta hormona se utiliza como marcador específico de la presencia de CMT en sus formas hereditarias y esporádica. La presencia de valores basales elevados de calcitonina y, de forma mucho más sensible, el aumento de la liberación de la hormona bajo estimulación, han sido utilizados desde hace tiempo para el diagnóstico precoz de CMT¹.

Un hito importante en el diagnóstico del CMT hereditario se produjo en 1993, cuando Donis-Keller et al² y Mulligan et al³ propusieron casi simultáneamente que mutaciones en el protooncogén *RET* eran responsables del NEM 2A. Poco después se demostró que mutaciones en el *RET* estaban también presentes en el CMT familiar aislado y en el NEM 2B⁴⁻⁸. La identificación de las mutaciones responsables de la aparición de estos síndromes permite la identificación de los individuos afectados desde el mismo momento del nacimiento.

En 1988, nuestro grupo comenzó a utilizar la estimulación combinada de calcio y pentagastrina en la secreción de calcitonina para el estudio de tres familias afectadas por NEM 2A. En los primeros años se aplicó esta prueba como método diagnóstico de CMT incipiente en todos los integrantes mayores de 7 años de las familias afectadas⁹. Ya en 1996, mediante técnicas de biología molecular, se confirmó la presencia de mutaciones del protooncogén *RET* en todos los individuos afectados de CMT, y se detectaron 2 niños portadores que no habían desarrollado ninguna manifestación clínica de CMT. Asimismo, se confirmó la ausencia de mutaciones en todos los individuos estudiados que presentaban valores normales de calcitonina tras estímulo con calcio y pentagastrina¹⁰.

En este trabajo presentamos las conclusiones recogidas tras 12 años de la aplicación de la prueba de estimulación de la liberación de calcitonina con calcio y pentagastrina en el diagnóstico del CMT y en el seguimiento de los pacientes tratados.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Se practicó la prueba de estimulación combinada con calcio y pentagastrina para CT, a partir de los 7 años de edad, a un total de 24 integrantes (10 varones y 14 mujeres) de tres familias afectadas de NEM 2A incluidas en el programa de detección y seguimiento del Instituto de Patología de la Tiroides¹⁰ y a 9 individuos con sospecha clínica de NEM 2 (feocromocitoma, hipertensión o nódulo tiroideo sospechoso no resuelto por citología). Las edades de los sujetos por la prueba de estímulo tuvieron un rango de 7 a 58 años (media \pm desviación estándar [DE], 26,91 \pm 15,42 años).

Hasta el momento, se han realizado aproximadamente 150 pruebas de estimulación combinada. Antes del estudio molecular, 2 familias fueron estudiadas de forma sistemática y anualmente desde el año 1988; la tercera familia fue analizada durante sólo 2 años. Los pacientes con sospecha de CMT por causas clínicas afines a la enfermedad, no integrantes de familias afectadas, se evaluaron en una sola ocasión antes de la biología molecular. A partir de 1996, en que se obtuvieron los resultados genéticos, la prueba de estimulación sólo se aplicó en: a) niños detectados como portadores de la mutación en el protooncogén *RET* y cuyos padres demoraron la decisión de la cirugía profiláctica; b) seguimiento de pacientes portadores intervenidos, y c) individuos con sospecha clínica de CMT por causas clínicas afines a la enfermedad, como nódulos tiroideos y feocromocitomas.

Prueba de estimulación

Se utilizó la prueba de secreción de calcitonina tras estímulo combinado con calcio y pentagastrina, por presentar mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas basadas en el uso de pentagastrina y calcio por separado¹. Al paciente en ayunas y en posición de decúbito dorsal, se le coloca por vía intravenosa una mariposa unida a una llave de tres vías heparinizada. Se toma una muestra de sangre basal y a los 5 min se toma una segunda muestra basal. Inmediatamente se inyectan 2 mg/kg de peso de solución al 10% de gluconato de calcio (correspondiente a 0,93 mg/kg de calcio iónico) en un minuto. Seguidamente se administran 0,5 μ g/kg de peso de pentagastrina en 5 s. Se utilizó Peptavlon, ICI Pharmaceutical, 250 μ g/ml diluida 1/15 en solución fisiológica (concentración final: 16,7 μ g/ml). Se comienza el recuento y se toma sangre a los 1, 2, 3 y 5 min postestímulo. La sangre se recibe en tubos heparinizados en frío. Se centrifuga y se separa el plasma que se congela a -20°C hasta el procesamiento de la calcitonina.

