

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS MÉDICAS
CURSO DE MEDICINA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**TIREOGLOBULINA NO LAVADO DE PUNÇÃO DE LINFONODOS: QUAL O
SEU LUGAR NO SEGUIMENTO DO CARCINOMA DIFERENCIADO DE
TIREOIDE?**

Aline Lemos Barros Martins

Campina Grande, 14 de outubro de 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS MÉDICAS
CURSO DE MEDICINA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**TIREOGLOBULINA NO LAVADO DE PUNÇÃO DE
LINFONODOS: QUAL O SEU LUGAR NO SEGUIMENTO DO
CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREOIDE?**

Aline Lemos Barros Martins

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos necessários para conclusão do curso de medicina da Universidade Federal de Campina Grande, sob orientação da professora Dra. Maria Roseneide dos Santos Torres.

Campina Grande, 14 de outubro de 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL HUAC - UFCG

M379t

Martins, Aline Lemos Barros

Tireoglobulina no lavado de punção de linfonodos: qual o seu lugar no seguimento do carcinoma diferenciado de tireoide? / Aline Lemos Barros Martins. – Campina Grande, 2013.

102 f.: il.

Monografia (Graduação em Medicina) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências Médicas, Curso de Medicina, Campina Grande, 2013.

Orientação: Prof.^a Dra. Maria Roseneide dos Santos Torres.

Contém a versão em Inglês de artigo publicado em periódico.

1. Endocrinologia. 2. Tireoglobulina. 3. Câncer de tireoide.
I. Torres, Maria Roseneide dos Santos. II. Título.

CDU 616.441:616-006.6

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS MÉDICAS
CURSO DE MEDICINA**

**MARIA ROSENEIDE DOS SANTOS TORRES
DOUTORA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos necessários para conclusão do curso de medicina da Universidade Federal de Campina Grande, sob orientação da professora Dra. Maria Roseneide dos Santos Torres.

Campina Grande, 14 de outubro 2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ALCIDES CARNEIRO
COORDENAÇÃO DO INTERNATO

v

Ata da Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)

Às 08:00 horas do dia 14 / 10 / 13, nas dependências do Hospital Universitário Alcides Carneiro, da Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, realizou-se a defesa do TCC intitulado Tixoglutulina no cuidado de pacientes de linfomas: qual é seu lugar no tratamento do carcinoma diferenciado da tireoide de autoria do(s) aluno(s) de Medicina Alvine Lemos Gomes Martins,

_____, sendo orientados por Dra. Maria Renilde dos Santos Torres e _____.

Estiveram presentes, além dos discentes os componentes da Banca Examinadora Prof. Alberto José Santos Ramos, Prof. Vladimir Gomes de Oliveira

Iniciados os trabalhos, o Presidente da Banca Examinadora, Professor(a) Vladimir Gomes de Oliveira, passou a palavra ao apresentador do trabalho Alvine Lemos Gomes Martins, que teve 30 minutos para apresentá-lo. A apresentação durou 30 minutos, após a qual foi iniciada a discussão e arguição pela Banca Examinadora. A seguir, os discentes retiraram-se da sala para que fosse atribuída a nota. Como resultado, a Banca resolveu aprovar o trabalho, conferindo a nota final de 10,0. Não havendo mais nada a tratar, deu-se por encerrada a sessão e lavrada a presente ata que vai assinada por quem de direito. Campina Grande, 14 / outubro / 2013.

Maria Renilde S. Torres
Alberto José Santos Ramos
Vladimir Gomes de Oliveira

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com muito carinho aos meus pais, Wilame e Auxiliadora, que sempre me incentivaram para a realização dos meus ideais, encorajando-me a enfrentar todos os momentos da vida com fé, amor, paciência e determinação. Todas as minhas conquistas também são méritos de vocês. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o sopro do Seu espírito em mim trouxe inspiração e me deu sustento e coragem para seguir em frente.

À minha família, por acreditar em mim sempre e confiar, mais do que eu mesma, em minhas capacidades para ir além das expectativas. Mainha, sua força e dedicação foram, em muitos momentos, minha motivação para continuar e seus cuidados, o repouso do meu cansaço. Painho, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada. Amanda, minha irmã, você será sempre meu maior exemplo, inspiração dos meus passos.

Ao meu avô, Manoel Lemos. Obrigada por dar-me este grande exemplo de honestidade, caráter, hombridade e valor.

À Diego, com quem amo partilhar a vida. Você riu meu riso, chorou minhas lágrimas e faz parte de todas as minhas conquistas. Obrigada pelo apoio, pela compreensão, pelo carinho e por sua capacidade de me trazer paz em meio à correria.

À professora Dra. Maria Roseneide dos Santos Torres, minha orientadora, que colaborou de forma fundamental nesse trabalho e imbuíu em mim o interesse pela produção científica. Obrigada pela confiança e paciência, seus conhecimentos e incentivo foram os alicerces para construção desse trabalho.

Aos amigos da faculdade. Compartilhamos seis anos de nossas vidas com muito estudo, risadas e brincadeiras. Obrigada por todos os momentos que estivemos juntos, vocês tornaram o caminho mais fácil de ser percorrido.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

TÍTULO	1
AUTORES.....	1
TÍTULO ABREVIADO.....	2
PALAVRAS-CHAVE.....	2
RESUMO	3
INTRODUÇÃO	4
REVISÃO	7
Fatores que podem afetar a acurácia dos ensaios de Tg	11
Enxágue da agulha	14
Líquido de enxágue da agulha.....	14
Volume do líquido de enxágue	16
Coleta das amostras	17
Interferência pela tireoglobulina circulante	18
Interferência pelos anticorpos anti-tireoglobulina (TgAc)	20
Pontos de corte da dosagem de tireoglobulina no lavado da punção aspirativa por agulha fina	22
SÍNTESE.....	32
CONCLUSÃO	33
DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES.....	34
AUTOR CORRESPONDENTE	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO	47
Comunicado de aceitação do artigo pela revista <i>Thyroid - Decision</i> <i>Letter</i>	47
APÊNDICE.....	48
Versão para publicação do artigo - <i>Thyroglobulin in the washout fluid of lymph node biopsy: what is its role in the follow-up of differentiated thyroid carcinoma?</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Revisão dos diferentes métodos de dosagem de Tg pela punção aspirativa por agulha fina.	14
Tabela 2 - Desempenho diagnóstico da PAAF-Tg e da PAAF-C e pontos de corte da PAAF-Tg.	23

Título: Tireoglobulina no lavado de punção de linfonodos: qual o seu lugar no seguimento do carcinoma diferenciado de tireoide?

Maria Roseneide dos Santos Torres^I; Sebastião Horácio Nóbrega Neto^{II}; Rosalina Jenner Rosas^{III}; Aline Lemos Barros Martins^{IV}; André Luis Correia Ramos^V; Thomaz Rodrigues Porto da Cruz^{VI}.

I. Médica. Mestrado em Medicina e Saúde pela Universidade Federal de Campina Grande. Doutorado em Medicina e Saúde pela Universidade Federal da Bahia e Universidade Federal de Campina Grande. Departamento de Endocrinologia e Diabetes, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Brasil; rosetorres.maria@gmail.com. Telefone: (55) 83 88405391.

II. Médico. Radiologista. Campina Grande, Brasil; horacionobrega@hotmail.com. Telefone: (55) 83 99711965.

III. Médica. Patologista. Mestrado em Medicina e Saúde pela Universidade Federal da Bahia. Professora na Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Brasil; rosalina.rosas@hotmail.com. Telefone: (55) 83 33210404.

IV. Graduanda da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Brasil; alinelbm@live.com. Telefone: (55) 083 99939930.

V. Bioquímico. Mestrado em Saúde Pública pela Universidade Estadual da Paraíba. Professor substituto na Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil; andrelcramoscg@gmail.com. Telefone: (55) 83 88405100.

VI. Médico. Doutorado em Medicina e Saúde pela Universidade Federal da Bahia. Professor Adjunto da Universidade Federal da Bahia, Brasil; thomazcruz@lablenc.com.br. Telephone number: (55) 71 99855408.

Título abreviado: Papel da PAAF-Tg no seguimento do CDT.

Palavras-chave: tireoglobulina; câncer de tireóide-geral; câncer de tireóide-clínica, doenças da tireóide, endocrinologia-adulto.