Determinación de calcitonina

El método utilizado para la cuantificación de la calcitonina plasmática desde el año 1988 fue radioinmunoanálisis (RIA), por razones de factibilidad de obtención para su uso. Los equipos comerciales utilizados fueron: Diagnostic Product Corporation (DPC, Los Ángeles, EE.UU.) (método de RIA con separación por doble anticuerpo-PEG, precisión %CV intraensayo de 3-8 y %CV interensayo de 6-10, sensibilidad hasta 16 pg/ml), en los años 1988 y 1989; Byk-Sangtec Diagnostica, Alemania (RIA-mat[®] Calcitonin II kit, doble anticuerpo-PEG, precisión, %CV intraensayo de 5,1-8,9 y %CV interensayo de 10,6, sensibilidad hasta 7,8 pg/ml), en los años 1990 y 1991; Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, EE.UU. (método de RIA con separación por doble anticuerpo-PEG, precisión: %CV intraensayo de 6,7-8,3 y %CV interensayo de 8,3-11,6, sensibilidad entre 3 y 5 pg/ml), en 1992. Finalmente, desde 1993 y hasta el presente utilizamos el RIA ultrasensitivo para Calcitonina de Diagnostic Systems Laboratories Inc. (DSL), Texas, EE.UU. (RIA competitivo con separación por doble anticuerpo-PEG, precisión: %CV intraensayo de 5,8 a 12,3 y %CV interensayo de 5,3 a 9,8, sensibilidad hasta 3,49 pg/ml).

Los valores de referencia en sujetos normales, para el método de RIA aplicado, se obtuvo de las respuestas que presentaron los individuos libres del NEM 2A y sometidos al estudio de la prueba de estimulación (figs. 1a y b).

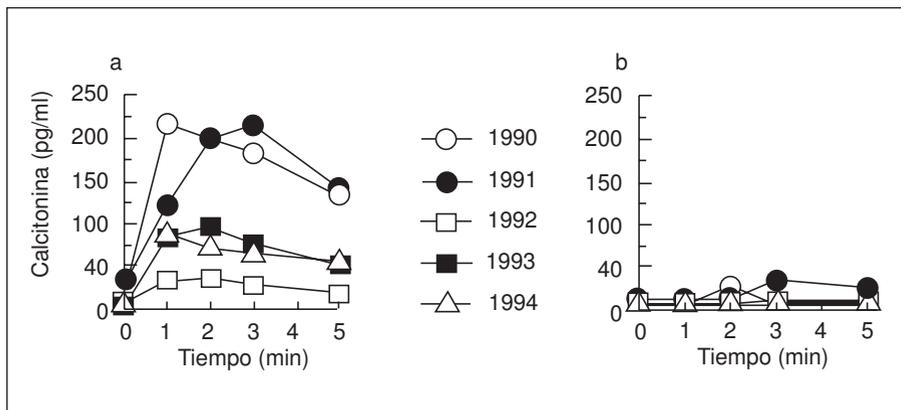
Determinación de antígeno carcinoembrionario

Las determinaciones de antígeno carcinoembrionario (CEA) fueron realizadas en muestras plasmáticas basales por métodos inmunométricos. Desde 1988 hasta 1997 por medición de una señal radioisotópica (Byk-Sangtec Diagnostica, Alemania, IRMA-coat[®] CEA, precisión: %CV intraensayo de 3,6-5,1 y %CV interensayo de 3,2-7,2, sensibilidad hasta 0,6 ng/ml) y hasta el presente por medición de una señal luminiscente (INMULITE[®] CEA, ensayo inmunométrico quimioluminiscente automatizado, precisión: %CV intraensayo de 3,6-5,7 y %CV interensayo de 5,3-6,7, sensibilidad de hasta 0,2 ng/ml). Para ambas técnicas los valores basales normales de referencia no deben superar los 4 ng/ml.

Detección de mutaciones en el protooncogén *RET*

A partir de 3 ml de sangre entera obtenida con EDTA como anticoagulante se extrajo ADN genómico de cada sujeto en estudio utilizando el método de extracción salina tras tratamiento con proteínasa K¹¹. El ADN del paciente índice de cada familia fue secuenciado en el Molecular Diagnostics Laboratory, Department of Pediatrics, Washington University School of Medicine, Missouri, EE.UU. Las mutaciones obtenidas por secuenciación directa del ADN de los pacientes índices fueron identificadas en el exón 11. En 2 familias la mutación introduce un sitio de corte para la enzima RsaI y en la tercera familia se introduce un sitio para CfoI. Conocida la mutación y las enzimas que cortan en los sitios producidos, la totalidad de los pacientes afectados de cada familia fueron identificados analizando los fragmentos generados por estas endonucleasas de restricción en el ADN amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹⁰.

Fig. 1. Respuesta a la prueba de estímulo combinado con calcio y pentagastrina en individuos no afectados de cáncer medular de tiroides (CMT). a) tipo de respuesta en un individuo no afectado de CMT y con respuesta de liberación de calcitonina dentro de los límites de sensibilidad de los métodos de RIA aplicados. Se observa un aumento de calcitonina entre el minuto 1 al 3 con una declinación de los valores hacia el minuto 5; b) tipo de respuesta en un individuo no afectado de CMT con valores de calcitonina no detectables por los métodos de RIA utilizados.



RESULTADOS

Efectos adversos de la prueba

Los pacientes no han puesto de manifiesto respuestas adversas graves a la administración de los secretagogos en las dosis calculadas. La administración intravenosa de calcio y pentagastrina puede producir sensación de sofocación, náuseas y en algunos casos molestias en la garganta, pero todo los efectos ceden rápidamente tras el primer minuto del estímulo. Se observa un ligero descenso de la presión arterial y un aumento moderado del ritmo cardíaco en el transcurso de la prueba, que generalmente se restituyen a valores iniciales dentro de los 5 min de terminado el procedimiento, y los pacientes no presentan complicaciones posteriores. Otras reacciones descritas, pero raramente observadas por nosotros, son palpitaciones y vómitos. Como ante todo agente intravenoso, no es descartable una reacción alérgica. La prueba no se realizó en pacientes con úlcera péptica conocida, embarazadas o con fiebre. No hubo diferencias en la sintomatología clínica a la prueba entre individuos con respuestas normales y en aquellos con elevación anormal de la calcitonina al estímulo.

Respuestas en individuos no afectados de cáncer medular de tiroides

Las pruebas realizadas a un total de 22 individuos sin mutaciones en el protooncogén RET obtuvieron valores basales de calcitonina menores de 50 pg/ml (media ± DE 16,86 ± 10,95 pg/ml, mediana de 28 pg/ml, percentil 10 y percentil 90 correspondientes a 12 pg/ml, respectivamente). Algunos

individuos presentaron una clara respuesta de estimulación de calcitonina; sin embargo, los valores máximos no superaron los 100 pg/ml (media ± DE 69,3 ± 26,2 pg/ml; n = 4), salvo un individuo varón (14 y 15 años de edad en el momento de las pruebas), que durante 2 años sucesivos superó este valor y llegó a 215 pg/ml de calcitonina en su máxima respuesta, para luego decaer en los siguientes años (fig. 1a). En otros, por el contrario, los valores de calcitonina no se incrementaron con el estímulo (n = 17) (fig. 1b). Los valores de CEA en todos los casos fueron menores de 4 ng/ml.

Cinética de la liberación de calcitonina

Los valores máximos de CT plasmática se registran entre 1 y 3 min después de la aplicación del estímulo. En el minuto 5 observamos un descenso de la concentración plasmática de calcitonina (fig. 1a). No hubo una diferencia significativa en la cinética de secreción entre los individuos normales no afectados por el CMT y los afectados con CMT poco desarrollado (compárese la figura 1a correspondiente a individuos normales no afectados de CMT y las 2a, 3a, 3b y 4b).

Los individuos afectados de CMT, y que presentan calcitonina basal alterada e hiperrespuesta al estímulo (mayor de 1.500 pg/ml), presentan un pico de liberación al primer minuto que se mantiene en valores muy elevados a través de los 5 min. Dado que no se realizaron diluciones de las muestras obtenidas, no se determinaron los valores exactos alcanzados ni su tendencia con el tiempo, que probablemente también coincidan con una máxima liberación de calcitonina en los minutos 1 y 3 de la prueba.

Fig. 2. Respuestas a la prueba de estímulo combinado con calcio y pentagastrina en individuos afectados de cáncer medular de tiroides (CMT) y detectados por la determinación de calcitonina; a) individuo de 12 años, calcitonina basal normal y respuesta patológica. En su primer estudio respondió al estímulo con valores de calcitonina de 540 pg/ml. Al año siguiente mantuvo calcitonina basal normal y aumentó su respuesta a 780 pg/ml; b) individuo de 23 años, con nódulo palpable y con valores de calcitonina basales elevados (media de 340 pg/ml). Respondió con una hipersecreción de calcitonina que superó los 1.500 pg/ml.