RESUMO

Contexto: A investigação clínica de linfonodos locais aumentados de tamanho no início ou durante o acompanhamento do carcinoma diferenciado de tireoide (CDT) é uma tarefa difícil. Apesar de o exame citológico do material obtido por punção aspirativa por agulha fina de linfonodos (PAAF-C) ser extremamente específico para o diagnóstico de metástases linfonodais, sua sensibilidade é baixa, especialmente em função das amostras paucicelulares.

Síntese: Muitos estudos têm demonstrado que a determinação da tireoglobulina (Tg) no lavado da agulha utilizada na punção (PAAF-Tg) aumenta o desempenho diagnóstico da citologia para até 100% de sensibilidade e especificidade, no entanto essa técnica é atualmente limitada pela falta de padronização na sua metodologia, inexistência de um ponto de corte definido e pelas várias controvérsias que ainda persistem acerca de sua acurácia diante de pacientes não tireoidectomizados, com Tg sérica elevada ou anticorpos anti-Tg circulantes.

Conclusão: A PAAF-Tg aumenta o desempenho da PAAF-C na determinação de metástases linfonodais, inclusive quando esta não consegue diagnosticá-las e por isso deve ser parte do seguimento do CDT.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, um aumento relevante na incidência de câncer de tireoide tem sido documentado em todo o mundo (1-5). Estima-se que 60.220 novos casos de câncer de tireoide devam ser diagnosticados em 2013 nos Estados Unidos da América (USA), com três em cada quatro casos ocorrendo em mulheres (6). A taxa de incidência de câncer de tireoide vem aumentando drasticamente desde meados dos anos 1990, e este é o câncer que tem crescido mais rapidamente entre homens e mulheres (6), devido principalmente ao histotipo papilífero (1-3, 7).

Até 30% dos pacientes com carcinoma papilífero de tireoide (CPT) tem persistência ou recorrência da doença em linfonodos (LNs) cervicais (8,9). Dados de centros onde biópsia de linfonodo sentinela ou dissecação de linfonodos centrais são praticadas de rotina mostram que metástases ocultas podem ser observadas em até 90% dos pacientes (10,11,12).

A investigação clínica de linfonodos locais aumentados de tamanho no início ou durante o seguimento do carcinoma diferenciado de tireoide (CDT) é uma tarefa difícil, uma vez que linfadenopatias inflamatórias são extremamente frequentes e metástases de linfonodos cervicais advindas de cânceres não tireoidianos são achados relativamente comuns (13).

Assim, para facilitar a correta identificação de linfonodos metastáticos antes ou após a cirurgia primária muitas ferramentas têm sido propostas. O acompanhamento do CDT após tireoidectomia e ablação com radioiodo é baseado na dosagem de tireoglobulina sérica basal e estimulada por tireotrofina (TSH), na pesquisa de corpo inteiro com iodo radioativo (PCI), na ultrassonografia (US) cervical (13) e na punção aspirativa por agulha fina

(PAAF) com análise citológica dos LNs. Adicionalmente, o estadiamento de LNs cervicais é mandatório no manejo do câncer de tireoide antes da tireoidectomia para submeter pacientes com CDT metastático a cirurgias mais radicais. Este estadiamento é realizado por meio de US cervical e no caso de suspeição, a natureza metastática do LN é confirmada com a avaliação citológica do aspirado da PAAF (14).

Apesar de a especificidade da tireoglobulina sérica (sTg) para diagnosticar recorrências ser elevada, este método não é ideal para a detecção de metástases de LNs pequenos. Além disso, a sTg não localiza os focos neoplásicos e é seriamente afetada pela presença de anticorpos anti-tireoglobulina (TgAc) séricos, identificados em 25–30% dos pacientes com CDT (15, 16). Os resultados da PCI, por sua vez, podem ser afetados pelo tamanho do tumor, pela dose de iodo radioativo e pela capacidade de captação de radiotraçadores. Metástases linfonodais, por exemplo, podem não captar iodo em 20–40% dos casos, mesmo quando altas doses de ^{131}I são aplicadas (17, 18).

A US tem um papel cada vez mais importante no seguimento de pacientes com CPT após a terapia inicial (19). A sensibilidade da US em detectar massas ocultas e LNs cervicais não palpáveis está bem documentada. No entanto, apesar do estabelecimento de critérios preditivos de malignidade, esses não são precisos o suficiente para distinção entre LNs benignos (inflamatórios ou reacionais) e metastáticos ou suspeitos, mesmo quando agrupados (20) e, além disso, requerem um operador experiente e qualificado para sua identificação.

A avaliação citológica das amostras de LNs obtidas por PAAF (PAAF-C) tem sido amplamente utilizada para confirmar achados ultrassonográficos suspeitos, principalmente nos pacientes com sTg indetectável em vigência de TSH suprimido e naqueles com metástases não captantes de iodo (19). Todavia, a sensibilidade deste método está longe de ser ideal, uma vez que varia de 75% a 85% (21, 22), com uma taxa de resultados falso negativos de 6% a 8% (21, 23) e até 20% de amostras não representativas ou com celularidade inadequada, a dependendo da experiência e habilidade do citopatologista (24, 25).

Para melhorar o rendimento diagnóstico da PAAF-C, vários autores têm sugerido a dosagem da Tg no lavado da agulha utilizada na PAAF (FNAB-Tg). Este método foi proposto inicialmente em 1992 por Pacini e colaboradores (21), que demonstraram que níveis elevados de PAAF-Tg em LNs de indivíduos submetidos à tireoidectomia e a radioablação eram decorrentes de metástases de carcinoma de tireoide, enquanto que valores indetectáveis indicavam linfadenopatia inflamatória ou de origem não tireoidiana. Nesse estudo, a sensibilidade da PAAF-Tg foi de 100%, enquanto que a sensibilidade da citologia foi de apenas 85,7%. Em 1993, Lee et al. (26) relataram que a combinação da PAAF-C com a PAAF-Tg permitiu a detecção de LNs metastáticos em maior número que cada técnica individualmente, alcançando sensibilidade e especificidade de 100%.

Desde então, vários outros autores têm realizado a PAAF-Tg, encontrando sensibilidades que variaram de 81,4% a 100% e especificidades de 85% a 100% (13, 21, 22, 27-39). Apesar desses resultados, algumas controvérsias persistem sobre certas questões, incluindo a escassez de

estudos para validar o benefício da PAAF-Tg sobre a PAAF-C isolada e a variação dos valores de pontos de corte de 0,9 a 39 ng/mL, dependendo do método utilizado para a dosagem de Tg (22, 28-30), além de divergências relacionadas ao desempenho diagnóstico do teste em pacientes que ainda não se submeteram à tireoidectomia. Somado a isto, a metodologia da PAAF-Tg ainda não foi padronizada, o que faz com que todos os estudos publicados sobre o tema apresentem diferenças significativas nas técnicas utilizadas para lavar a agulha e para dosar a Tg, bem como nas unidades usadas (ng/PAAF, ng/mL) para expressar os resultados da PAAF-Tg e na interpretação dos valores deste teste diagnóstico. Como consequência, o lugar exato da PAAF-Tg no acompanhamento de pacientes com CDT ainda é motivo de debate.

Assim, os objetivos deste artigo são resumir as evidências publicadas na literatura sobre o uso da FNAB-Tg no seguimento de indivíduos com CDT e discutir os seguintes tópicos: 1) a acurácia da PAAF-Tg na detecção de metástases cervicais em indivíduos submetidos à tireoidectomia total ou aguardando cirurgia da tireoide; 2) o benefício diagnóstico da PAAF-Tg quando comparada ao emprego da PAAF-C isolada para detecção de recorrências de CDT em LNs cervicais; 3) os métodos a partir dos quais foram definidos os vários pontos de corte relatados na literatura para a PAAF-Tg, incluindo uma comparação de suas performances diagnósticas para detecção de malignidades e 4) as diferenças entre as técnicas usadas para realizar a PAAF-Tg, incluindo uma avaliação de possíveis influências de variações técnicas sobre a acurácia diagnóstica do método.

REVISÃO

O Consenso Europeu para o manejo de pacientes com carcinoma diferenciado de tireóide recomenda um rastreio entre 6 e 12 meses após o tratamento inicial, com US cervical e dosagem de Tg sérica sob estimulação com TSH recombinante (14).

A seleção dos pacientes que devem ser submetidos à PAAF deve ser feita com base na arquitetura ecográfica do LN investigada pela US. Os indicadores mais confiáveis de malignidade são hiperecogenicidade heterogênea consistente com microcalcificações, perda do hilo, alterações císticas e vascularização periférica (40). Todos esses achados ultrassonográficos apresentam forte correlação com achados de malignidade em análises histológicas pós-operatórias (19).