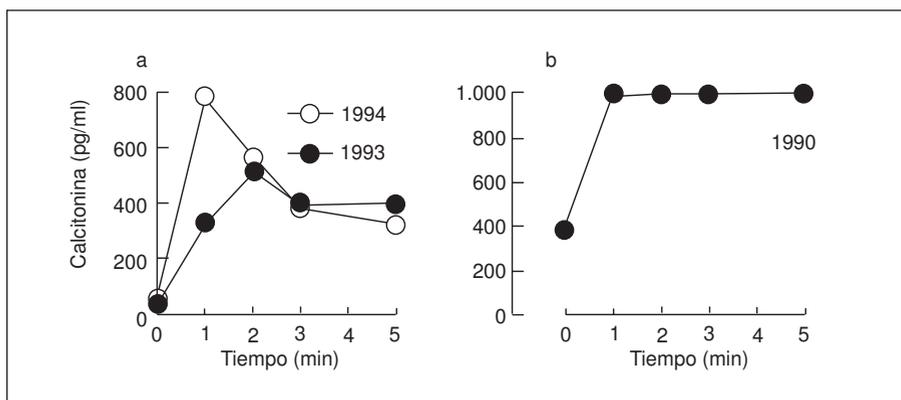
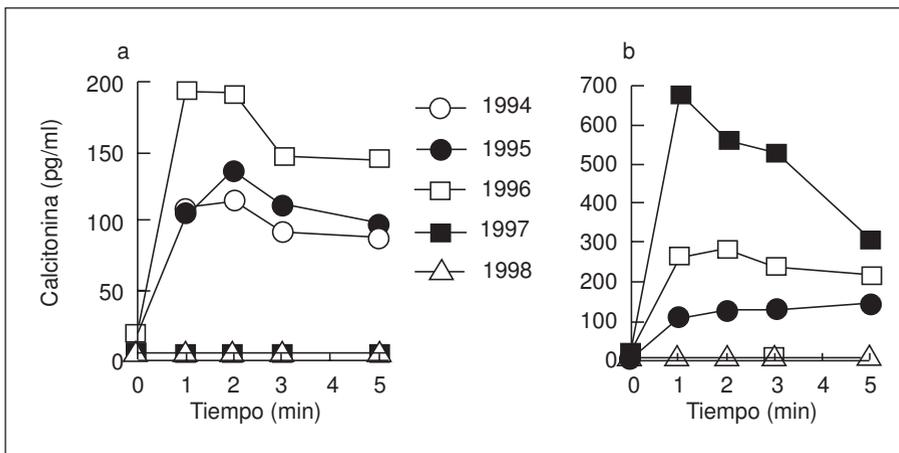


Fig. 3. Respuestas a la prueba de estímulo combinado con calcio y pentagastrina en individuos genéticamente afectados y prueba inicialmente negativa. La respuesta de calcitonina a la prueba de estimulación fue en aumento a lo largo del período de seguimiento; a) paciente tratado quirúrgicamente en 1996. b) paciente tratado quirúrgicamente en 1997.



Respuestas en individuos afectados de cáncer medular de tiroides y detectados por la determinación de calcitonina

En dos pacientes se detectó CMT por la determinación de calcitonina. El diagnóstico molecular confirmó posteriormente la presencia de mutaciones en el protooncogén *RET*. Uno de los casos presentaba una calcitonina basal normal y su respuesta máxima a los 3 min fue de 540 pg/ml. Al año siguiente mantuvo un valor basal normal y su respuesta máxima ascendió a 780 pg/ml (fig. 2a). El otro paciente partió de un valor basal elevado de calcitonina de 340 pg/ml y respondió superando los 1.500 pg/ml en su máxima respuesta (fig. 2b). Los valores de CEA en ambos casos, pre y postratamiento, fueron menores de 4 ng/ml.

Respuestas en individuos con mutación presente y prueba de calcitonina inicialmente negativa

En 2 niñas de 7 y 8 años de edad de diferentes familias se encontraron mutaciones en el protooncogén *RET*. Los padres de estos niños, a pesar de ser detectados como portadores, decidieron no efectuar la cirugía profiláctica, por lo que se las evaluó periódicamente mediante la prueba de estímulo con calcio y pentagastrina. Las pruebas fueron inicialmente normales pero las respuestas de calcitonina al estímulo pusieron de manifiesto un paulatino y significativo aumento en los 3 años de evaluación (figs. 3a y b). Esto motivó la decisión y el convencimiento de los padres de acatar la recomendación de efectuar el tratamiento quirúrgico. El análisis histopatológico de las piezas quirúrgicas postratamiento confirmó la presencia de hiperplasia de células C en un caso y de hiperplasia y un microcarcinoma en el otro. En la prueba de estimulación previa a la decisión quirúrgica se obtuvo en un caso un valor máximo de 198 pg/ml y en el caso de la otra niña el valor hallado fue de 690 pg/ml de calcitonina. Los valores de CEA en ambos casos pre y postratamiento fueron menores de 2 ng/ml. Las evaluaciones postratamiento en ambos pacientes evidenciaron respuestas de calcitonina no detectables por los métodos utilizados.

Respuestas en el seguimiento de individuos tiroidectomizados

Las respuestas que encontramos en el seguimiento de pacientes afectados y tiroidectomizados son de variada índole: a) valores de calcitonina basal y postestímulo no detectables por los métodos de RIA empleados (n = 4) (fig. 4a).

En este grupo se encuentran individuos diagnosticados por la prueba de estímulo de calcitonina, por biología molecular y por citología. Los valores de CEA en este grupo han sido siempre inferiores a 4 ng/ml. Ninguno de estos pacientes presenta manifestaciones clínicas indicativas de la enfermedad tras aproximadamente 10 años de seguimiento; b) calcitonina basal normal y respuesta discretamente elevada tras estímulo (200-300 pg/ml) y estable a lo largo del tiempo (n = 1) (fig. 4b). Esta paciente, con tumor cervical palpable, fue intervenida en otro centro de tratamiento y se le efectuó tiroidectomía total, sin vaciamiento ganglionar compartamental ni mediastinal superior. Fue derivada por su seguimiento a nuestra institución y presentó un examen clínico negativo, pero dado el resultado de la prueba de estímulo de calcitonina, se le propuso el vaciamiento ganglionar, conducta que la paciente rechazó. Hasta 1997 no presentó ninguna manifestación clínica y los resultados de CEA siempre han sido inferiores a 4 ng/ml; c) calcitonina basal normal pero respuesta patológica a la prueba de estímulo con valores superiores a 1.500 pg/ml (n = 1) (fig. 4c). Durante el seguimiento, los valores de calcitonina basal y postestímulo fueron aumentando. En el año 1999 esta paciente presentó valores basales de calcitonina de 5.500 pg/ml y una respuesta mayor de 30.000 pg/ml de calcitonina tras estímulo. En esta paciente el examen clínico (radiografía de tórax, ecografía y tomografía axial computarizada de abdomen) fue negativo. Hace 3 años de forma casual en el transcurso de una intervención quirúrgica abdominal, se detectó la presencia de siembra miliar hepática (lesiones de 2 a 3 mm). Las concentraciones del CEA siempre se han mantenido dentro de los límites de referencia. No se produjo tratamiento, dado que las lesiones no eran accesibles por cirugía y los tratamientos sistémicos no han demostrado ser efectivos hasta ahora, y d) calcitonina basal mayor de 1.500 pg/ml y respuestas mayores de 18.000 pg/ml tras estímulo en su primera evaluación posquirúrgica en el año 1989 (n = 1) (fig. 4d). La enferma presentaba recurrencia en el mediastino superior con compromiso de la pleura visceral derecha y el esternón. Se consideró la lesión inextirpable y se trató con radioterapia, y se obtuvo una respuesta parcial. Se repitió la prueba al año siguiente con resultados similares. A partir de 1991 sólo se evaluó calcitonina basal y CEA. En 1999 la calcitonina basal fue de 45.000 pg/ml. El valor del CEA al comienzo era de 16,0 ng/ml y en el año 1999 alcanzó los 92,0 ng/ml. En este caso el valor del CEA ha demostrado una progresión paralela al aumento de calcitonina.