Alguns autores (14, 40, 41) sugerem recorrer à PAAF apenas quando o eixo mais curto do linfonodo exceder 5 mm de comprimento, uma vez que esse critério está associado com um bom equilíbrio entre a sensibilidade e a especificidade da citologia isolada para a detecção de CPT metastático (61% e 96%, respectivamente) (19).

Desde que Pacini et al. (21), há cerca de 20 anos, relataram que altas concentrações de Tg são detectáveis em LN metastáticos de carcinoma de tireoide, uma série de estudos mostraram que a sensibilidade da PAAF-Tg para detectar metástases de LN cervicais de CDT é maior que a sensibilidade da PAAF-C (13, 21,22,27-39). Frasoldati et al. (22), avaliando o papel da PAAF-Tg na detecção de metástases linfonodais em pacientes com CDT antes da tireoidectomia, encontraram uma sensibilidade e especificidade de 78,6% e 100%, respectivamente. Além disso, a sensibilidade da combinação entre PAAF-C e PAAF-Tg para avaliar LNs cervicais mostrou-se maior que a

sensibilidade da PCI e da sTg. Em um estudo posterior com pacientes com recorrência cervical de CDT, o mesmo grupo demonstrou que a sensibilidade aumentou de 84,8% para 95,6% quando a PAAF-Tg foi adicionada à citologia (42).

Em 2003, Cignarelli et al. (27) demonstraram que a PAAF-Tg também pode contribuir para o diagnóstico de amostras paucicelulares obtidas de metástases císticas, ao relatar que o diagnóstico de dois dos seis casos de LNs cervicais com metástase cística de CPT que participaram do seu estudo foram estabelecidos pela PAAF-Tg mas não pela citologia sozinha.

Bournaud et al. (36), avaliaram 114 pacientes consecutivos com câncer de tireoide e 16 indivíduos controles. A sensibilidade da PAAF-Tg foi de 94,2% e sua especificidade de 97,8%. A PAAF-C, por sua vez, apesar de ter apresentado 100% de especificidade, mostrou sensibilidade de 71%, devido, principalmente, à existência de amostras inadequadas.

Salmaslıhoğlu et al. (35), compararam os diagnósticos histológicos finais de 255 LNs com os resultados da PAAF-C e da PAAF-Tg pré-operatórias. A PAAF-C falhou em detectar 17% dos LNs metastáticos, enquanto apenas 1% deles não foi detectado pela PAAF-Tg. A especificidade, a acurácia, o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) da PAAF-Tg foram significativamente maiores quando comparados à PAAF-C.

A degeneração cística dos depósitos metastáticos do CPT não é incomum (43, 44) e nesses casos a PAAF do LN, mesmo com orientação ultrassonográfica, pode mostrar apenas material colóide, restos celulares e macrófagos, sem quaisquer células tumorais identificáveis. Essas amostras são geralmente classificadas como “não diagnósticas” ou “insatisfatórias para

avaliação” (45-47). A PAAF-Tg, por sua vez, tem mostrado uma grande sensibilidade na detecção de metástases císticas quando a citologia não é conclusiva. Cunha et al. (30), por exemplo, analisaram 83 LNs cervicais aumentados de tamanho de 67 pacientes com CDT e encontraram que a sensibilidade da PAAF-Tg foi de 100%, enquanto a citologia isolada não conseguiu diagnosticar 9 dos 17 pacientes com recorrências. Se apenas a PAAF-C tivesse sido considerada, somente um de seis linfonodos metastáticos com componente cístico teria sido diagnosticado (sensibilidade de 16,7%).

Urano et al. (31) estudaram 129 linfonodos aumentados de 111 pacientes com CDT e que as sensibilidades da PAAF-Tg e da citologia foram de 81,4 e 78%, respectivamente, e que a sensibilidade da PAAF-Tg na detecção de metástases císticas ou mistas de CPT foi de 100%. No total, 36,4% dos casos considerados benignos e 37,5% dos casos julgados como inadequados pela citologia foram positivos pela PAAF-Tg.

Snozek et al. (28) avaliaram 122 amostras de PAAF de 88 pacientes com história de CDT e tireoidectomia. Eles encontraram que os níveis de Tg foram menor ou igual a 1 ng/mL em 50 de 52 amostras benignas (96,2%) e maiores que 1 ng/mL em todas as 70 amostras malignas. Cinco (4,9%), de 103 amostras com diagnóstico citológico, tiveram resultados de PAAF-Tg discordantes, sendo que em quatro destas, a PAAF-Tg foi concordante com o diagnóstico final. Como 18 dos 19 casos (94,7%) classificados como não diagnósticos pela citologia ou sem avaliações citológicas foram corretamente diagnosticados pela PAAF-Tg, os autores sugeriram a substituição da PAAF-C pela PAAF-Tg para avaliação de metástases em LNs cervicais.

O Consenso Europeu a respeito do manejo de pacientes com CDT (14) e o Consenso Brasileiro de Nódulos de Tireoide e Câncer Diferenciado de Tireoide (48) atualmente recomendam combinar a PAAF-Tg com avaliação citológica das amostras da PAAF para confirmar suspeitas de metástases linfonodais. Em contrapartida, a Associação Americana de Tireoide (44) por sua vez, não cita o método em suas diretrizes devido, provavelmente, à menor experiência dos tireoidologistas dos EUA com a PAAF-Tg. Os dados disponíveis sobre o valor diagnóstico da PAAF-Tg têm sido obtidos com diferentes tipos de ensaio de Tg, vários volumes de líquido de lavagem e diferentes pontos de corte para definir resultados negativos (19). A falta de consenso sobre a recomendação da PAAF-Tg entre as diversas diretrizes mundiais para manejo do CDT é explicada, possivelmente, pela carência de um padrão internacional de execução e interpretação da técnica.

Fatores que podem afetar a acurácia dos ensaios de Tg

A dosagem da Tg é um dos maiores desafios laboratoriais, em função de interferências que podem alterar o resultado do exame, falta de padronização metodológica, sensibilidade funcional inadequada, além da variabilidade nas especificidades dos anticorpos utilizados pelos kits comerciais disponíveis. Todos esses fatores comprometem a acurácia do método e proporcionam uma grande variabilidade interensaio, o que torna a comparação entre os estudos difícil.

Os métodos disponíveis para dosagem de Tg incluem os imunoenaios, como o ensaio imunométrico (IMA) e o radioensaio (RIE), além do ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), que é pouco usado. Os antigos métodos de dosagem por competição que utilizam traçadores radioativos têm

sido progressivamente substituídos pelos IMA, mais específicos e sensíveis, que incluem os ensaios imunorradiométricos (IRMA) e os de imunoquimioluminescência (ICMA) (47). A metodologia dos IMA permite a detecção de concentrações de Tg inferiores a 0,1 ng/mL e suas vantagens técnicas incluem menor tempo de incubação e anticorpos reagentes mais estáveis (50).

Historicamente, tem sido relatada uma grande variabilidade interensaios nos métodos de dosagem de Tg (51). A precisão entre ensaios deve ser sempre a maior possível, para que a interpretação dos resultados não seja comprometida por mudanças nos reagentes utilizados ou na calibração dos aparelhos ao longo do acompanhamento de um paciente (51).

Coefficientes de variação interensaio de 48%, para valores de sTg de cerca de 5,0 ng/mL, a 80-120% para valores indetectáveis de Tg, têm sido descritos (52). Estas discrepâncias são parcialmente explicadas pela heterogeneidade da Tg humana e pelas diferenças nas especificidades por epítomos dos anticorpos reagentes utilizados nos diversos imunoenaios (53). Em particular, os carcinomas da tireoide secretam uma isoforma predominante ou várias isoformas de Tg que podem ser detectadas com intensidades diferentes dependendo dos anticorpos e do método de ensaio utilizados (54).

Diferentes diretrizes e consensos propõem a utilização de kits que adotaram o padrão Europeu de fabricação de ensaios de Tg, o CRM 457 (55, 56), que propõe a utilização de Tg purificada obtida de tireoide humana como estímulo antígeno para fabricação dos anticorpos de dosagem (57). Infelizmente muitos ensaios não estão de acordo com esse consenso e essa

padronização universal, apesar de ter diminuído, não eliminou a variabilidade entre os métodos de dosagem de Tg disponíveis (51, 54).

Adicionalmente, a sensibilidade funcional também é hoje um conceito fundamental para se determinar o desempenho de um kit de dosagem de Tg. Ela é definida como a menor concentração de Tg dosada com um coeficiente de variação interensaio inferior ou igual a 20% (58) e representa o menor valor detectado clinicamente relevante do teste. A sensibilidade funcional melhorou sucessivamente desde o surgimento dos primeiros métodos de dosagem de Tg, passando de 5-10 ng/mL nos ensaios RIAs antigos, para 0,5 a 0,9 ng/mL nos IMAs de primeira geração, e para 0,05-0,1 ng/mL em IMAs "ultrassensíveis" (59).

A sensibilidade funcional do método influencia diretamente os pontos de corte. O estudo original de Pacini et al. (21) mostrou que o ponto de corte, definido como a média + dois desvios padrão (DP) dos valores de PAAF-Tg obtidos de pacientes com diagnóstico final benigno ou maligno de doença não tireoidiana, foi de 21,7 ng/PAAF. Este ponto de corte elevado pode ser explicado pela baixa sensibilidade funcional do método usado para a dosagem da Tg, que era de 3 ng/mL. A maior sensibilidade funcional dos ensaios disponíveis atualmente explica a diminuição progressiva dos limiares propostos. Em função disso, alguns autores propõem que o ponto de corte para a PAAF-Tg deva ser adaptado para o método de Tg utilizado em cada centro (36).

Diversos estudos têm sido publicados com foco nos fatores metodológicos que podem influenciar os valores de Tg encontrados em lavados da PAAF, tais como o volume e tipo de líquido utilizado na lavagem da agulha,

o procedimento de coleta das amostras e a interferência dos TgAc e da sTg nos valores da PAAF-Tg.

Enxágue da agulha

Líquido de enxágue da agulha

O meio usado para lavar a agulha utilizada na PAAF varia entre os estudos, de solução salina fisiológica a 0,9% ao soro livre de Tg, padrão “zero” fornecido pelo kit de dosagem de Tg (Tabela 1). A solução salina é mais acessível e de baixo custo, sendo, por isso, empregada com maior frequência (28-30, 32-35). Para comparar os tipos de líquidos de lavagem usados na PAAF, Frasoldati et al. (22) usaram agulhas distintas para coletar duas amostras consecutivas dos mesmos 10 LNs metastáticos e 10 LNs negativos para malignidade; uma agulha foi lavada com 1,0 mL de solução salina e a outra com 1,0 mL de soro livre de Tg. As concentrações da PAAF-Tg não diferiram entre os lavados das agulhas adquiridos com os dois meios de enxágue.

Tabela 1 Revisão dos diferentes métodos de dosagem de Tg pela punção aspirativa por agulha fina.

	Número de pacientes/LNs	Método de dosagem da Tg (kit)	Agulha (calibre)	Volume e tipo do líquido de enxágue	Unidade*
Boi et al. (13)	73/-	Imunoradiométrico (CIS Bio International) ou Imunométrico quimioluminescente (Immulite 2000 - analisador automático de imunoensaios, Simens)	22-25	Soro livre de Tg** 0,5 mL	ng/mL
Pacine et al. (21)	35/-	Imunoradiométrico (Sorin)	21	Soro livre de Tg 0,5 mL	ng/PAAF

Frasoldati et al. (22)	130/216	Imunoradiométrico (Radim)	22-23 Agulha espinhal 25	Soro livre de Tg ou solução salina 1 mL	ng/mL
Snozek et al. (28)	88/122	Analizador automático de imunoensaio DXI (Beckman Coulter) ou Immulite 2000 - analizador automático de imunoensaios (Simens)		Solução salina 0,5 a 1 mL	ng/mL
Borel et al. (29)	34/53	Imunoradiométrico (CIS Bio International)	22 BD espinhal® ou 23BD <i>Microlance 3</i> ®	Solução salina 1 mL	ng/mL
Cunha et al. (30)	67/83	Imunométrico quimioluminescente (Immulite 2000, Euro/DPC Ltd)	22 ou 25	Solução salina 1 mL	ng/mL
Uruno et al. (31)	111/129	—	22	Solução salina 0,5 mL	ng/mL
Kim et al. (32)	168/168	Imunoradiométrico (CIS Bio International)	23	Solução salina 1 mL	ng/mL
Jeon et al. (33)	47/76	—	21-23	Solução salina 1 mL	ng/mL
Sohn et al. (34)	92/95	Imunoradiométrico (CIS Bio International)	23	Solução salina 1 mL	ng/mL
Salmashöglu et al. (35)	225/255	Imunoradiométrico (CIS Bio International)	—	Solução salina 3 mL	ng/mL
Bornaud et al. (36)	89/122	Imunoradiométrico (CIS Bio International)	27	Soro livre de Tg 1 mL	ng/PAAF
Sigstad et al. (37)	145/256	Imunofluorométrico	25 ou 27	Soro livre de Tg ou solução salina 0,5 mL	ng/mL
Biscolla et al. (38)	32/44	Imunofluorométrico (Delphia)	—	Solução salina 1 mL	ng/mL
Zanella et al. (39)	43/43	Eletroquimioluminescente (Modular E-170 Roche)	22-25	Solução salina 1 mL	ng/mL
Giovanella et al. (61)	108/156	Imunoradiométrico DYNObest Tg-plus, (BRAHMS Diagnostica GmbH)	—	Solução salina 1 mL	ng/mL
Kim et al. (62)	68/91	Imunoradiométrico (CIS Bio International)	21-23	Solução salina 0,5 mL	ng/mL

PAAF, punção aspirativa por agulha fina; LNs, linfonodos.* Unidade empregada para expressar os resultados da dosagem de tireoglobulina no lavado da punção aspirativa por agulha fina (PAAF-Tg). ** Soro livre de Tg, padrão “zero” fornecido pelo kit do ensaio de Tg.

Contudo, os estudos de Baskin et al. (15) e Snozek et al. (28) levantaram a possibilidade do aparecimento de efeito matriz quando a solução

salina é utilizada. O efeito matriz é um tipo de interferência em que os constituintes do ambiente em que a Tg se encontra alteram a reatividade da Tg com os anticorpos do ensaio. Snozek et al. (28) realizaram um teste de recuperação após sobrecarga exógena de Tg e mostraram que os valores de Tg aumentaram em aproximadamente 25% (variando de 100 a 140% do valores esperados) quando a agulha da PAAF foi lavada com solução salina. De fato, a natureza da solução usada para enxaguar a agulha pode influenciar a conformação das proteínas, afetando assim a ligação dos anticorpos, o que foi observado no caso da Tg quando a solução salina foi usada como tampão (28, 29, 31, 37). Este efeito matriz pode explicar valores elevados de Tg encontrados por alguns autores em LNs benignos (36). Interações não específicas podem ser a causa dessa interferência na dosagem de Tg, como observado por Baskin et al. (15).

Assim, apesar de o volume da solução incluída no kit ser limitado e do seu maior custo, sua utilização é preferível à solução salina para evitar viés na dosagem de Tg em lavados da PAAF (36). No entanto, quando a solução salina for usada for utilizada por motivos práticos, recomenda-se verificar a ausência do efeito matriz (60), como foi feito por Borel et al. (29), que mensuraram a imunorreatividade da Tg em amostras contendo apenas solução livre de Tg incluída no ensaio, solução salina ou solução salina suplementada com 70g/l de albumina sérica humana. Os resultados mostraram que a imunorreatividade da Tg não alcançaram o limite de detecção do ensaio em todas as amostras estudadas.

Volume do líquido de enxágue

Nos vários estudos, o volume de líquido usado para enxaguar a agulha da PAAF varia de 0,5 a 3,0 mL (Tabela 1), sendo o valor de 1,0 mL empregado com maior frequência (22, 29, 30, 32-34, 36, 42) e também recomendado pelo consenso publicado por Leenhardt et al. (60). Alguns autores propõem lavar a agulha várias vezes e coletar o montante total dos lavados em um mesmo tubo. De acordo com Borel et al. (29), três lavagens capazes de somar um volume de 1,0 mL de líquido são suficientes para se obter mais de 97% da Tg presente na agulha.