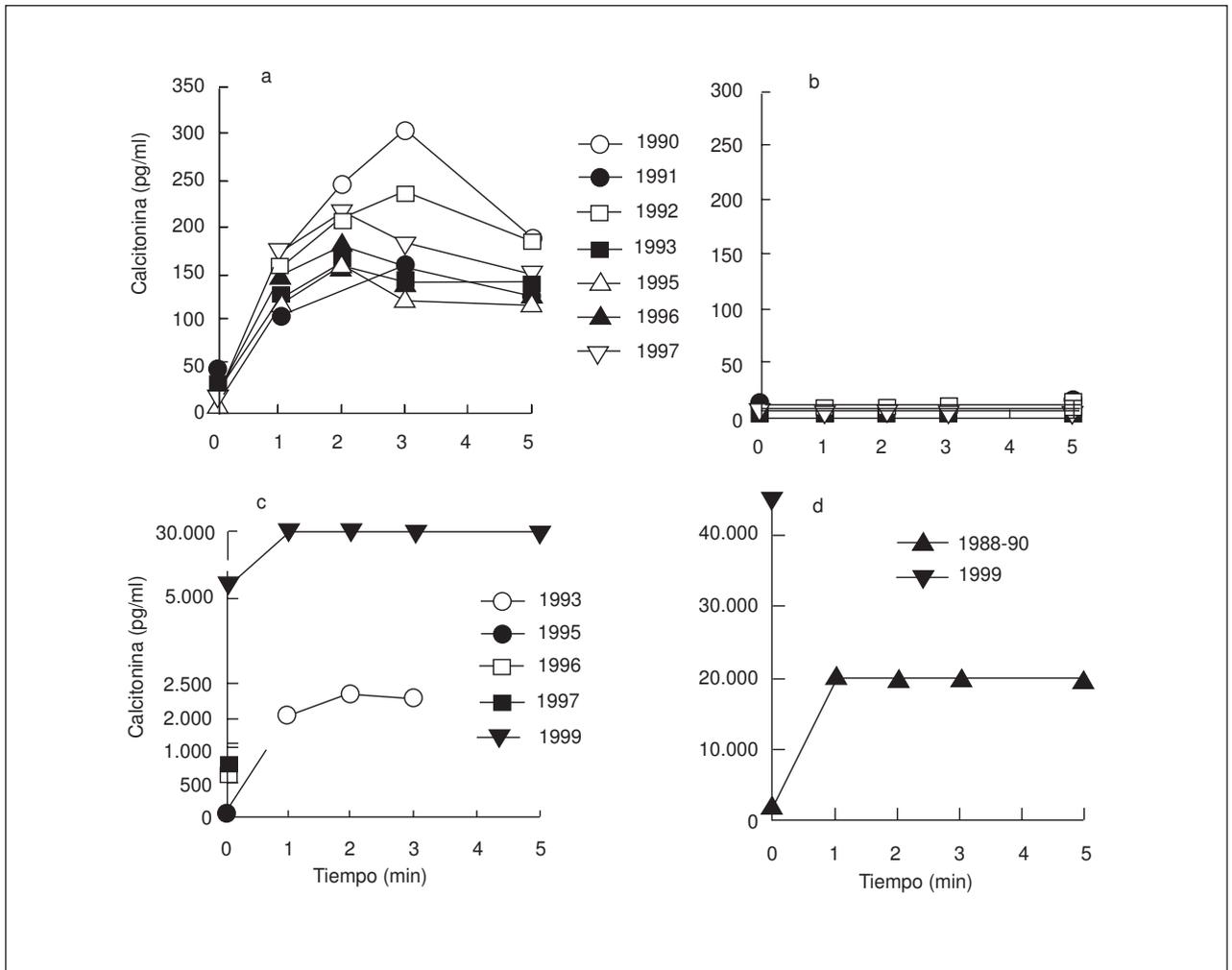


Fig. 4. Respuesta a la prueba de estímulo combinado con calcio y pentagastrina durante el seguimiento de individuos tratados quirúrgicamente; a) tipo de respuesta en un paciente con valores de calcitonina basal y postestímulo no detectables por los métodos de RIA utilizados; b) paciente con valores basales de calcitonina normales y respuestas entre 200 pg/ml y 300 pg/ml, sin aumento durante el seguimiento; c) paciente con valores basales y estimulados crecientes a través de los años; d) paciente con valores de calcitonina basales y estimulados elevados.

DISCUSIÓN

En el diagnóstico y seguimiento de todo tumor maligno la situación ideal es contar con un marcador específico que indique la presencia y el crecimiento de las células neoplásicas. Algunos de estos marcadores, como el CEA, son producidos inespecíficamente por distintas células neoplásicas y se utilizan para el seguimiento de diferentes neoplasias. Sin embargo, son más útiles los marcadores específicos de determinados tipos celulares, cuya presencia marca indefectiblemente la existencia de los mismos. Por desgracia, son pocos los tumores cuyas células secretan sustancias específicas.

Las células C o parafoliculares tiroideas poseen una elevada actividad biosintética dada por la producción de una gran variedad de péptidos hormonales y no hormonales. Algunos de ellos son específicos de estas células, como la calcitonina, kalcalcina y PAS-57, todos derivados de la pro-calcitonina, y otros son péptidos no específicos como el CEA, la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la cromogra-

nina, la somatostatina, etc.¹². La calcitonina es una hormona proteica antihipercalemiante cuya secreción es estimulada por una variedad de secretagogos, entre los que se encuentran el calcio iónico y las hormonas gástricas, fundamentalmente gastrina y glucagón. La gastrina circulante es un polipéptido de 17 aminoácidos, secretado normalmente por las células G gástricas y cuyo principio bioactivo está ubicado en la porción carboxiterminal. La pentagastrina es un derivado sintético de la gastrina formado por sus cuatro aminoácidos carboxiterminales más el aminoácido L-alanina, que estabiliza la molécula, y constituye el secretagogo más potente en uso para la liberación de calcitonina¹. Cuando un sujeto es sometido al estímulo agudo intravenoso de calcio iónico, pentagastrina o la combinación de ambos, se produce la liberación inmediata de calcitonina a la circulación desde las células C¹³.