Coleta das amostras

Diversos tubos de ensaio estão disponíveis no mercado e uso dos mesmos na PAAF-Tg deve ser validado. De acordo com Giovanella et al. (61), vieses na dosagem da PAAF-Tg podem ser provocados por diferentes tubos utilizados para armazenar o lavado da agulha de punção. Após PAAF guiada por US em 156 LNs de 108 pacientes previamente tratados com tireoidectomia e radioablação por CDT, esses autores executaram a lavagem das agulhas com 1,0 mL de solução salina, que eles dividiram, de forma homogênea, em três tubos de ensaio diferentes: tubo de ensaio simples, tubo separador de soro e tubo com heparina de lítio. O uso de tubos com separador de soro e com heparina de lítio foi associado com reduções significativas nos valores da PAAF-Tg em comparação com os tubos simples. Além disso, a PAAF-Tg dosada em tubos simples e com separador de soro mostrou sensibilidade de 100%, enquanto que dois resultados falsos negativos ocorreram nos tubos com heparina de lítio (sensibilidade de 98%). Assim, os tubos com separador de soro e os tubos com heparina de lítio podem diminuir a concentração medida

da PAAF-Tg e a coleta de um volume padronizado de líquido de lavagem em tubos de ensaio simples é recomendada.

Interferência pela tireoglobulina circulante

Há um número limitado de estudos sobre o valor diagnóstico da PAAF-Tg para o estadiamento de LNs em pacientes com CDT antes da tireoidectomia (22, 32, 36, 37, 62) e seus resultados são discordantes.

Embora Frasoldati et al. (22) tenham encontrado 100% de especificidade para a PAAF-Tg de pacientes aguardando tireoidectomia e Cunha et al. (30), um VPP de 100% em pacientes antes da cirurgia, resultados falsos positivos têm sido relatados em indivíduos com sTg elevada (15, 21, 32). De fato, níveis de Tg tão altos quanto 88,8 ng/mL foram encontrados em LNs benignos de pacientes que aguardavam cirurgia para câncer da tireoide (32, 36) e em LNs de pacientes sem qualquer doença da tireoide, o que poderia conduzir a uma cirurgia desnecessária para muitos desses pacientes (31).

Segundo Sigstad et al. (37), a manipulação ou palpação da tireoide em pacientes que tenham toda a glândula ou parte dela pode causar escape de Tg para a linfa, resultando em dosagem falsamente positiva de Tg em LNs por meio da PAAF-Tg. A PAAF-Tg deve ser igualmente evitada na investigação de LNs situados próximos à tireoide (LNs paratraqueal, pré-traqueal e pré-laríngeo, por exemplo) antes da tireoidectomia, quando o risco da agulha da punção atravessar a glândula tireoide é elevado, resultando em valores aumentados da PAAF-Tg, independentemente da existência de malignidade no LN (31). Outras explicações para os resultados falso positivos incluem a contaminação do LN pela sTg circulante e artefatos causados pelo método utilizado para detecção de Tg em função de ligações não específicas de seus

anticorpos com diferentes componentes do meio. Estes artefatos, descritos acima como efeito matriz, dependem dos anticorpos e do meio utilizado.

A hipótese de contaminação pela sTg, não é suportada pelos dados obtidos por Borel et al. (29). Segundo eles, mesmo se o material coletado pela PAAF se constituísse apenas de sangue, em função da diluição, a taxa de contaminação da PAAF-Tg seria de 0,2 vezes o valor da sTg, que neste estudo variou entre 0,003% e 0,012%, claramente não significativa. Para reforçar esse argumento, eles também mostraram que a PAAF-Tg foi indetectável em pacientes controles negativos, que não haviam se submetido previamente à tireoidectomia e que, portanto, tinham sTg detectável. Por fim, eles dosaram a albumina nos lavados da PAAF e mostraram que a contaminação da PAAF-Tg por proteínas séricas foi muito baixa. Eles concluíram que a sTg pode interferir de forma significativa nos valores da PAAF-Tg apenas em pacientes com elevados níveis de sTg, em quem a realização da PAAF-Tg não seria necessária, já que esses pacientes geralmente são portadores de metástases evidentes. Outros autores, como Bournaud et al. (36) e mais recentemente Kim et al. (62), também foram incapazes de identificar alguma influência da presença da glândula tireoide nos resultados da PAAF-Tg e mostraram que este teste apresentou elevadas sensibilidade, especificidade e acurácia para o estadiamento de LNs antes da realização da tireoidectomia.

De forma contrária, em um grande estudo realizado por Kim et al. (32), a PAAF-Tg realizada antes da cirurgia mostrou menor sensibilidade e acurácia para os cinco valores de pontos de corte avaliados quando comparada à dosagem após a tireoidectomia. Segundo Sohn et al. (34), não está claro se a interferência da sTg em valores baixos ou intermediários de PAAF-Tg é

desprezível, uma vez que os pacientes avaliados por Borel et al. apresentavam níveis elevados de PAAF-Tg; assim, a solução para este problema requer uma análise mais aprofundada.

Vários pontos de corte diferentes têm sido sugeridos para a PAAF-Tg antes da tireoidectomia. De acordo com alguns autores, que acreditam na hipótese de contaminação pela Tg circulante, diferentes limiares diagnósticos devem ser estabelecidos para os pacientes que foram submetidos à tireoidectomia e para aqueles que aguardam tireoidectomia, enquanto outros recomendam a adoção de um ponto de corte único para ambas as categorias de pacientes. Segundo Borel et al. (29), qualquer nível detectável de PAAF-Tg em LNs cervicais de pacientes que não apresentem níveis elevados de sTg estaria associado com a presença de células da tireoide. Essa hipótese é fortalecida por estudos recentes nos quais pontos de corte únicos da PAAF-Tg tão baixos quanto 0,93 ng/mL identificaram corretamente LNs com metástases de CDT (36).

Interferência pelos anticorpos anti-tireoglobulina (TgAc)

A interferência dos TgAc circulantes é sem dúvida o mais grave problema técnico que atualmente compromete a utilização da sTg como marcador de recorrência de CDT (13, 16).

Como os métodos utilizados para medir a PAAF-Tg e a sTg são os mesmos, uma possível interferência dos TgAc com valores da PAAF-Tg foi considerada (22, 42) até que Boi et al. (13) mostraram a ausência de interação significativa entre os TgAc e os níveis de a Tg dosados em LNs cervicais de pacientes com CDT, mesmo naqueles com TgAc detectáveis no interior dos LNs, quer por síntese ativa quer por contaminação hemática. Apesar de esses

autores terem relatado que a presença dos TgAc nas amostras poderia resultar em subestimação na concentração da PAAF-Tg, esta interferência mostrou ter um pequeno efeito sobre o desempenho clínico do teste, uma vez que os níveis de PAAF-Tg nos lavados contendo TgAc foram muito maiores que o ponto de corte selecionado em todos os casos avaliados (13).

Cerca de dois anos antes, Baskin et al. (15) já haviam relatado não ter encontrado diferenças em termos de sensibilidade e de especificidade para detecção metástases linfonodais entre pacientes com ou sem TgAc séricos. No entanto, o número limitado de casos avaliados neste estudo impediu qualquer conclusão sólida.

A interferência reduzida dos TgAc nos resultados da PAAF-Tg quando comparada àquela exercida na dosagem de sTg poderia ser explicada pela diluição das amostras (diluição de 1:50 ou mais) (37), pelas elevadas concentrações de Tg no lavado, que saturam os locais de ligação dos TgAc superando sua interferência, ou pela ausência ou raridade dos TgAc no interior dos LNs (13).

Em 2007, Sigstad et al. (37) estudou o papel da possível interferência dos TgAc e encontraram que esses anticorpos não estavam presentes no lavado da PAAF de indivíduos com TgAc séricos e PAAF-Tg negativa ou com baixos valores. A ausência dos TgAc no interior dos LNs também foi referida por outros grupos (13, 29, 37, 63).

Segundo Boi et al. (13), embora não se possa excluir que a presença de TgAc nos lavados da PAAF possa, em alguns casos, impedir a detecção de Tg em LNs metastáticos, este fenômeno não foi observado em sua série de grande porte e portanto, sua frequência deve ser muito baixa.

Cappelli et al. (64), por sua vez, observou recentemente a mudança de níveis indetectáveis para detectáveis na PAAF-Tg de LNs suspeitos de metástase pela US ou pela PCI após a estimulação com TSH recombinante humano (rhTSH) em dois pacientes com TgAc séricos detectáveis. Esses autores acreditam que nesses pacientes, a presença de TgAc poderia ter impedido completamente a dosagem da Tg na PAAF e que somente após estimulação com rhTSH os níveis de Tg nos LNs teriam aumentado o suficiente para saturar todos os sítios de ligação dos TgAc e se tornar detectável, um possibilidade já aventada anteriormente. Como a presença dos TgAc no lavado da agulha de punção desses LNs não foi avaliada uma que não é recomendada pela maioria dos autores e em função da ausência de dados histológicos, essa hipótese não pôde ser confirmada.

Zanella et al. (39) avaliaram o papel do TSH sérico nos níveis da PAAF-Tg de pacientes sem evidência de metástases linfonodais pela citologia que se encontravam em terapia supressiva de levotiroxina (TSH = 0,07 mUI/mL), ou que estavam em hipotireoidismo para dosagem de sTg estimulada (TSH = 82,2 mUI/mL). Segundo esses autores, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os valores medianos da PAAF-Tg entre os grupos (3,3 ng/mL vs. 3,8 ng/mL, respectivamente), sugerindo a ausência de interferência dos níveis séricos de TSH nas dosagens de PAAF-Tg.

Pontos de corte da dosagem de tireoglobulina no lavado da punção aspirativa por agulha fina

Embora o desempenho diagnóstico da PAAF-Tg esteja bem estabelecido, seu ponto de corte permanece controverso. Uma grande variedade de limiares de 0,9 até 39,3 ng/mL têm sido proposta na literatura

(Tabela 2), mas não está claro se o mesmo ponto de corte pode ser usado para pacientes antes e após a tireoidectomia e para aqueles com elevadas concentrações de sTg. Os principais obstáculos para a definição de um ponto de corte específico para PAAF-Tg são a variedade de kits de dosagem de Tg disponíveis e as diferentes técnicas e volumes de solução usados para lavar as seringas da PAAF. Em alguns estudos, o ponto de corte foi definido como a média + 2 DP dos valores de PAAF-Tg de pacientes com citologia negativa (15, 21, 27). Outros autores estabeleceram o ponto de corte baseado na comparação dos níveis da PAAF-Tg com os níveis de sTg, pelo qual os LNs foram considerados metastáticos quando a PAAF-Tg era maior do que a sTg (31, 33, 37, 62), o que afastaria a possibilidade de contaminação pela Tg circulante. Cunha et al. (30) definiu o ponto de corte como a sensibilidade funcional do ensaio de Tg. Em outros estudos, o ponto de corte foi estabelecido baseado na área abaixo da curva ROC (Receiver Operating Characteristic), que representa a melhor relação entre sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico (32, 34-36). Boi et al. (13) usou o maior valor de PAAF-Tg encontrado em LNs com citologia benigna que mostraram regressão ultrassonográfica em 6 a 12 meses como ponto de corte.

Tabela 2 Desempenho diagnóstico da PAAF-Tg e da PAAF-C e pontos de cortes da PAAF-Tg.

	Sensibilidade analítica/ funcional do kit de dosagem da PAAF-Tg	Método de definição do ponto de corte da PAAF-Tg	Ponto de corte da PAAF-Tg	Sensibilidade/ especificidade e da PAAF-C	Sensibilidade/ especificidade da PAAF-Tg	Padrão ouro^a
Boi et al. (13)	0,2 (IRMA) ou 0,5 ng/mL	Maior valor da	1,7 ng/mL (T) ou 36	—	100%/100%	Histopatologia ou

	(ICMA)/-	PAAF-Tg encontrado em LN benignos ^b	ng/mL (NT)			PAAF-C reativa + regressão ultrassono gráfica em 6-12 meses Histopatologia
Pacine et al. (21)	3 ng/mL/ -	Média + 2 DP ^c	21,7 ng/PAAF	85,7%/-	100%/-	Histopatologia
Frasoldati et al. (22)	0,25 ng/mL/ -	Percentil 97,5 de linfonodos com PAAF-C benigna ^d	1,1 ng/mL (T) ou 39,3 ng/mL (NT)	—	84,0%/95,4%	Histopatologia
Snozcek et al. (28)	0,06 ou 0,2 ng/mL/0,1 ou 0,9 ng/mL	Curva ROC	1 ng/mL	—	100%/96,2%	Histopatologia, US cervical ou evidência clínica em mais de 1 ano de acompanhamento
Borel et al. (29)	-/1 ng/PAAF	—	Alta: > 10 ng/mL Intermediária: 1 a 10 ng/mL Indetectável: < 1 ng/mL	—	—	—
Cunha et al. (30)	0,5 ou 0,2ng/mL/0,9 ng/mL	Sensibilidade funcional do kit sTg	0,9 ng/mL	55% (T) e 57% (NT)/100%(T)	100% (T e NT)/100% (T)	Histopatologia
Uruno et al. (31)	—	—	—	78%/-	81%/-	Histopatologia
Kim et al. (32)	0,2 ng/mL/0,7 ng/mL	Avaliou 5 pontos de corte pela curva ROC Baseado em Uruno et al.	sTg, média + 2 DP (32 ng/mL) ou 10 ng/mL	77,3%/98%	90,8%/89,8%	Histopatologia e seguimento com US
Jeon et al. (31)	—	—	sTg ou 36 ng/mL (quando sTg não disponível)	80,4%/100%	94,6%/90%	Histopatologia
Sohn et al. (34)	0,2 ng/mL/0,7 ng/mL	Avaliou 6 pontos de corte pela curva ROC	5 ng/mL	40,5%/100%	69%/83%	Histopatologia

Salmash oğlu et al. (35)	—	Curva ROC	28,5 ng/mL	95%/40%	100%/96%	Histopatol ogia
Bornaud et al. (36)	0,2 ng/mL/0,7 ng/mL	Avaliou 7 pontos de corte pela curva ROC	0,93 ng/PAAF	71,1%/73%	94,2%/97,8%	Histopatol ogia ou PCI + desaparec imento/ ausência de progressã o na US
Sigstad et al. (37)	0,1ng/mL/-	sTg	sTg	75%/50% e 100% (NT)	100%/100% e 83% (NT)	Histopatol ogia
Biscolla et al. (38)	1 ng/mL	—	Positivo: > 50 ng/mL Negativo: < 1 ng/mL	86%/100%	—	Histopatol ogia, US periódica
Zanella et al. (39)	1 ng/mL/-	Baseado em Kim et al. e Baskin et al.	10 ng/mL	—	100%/100%	Histopatol ogia ou PAAF-C negativa + acompanh amento com US cervical e sTg estimulad a por pelo menos 1 ano
Giovanel la et al. (61)	—	—	1 ng/mL	—	98 ou 100%/100%	Histopatol ogia, exame clínico,sTg e US cervical
Kim et al. (52)	0,2 ng/mL/0,7 ng/mL	sTg	sTg	96,4/68,9% (NT) e 100%/90% (T)	95%/90,9% (NT) e 80%/100% (T)	Histopatol ogia

PAAF, punção aspirativa por agulha fina; PAAF-Tg, dosagem de Tg no lavado da punção aspirativa por agulha fina; PAAF-C, avaliação citológica das amostras coletadas pela punção aspirativa por agulha fina; Tg, tireoglobulina; US, ultrassonografia; PCI, pesquisa de corpo inteiro; NT, pacientes aguardando tireoidectomia; T, pacientes tireoidectomizados; LN, linfonodos; sTg, tireoglobulina sérica; IRMA, ensaios imunoradiométricos; ICMA, ensaios imunoquimioluminescentes. ^aMétodos considerados padrão ouro para determinar a sensibilidade e especificidade da PAAF-Tg e da PAAF-C. ^b LNs foram considerados como benignos quando apresentaram PAAF-C reativa associada a regressão ultrassonográfica em 6-12 meses, ou quando tiveram histologia benigna. ^cMédia + dois desvios padrão dos valores da PAAF-Tg de LNs benignos de pacientes com história de carcinoma diferenciado de tireoide (CDT). ^dPercentil 97,5 dos níveis de PAAF-Tg de pacientes com PAAF-C negativas.

Por razões éticas, os pacientes com citologia benigna, em geral, não são submetidos à cirurgia. Em função disso, em alguns estudos os pontos de cortes foram estabelecidos baseados em resultados da PAAF-C. A citologia, contudo, não pode ser considerada como padrão ouro para se estabelecer o ponto de corte da PAAF-Tg na medida em que o objetivo do estudo é comparar a performance diagnóstica de ambos os testes (36).

O uso do valor da sTg como ponto de corte da PAAF-Tg pode ser difícil em indivíduos que aguardam tireoidectomia já que a maioria dos consensos não recomenda a avaliação da sTg nesses pacientes. Além disso, as amostras sanguíneas para dosagem de sTg e PAAF-Tg devem ser coletadas simultaneamente uma vez que os valores de sTg variam ao longo de dias ou semanas e poderia, assim, distorcer os dados. É também importante ter em mente que na presença de TgAc, o nível sTg pode ser maior do que o nível realmente medido pela maioria dos ensaios disponíveis (13, 15).