La cirugía de elección del CMT es la tiroidectomía total acompañada de una cuidadosa disección de los ganglios linfáticos del compartimiento central del cuello, dada la elevada incidencia de micrometástasis ganglionares¹⁴. Estos pro-

cedimientos curativos resultan tanto más efectivos cuanto menor y más localizado se encuentra el tumor, por lo que resulta crucial el diagnóstico temprano de la enfermedad¹⁵. En las formas hereditarias, la primera alteración que se observa es una hiperplasia de células C que representa un estado benigno, no canceroso, que precede al desarrollo del CMT¹⁶. No obstante, también puede presentarse hiperplasia de células C en sujetos sanos en un porcentaje aproximado del 1-2%, y en otras afecciones del tiroides (enfermedad de Graves, carcinoma papilar, adenoma y carcinoma folicular) y paratiroides (hiperparatiroidismo)^{17,18}. La hiperplasia evoluciona progresivamente a microcarcinoma y posteriormente a CMT. En los estadios iniciales no se presentan síntomas clínicos que puedan indicar el desarrollo de un cáncer de tiroides, y la concentración basal de calcitonina, generalmente, no se encuentra elevada, aunque se obtienen valores aumentados de calcitonina en respuesta al estímulo agudo con calcio y pentagastrina¹⁹, estando la respuesta en relación directa con el grado de hiperplasia y la presencia de microcarcinomas²⁰.

Las pruebas de secreción de calcitonina tras estimulación han constituido durante años el método utilizado para el diagnóstico precoz del cáncer medular de tiroides, y han permitido que la probabilidad de curación se situara próxima al 100% para aquellos pacientes en los que el diagnóstico de CMT se ha efectuado a través de las pruebas de estímulo y han sido tratados en consecuencia^{21,22}. Según nuestra experiencia, la prueba no presenta complicaciones graves para el paciente, y realizada de forma estandarizada es altamente reproducible y fiable. De acuerdo con los resultados obtenidos, los valores basales normales de calcitonina medidos por RIA no superan los 50 pg/ml. En la prueba de estimulación combinada, los sujetos sanos presentan respuestas de calcitonina máximas de hasta aproximadamente 200 pg/ml. Samuel Wells et al¹, para el mismo método de cuantificación de calcitonina, RIA, considera como respuestas normales de referencia hasta 300 pg/ml de calcitonina tras la eliminación combinada de calcio y pentagastrina. En nuestra evaluación de los sujetos sometidos a la prueba, no se obtuvieron falsos positivos ni negativos. Sin embargo, otros investigadores los describen^{23,24}.

En los últimos años, la identificación en el protooncogén *RET* de las mutaciones responsables de los casos hereditarios permitió el desarrollo de métodos de biología molecular para identificar a las personas portadoras de la enfermedad que desarrollarán CMT. Experiencias en diversos laboratorios del mundo, incluyendo el nuestro, ha demostrado la eficacia de estos métodos para identificar a individuos portadores^{25,26}. En nuestra experiencia, los 2 casos en los que se realizó la tiroidectomía cuando se observaron valores en aumento en la prueba de secreción de calcitonina presentaron hiperplasia de células C y en un caso, además, un microcarcinoma de 3 mm. Ante el riesgo potencial de aparición de metástasis, se preconiza realizar una tiroidectomía profiláctica sin esperar a que se positivice la prueba de secreción de calcitonina bajo estímulo²⁷.

La prueba de estimulación de calcitonina es el método más sensible para determinar la efectividad del tratamiento quirúrgico, en cualquier tipo de CMT, y también el modo de controlar la presencia de recidivas y metástasis. Nuestros resultados ponen de manifiesto la correlación entre los valores de la prueba de estimulación en individuos tiroidectomizados y la evolución y estadio de su afección.

En conclusión, la posibilidad del diagnóstico molecular de portadores de CMT hereditario ha beneficiado enormemente a las familias afectadas, y se complementa perfectamente con la prueba de estímulo de calcitonina con calcio y pentagastrina que permite controlar de forma sensible la

aparición y proliferación de células C. La combinación de ambas es condición necesaria para un adecuado diagnóstico y seguimiento en familias afectadas de CMT familiar. Para el caso del CMT esporádico, que constituye la mayoría de los cánceres medulares, la calcitonina basal elevada es la herramienta utilizada para confirmar la citología del nódulo sospechoso, pero la prueba de estimulación de liberación de calcitonina es una herramienta fundamental en el seguimiento posterior al tratamiento quirúrgico.

AGRADECIMIENTO

Queremos expresar nuestro agradecimiento al generoso aporte de pentagastrina del Dr. Samuel A. Wells, Department of Surgery, Washington University School of Medicine. Este trabajo ha sido financiado por aportes efectuados por FUNDAVITA y por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Cuyo (CIUNC).