Alguns autores (13, 15, 32) expressam os resultados PAAF-Tg como nanogramas/mililitro (ou microgramas/litro), enquanto outros (21, 27, 29, 36), usam a unidade nanogramas/punção (Tabela 2). De acordo com alguns autores, a unidade nanograma/punção representa melhor o teste, uma vez que reflete a diluição da Tg deixada na agulha, enquanto que a unidade nanograma/mililitro pode induzir o leitor a acreditar que a PAAF-Tg reflete a verdadeira concentração de Tg no LN. Por outro lado, alguns autores afirmam que a unidade nanogramas/mililitro permite a comparação dos níveis de PAAF-Tg e sTg, o que é importante para tomada de decisão sobre a excisão cirúrgica

de LNs quando o ponto de corte PAAF-Tg é definido como nível de sTg do paciente.

Tais diferenças na expressão dos resultados, a falta de padronização entre os diversos kits de Tg disponíveis no mercado, a heterogeneidade dos grupos controle ou pacientes "negativos", e o fato de alguns autores terem estudado grupos de pacientes submetidos à tireoidectomia enquanto outros focaram pacientes tireoidectomizados tornam difícil a comparação entre os estudos publicados.

Devido à sua crença em possíveis interferências da sTg na PAAF-Tg, alguns autores sugerem o estabelecimento de limiares diagnósticos diferentes para pacientes antes e após a tireoidectomia (13, 22, 35). Frasoldati et al. (22) definiram o ponto de corte da PAAF-Tg como sendo o percentil 97,5 dos níveis de PAAF-Tg de LNs com PAAF-C negativa. Nos pacientes aguardando tireoidectomia esse valor foi de 39,3 ng/mL, comparado com 1,1 ng/mL entre aqueles já submetidos à tireoidectomia; a sensibilidade e especificidade, calculadas baseadas nos pacientes com confirmação histológica foram 84% e 95,4%, respectivamente. Boi et al. (13), definiu como ponto de corte o maior valor de PAAF-Tg encontrado em LNs benignos (na avaliação histológica ou com a combinação de PAAF-C reativa e regressão ultrassonográfica em 6-12 meses), que nos pacientes aguardando cirurgia foi de 36 ng/mL e nos pacientes submetidos à tireoidectomia de 1,7 ng/mL, com sensibilidade e especificidade de 100%.

Outros estudos aplicaram um limiar único para a PAAF-Tg independentemente do status dos pacientes quanto à tireoidectomia (30, 31-33, 36, 37, 62). Cunha et al. (30) selecionou a sensibilidade funcional do método

que usaram para dosar a Tg (0,9 ng/mL) como ponte de corte da PAAF-Tg, o que resultou em 100% de sensibilidade em ambos os grupos e uma 100% de especificidade no grupo de pacientes submetidos à cirurgia. Para afastar a possibilidade de contaminação pela Tg circulante, outros estudos (31, 33, 37, 62) usaram os níveis de sTg como ponto de corte para a PAAF-Tg. Kim et al. (62) calculou sensibilidade e especificidade baseado em pacientes com confirmação histológica e os valores encontrados foram 95% e 90,9%, respectivamente, antes da cirurgia e 80% e 100%, respectivamente, após cirurgia. Bournaud et. al (36) e Kim et al. (32) sugerem a utilização de um limiar único e simples. Esta proposta está de acordo com as diretrizes atuais, que não recomendam a dosagem de sTg em pacientes com câncer de tireoide que estão aguardando cirurgia. Nesses dois estudos, o ponto de corte foi estabelecido com base na análise da curva ROC.

Independentemente dos valores utilizados, os níveis de sensibilidade relatados pelos diversos autores foram semelhantes (84-100% quando são estabelecidos diferentes pontos de corte para as dosagens antes e depois da cirurgia contra 81-100% quando um único ponto de corte é usado). No entanto, pode-se esperar um menor número de resultados falso positivos na avaliação após a cirurgia, devido à falta de tecido tireoidiano e supressão da sTg (32).

As questões relacionadas ao ponto de corte foram recentemente abordadas por Kim et al. (32), Bournaud et al. (36), e Sohn et al. (34), que utilizaram o mesmo ensaio ultrassensível imunoradiométrico baseado em anticorpos monoclonais para dosagem de Tg em LNs suspeitos. Kim et al. (32) estudaram 168 pacientes com CPT e LNs cervicais considerados como sendo potencialmente malignos pela US antes ou após a cirurgia. Os resultados da

PAAF-Tg foram interpretados baseados em cinco diferentes pontos de corte (1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, nível de sTg do paciente e média + 2 DP dos níveis de PAAF-Tg encontrados em LNs que mostraram não serem metastáticos no exame histológico, que foi igual a 32 ng/mL) e comparados com os diagnósticos finais com base na histologia, dosagem de Tg estimulada por TSH e seguimento ultrassonográfico. Os autores sugeriram usar o nível de sTg, 10 ng/mL ou a média + 2 DP dos valores da PAAF-Tg de pacientes negativos como pontos de corte, uma vez que estes limiares apresentaram elevadas sensibilidades e acurácias, com desempenhos diagnósticos semelhantes. Usando esses pontos de corte, a sensibilidade variou de 88,2% a 90,8%, a especificidade de 84,2% a 89,8%, o VPP de 93,9% a 95,6%, o VPN de 74,4% a 80% e a acurácia de 88% a 90,5%.

Segundo esses autores, a dissecação de LNs cervicais deve ser fortemente recomendada se o resultado da PAAF-Tg for ≥ 100 ng/mL, uma vez que não há falsos positivos relatados nesses níveis, e apenas sugerida se o nível de Tg for > 10 ng/mL, $> sTg$ ou $>$ que a média + 2 DP dos níveis de pacientes negativos. No entanto, se o valor da PAAF-Tg for < 1 ng/mL com PAAF-C negativa, um estudo de seguimento deve ser considerado, e quando os níveis de Tg estiverem na faixa de 1 a 10 ng/mL, a decisão sobre o esvaziamento linfonodal deverá ser feita com base em achados clínicos e ultrassonográficos. Todos os cinco pontos de corte foram mais sensíveis e acurados na avaliação após a tireoidectomia.

No estudo de Bournaud et al. (36), 114 pacientes com câncer de tireoide antes da cirurgia (n = 13) ou durante o seguimento (n = 93) e 16 indivíduos controle foram submetidos à PAAF-Tg e à PAAF-C. O grupo controle negativo

foi composto por 16 pacientes com cânceres não-tireoidianos que apresentaram 16 LNs alargados suspeitos na US realizada durante o seguimento. A sensibilidade e a especificidade da PAAF-Tg foram determinadas para diferentes valores de ponto de corte dentro de uma faixa de 0,24-32,60 ng/PAAF usando a curva ROC. Os LNs foram classificados em benignos ou malignos baseado nos achados histológicos ou, nos pacientes não submetidos à cirurgia, nos achados da cintilografia com um seguimento mínimo de 12 meses. O ponto de corte mais adequado para o diagnóstico de metástases linfonodais de carcinoma de tireoide neste estudo foi de 0,93 ng/PAAF, ligeiramente superior à sensibilidade funcional do método usado para dosar a Tg. Para este valor, a sensibilidade foi de 94,2%, a especificidade de 97,8%, o VPP de 98,0% e o VPN de 93,7%. O uso da sensibilidade funcional do ensaio como ponto de corte (0,69 ng/mL), como proposto por Cunha et al. (30), teria resultado em sensibilidade semelhante porém com menor especificidade comparada com o ponto de corte de 0,93 ng/PAAF. Estudos anteriores que usaram pontos de corte baixos na avaliação da PAAF-Tg também relataram excelentes desempenhos, com poucos resultados falsos negativos e falsos positivos (13, 15, 28, 30). A adoção de um ponto de corte mais elevado no estudo de Bournaud et al. (36), como sugerido por alguns autores, poderia ter resultado na inexistência de falsos positivos mas teria aumentado o número de amostras falso negativas, levando a uma diminuição significativa na sensibilidade (86,5% para o ponto de corte de 4,95 ng/PAAF). Nessa série, a sensibilidade e a especificidade foram semelhantes nas 29 amostras obtidas a partir dos controles ou dos pacientes que aguardavam

tireoidectomia, e nas 93 amostras restantes que foram obtidas após a tireoidectomia.