BIBLIOGRAFÍA

1. Wells SA Jr, Baylin SB, Linehan MW, Farrell RE, Cox EB, Cooper CW. Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. *Ann Surg* 1978; 188: 139-141.
2. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC et al. Mutations in the *RET* proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 851-856.
3. Mulligan LM, Kwok JBJ, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E et al. Germ-line mutations of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363: 458-460.
4. Hofstra RMW, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagwen T, Luo Y et al. A mutation in the *RET* proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type-2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 1994; 367: 375-376.
5. Carlson KM, Dou SS, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE et al. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the *RET* protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type-2B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1579-1583.
6. Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M et al. Functional receptor for GDNF encoded by the *c-ret* proto-oncogene. *Nature* 1996; 381: 785-788.
7. Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M et al. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996; 85: 1113-1124.
8. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro D, Dathan NA, Grieco M et al. Activation of *RET* as a dominant transforming gene by germline mutations of *MEN 2A* and *MEN 2B*. *Science* 1995; 267: 381-383.
9. Perinetti HA, Pusiol E, Borremans GC, Mayorga LS. Carcinoma medular de tiroides en *MEN 2A*: diagnóstico y seguimiento por dosaje de secreción de calcitonina bajo estimulación combinada con calcio y pentagastrina. *Pren Med Argent* 1995; 82: 897-903.
10. Roqué M, Pusiol E, Perinetti HA, Mayorga LS. Diagnóstico del *MEN 2A* mediante detección de mutaciones puntuales en el protooncogén *RET*. *Endocrinología* 1997; 44: 291-295.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215-1220.
12. Leshin M. Multiple endocrine neoplasia. En: Wilson JD, Foster DW, editores. *Williams Textbook of Endocrinology*. Filadelfia: W.B. Saunders, 1985; 1274-1289.
13. Rude RK, Singre FR. Comparison of serum calcitonin levels after a one-minute calcium injection and after pentagastrin injection in the diagnosis of medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 44: 980-983.
14. Block MA. Surgical treatment of medullary carcinoma of the thyroid. *Otolaryngol Clin North Am* 1990; 23: 453-473.
15. Gimm O, Dralle H. C-cell cancer-prevention and treatment. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384: 16-23.
16. Niccoli-Sire P, Murat A, Baudin E, Henry JF, Proye C, Bigorgne JC et al. Early or prophylactic thyroidectomy in *MEN 2/FMTC* gene carriers: results in 71 thyroidectomized patients. The French Calcitonin Tumours Study Group (GE TC). *Eur J Endocrinol* 1999; 141: 468-474.
17. Scheuba C, Kaserer K, Kotzmann H, Bieglmayer C, Niederle B, Vierhapper H. Prevalence of C-cell Hyperplasia in patients with normal basal and pentagastrin-stimulated calcitonin. *Thyroid* 2000; 10: 413-416.
18. Niccoli P, Conte-Devolx B, Lejeune PJ, Carayon P, Henry JF, Roux F et al. Hipercalcitoninemia in conditions other than medullary cancers of the thyroid. *Ann Endocrinol* 1996; 57: 15-21.
19. Wion-Barbot N, Schuffenecker I, Nicoli P, Conte-Devolx B, Lecomte P, Houdet C et al. Results of the calcitonin stimulation test in normal volunteers compared with genetically unaffected members of *MEN 2A* and familial medullary thyroid carcinoma families. *Ann Endocrinol* 1997; 58: 302-308.

20. Cohen R, Campos J-M, Salatin C, Heshmati MH, Kraimps J-L, Proye Ch et al. Preoperative calcitonin levels are predictive of tumor size and postoperative calcitonin normalization in medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 919-922.
21. Gagle RF, Tashjian AHJ, Cummings T, Papathanasopoulos N, Reichlin S. Impact of prospective screening for multiple endocrine neoplasia type 2. *Henry Ford Hosp Med J* 1987; 35: 94-98.
22. Vasen HFA, Nieuwenhuijzen Kruseman AC, Moers AMJ, Lips CJM, Beukers EKM, Wiersinga WM et al. MEN 2 syndrome: the value of screening and central registration; a study of six kindreds in The Netherlands. *Henry Food Hosp Med* 1987; 35: 101-103.
23. Hernández C, Simó R, Oriola J, Mesa J. False-positive results of basal and pentagastrin-stimulated calcitonin in non-gene carriers of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Thyroid* 1997; 7: 51-54.
24. Decker RA, Peacock ML, Borst MJ, Sweet JD, Thompson NW. Progress in genetic screening of multiple endocrine neoplasia type 2A: is calcitonin testing obsolete? *Surgery* 1995; 118: 257-263.
25. Iler MA, King DR, Ginn-Pease ME, O'Dorisio TM, Sotos JF. Multiple endocrine neoplasia type 2A: a 25-year review. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 92-96; discussion 96-97.
26. Hotz HG, Runkel NS, Frank-Raue K, Raue F, Buhr HJ. Prophylactic thyroidectomy in MEN IIA: does the calcitonin level correlate with tumor spread? *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383: 170-173.
27. Wells SA, Jr, Skinner MA. Prophylactic thyroidectomy based on direct genetic testing in patients at risk for the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Exp Clin Endocrinol Diab etes* 1998; 106: 29-34.