Para comparar a frequência de LNs metastáticos e não metastáticos diagnosticados por meio de PAAF-C e de PAAF-Tg em um grupo de pacientes com valores de PAAF-Tg cujo significado, quanto à existência de malignidade, ainda não está bem estabelecido, Sohn et al. (34) estudaram 691 pacientes consecutivos com LNs cervicais com características ultrassonográficas compatíveis com metástase de CPT. Um total de 95 LNs com confirmação histológica foram incluídos no estudo de 92 pacientes que apresentaram resultados de PAAF-Tg de 0,2 ng/mL até 100 ng/mL, valor acima do qual não há relatos na literatura publicada de falsos negativos. As performances diagnósticas de múltiplos níveis de Tg (0,7 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL e 20 ng/mL e 50 ng/mL) foram avaliadas, e o melhor desempenho diagnóstico foi apresentado pelo limiar de 5,0 ng/mL: a área sob a curva (AUC) ROC foi de 0,76 (intervalo de confiança [IC] de 95%: 0,6731-0,8476) e sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN de 69, 83, 76,8, 76,3, e 77,2, respectivamente. Todavia, esse ponto de corte não exibiu diferenças significativas na sensibilidade, na especificidade, na acurácia, no VPP, no VPN ou na AUC em comparação com 10,0 e 20,0 ng/mL. Os pontos de corte 0,7, 1,0 e 50 ng/mL não foram recomendados devido às baixas sensibilidades e AUCs. Entre os 78 casos com citologia negativa, 25 (32%) foram confirmados como metástases ao diagnóstico final e exibiram PAAF-Tg variando de 0,22 a 88,34 ng/mL. Embora sete casos tenham sido categorizados como negativos por todos os seis pontos de corte analisados da PAAF-Tg, 13 casos (52%) foram classificados como positivos pelo ponto de corte de 10 ng/mL, 15 casos

(60%) pelo ponto de corte de 5 ng/mL, 18 casos (72%) pelo ponto de corte de 0,7 e pelo ponto de corte de 1 ng/mL, e 8 casos (32%) por todos os seis pontos de corte.

Um grande estudo prospectivo foi recentemente publicado, no qual 255 LNs cervicais de 225 pacientes com metástases de LNs cervicais ou recorrência de carcinoma papilífero da tireóide (35) foram avaliados pela PAAF-C e PAAF-Tg. Os diagnósticos finais, baseados em exame histológico, foram comparados com os resultados da PAAF-C e da PAAF-Tg antes da cirurgia. Quando o ponto de corte da PAAF-Tg foi estabelecido como 1 ng/mL, 200 LNs metastáticos foram diagnosticados corretamente, mas o método falhou no diagnóstico de 55 LNs. A sensibilidade, a especificidade e a acurácia da PAAF-Tg (ponto de corte = 1 ng/mL) para o diagnóstico de metastase de carcinoma de tireoide antes da cirurgia foram de 100%, 0% e 78%, respectivamente. O VPP e o VPN foram de 78% e 0%, respectivamente. O ponto de corte para a PAAF-Tg com melhor sensibilidade e especificidade na análise da curva ROC foi 28,5 ng/mL, que diagnosticou corretamente 253 LNs metastáticos e falhou apenas no diagnostico de dois. A sensibilidade, a especificidade e a acurácia da PAAF-Tg (ponto de corte = 28,5) para o diagnóstico de metástases de carcinoma de tireoide antes da cirurgia foram de 100%, 96% e 99%, respectivamente. O VPP e o VPN foram de 99% e 100%, respectivamente.

SÍNTESE

A PAAF-Tg é de simples execução, baixo custo, e melhora o desempenho diagnóstico da citologia na detecção precoce de metástases linfonodais de CDT. Essa técnica permite o diagnóstico mesmo nos casos de amostras paucicelulares (depósitos metastáticos com degeneração e

componente cístico), em que a citologia costuma falhar na definição diagnóstica e não é afetada por anticorpos TgAc, é confiável mesmo em lesões muito pequenas e exibe uma elevada acurácia diagnóstica.

Uma vez que os ensaios de Tg disponíveis são altamente variáveis, eles não podem ser utilizados de forma intercambiável para o manejo de pacientes com CDT (51). Portanto, recomenda-se que as dosagens dos níveis de sTg e PAAF-Tg sejam sistematicamente realizadas utilizando o mesmo método e ensaio e que estes sejam incluídos no prontuário do paciente.

No caso dos pacientes tratados com ^{131}I , o intervalo entre o tratamento e a PAAF-Tg deve ser suficientemente longo (maior que três meses) para permitir a destruição definitiva do LN metastático (57), caso contrário, a PAAF-Tg poderá produzir resultados falsos positivos. Também não é aconselhável dosar a PAAF-Tg em massas identificadas no leito tireoidiano, uma vez que este teste é incapaz de distinguir remanescentes de tecido tireoideano de recidiva do câncer.

O desempenho diagnóstico da PAAF-Tg não é afetado pela presença da tireoide. Portanto, a PAAF-Tg pode ser usada tanto para o rastreamento de metástases linfonodais em pacientes tireoidectomizados, quanto para o estadiamento de LNs em indivíduos com CDT que ainda não se submeteram à cirurgia inicial.

CONCLUSÃO

A dosagem de Tg no lavado da PAAF exibe algumas vantagens sobre a citologia. A combinação de PAAF-Tg e PAAF-C é recomendada para o estadiamento e seguimento de pacientes com CDT e LNs cervicais suspeitos.

A dosagem da PAAF-Tg deve ser realizada com os mesmos métodos usados para aferição dos níveis de sTg. Lavar a agulha com o soro livre Tg fornecido pelo kit do ensaio de Tg é preferível ao enxágue com solução salina normal e é recomendado o emprego de um volume de 1 mL de líquido, devendo, o lavado, ser armazenado em tubos de ensaio simples. Embora o ponto de corte da PAAF-Tg ainda não tenha sido definitivamente estabelecido, valores acima de 10 ng/mL são recomendados para tomada de decisão quanto à dissecação de LN cervicais, uma vez que mostraram alta sensibilidade e acurácia para o diagnóstico de metástases linfonodais cervicais de CDT em estudos diversos.

Declaração de conflito de interesses: Não há conflito de interesses.

Autor Correspondente: Maria Roseneide dos Santos Torres, Departamento de Endocrinologia e Diabetes, Universidade Federal de Campina Grande. Endereço: Rua Francisco Lobo Filho, 750, apto 602, CEP: 58410183, Campina Grande, Paraíba, Brasil. Telefone: (55) 083 88405391. E-mail: rosetorres.maria@gmail.com

REFERÊNCIAS

1. Kent WD, Hall SF, Isotalo PA, Houlden RL, George RL, Groome PA 2007 Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. *CMAJ* 177:1357–1361.
2. Davies L, Welch HG 2006 Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA* 295:2164–2167.
3. Colonna M, Guizard AV, Schwartz C, Velten M, Raverdy N, Molinie F, Delafosse P, Franc B, Grosclaude P 2007 A time trend analysis of papillary and follicular cancers as a function of tumour size: a study of data from six cancer registries in France (1983–2000). *Eur J Cancer* 43:891–900.
4. Elisei R, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Masserini L, Ceccarelli C, Lippi F, Grasso L, Basolo F, Bevilacqua G, Miccoli P, Coscio G, Vitti P, Pacini F, Pinchera A 2010 Have the clinical and pathological features of differentiated thyroid carcinoma really changed over the last 35 years? Study on 4187 patients from a single Italian institution to answer this question. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1516–1527.
5. Pacini F 2012 Changing natural history of differentiated thyroid cancer. *Endocrine*. Epub. Jun 27.
6. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2013*. Atlanta: American Cancer Society; 2013. Available at <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/document/document/acspc-036845.pdf> Accessed June 14, 2013.

7. Enewold L, Zhu K, Ron E, Marrogi AJ, Stojadinovic A, Peoples GE, Devesa SS 2009 Rising thyroid cancer incidence in the United States according to demographic and tumor characteristics, 1980–2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:784–791.
8. Schuff KG 2011 Management of recurrent/persistent papillary thyroid carcinoma: efficacy of the surgical option. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2038–2039.
9. Mazzaferri EL, Kloos RT 2001 Clinical review 128: current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1447–1463.
10. Kelemen PR, Van Herle AJ, Giuliano AE 1998 Sentinel lymphadenectomy in thyroid malignant neoplasms. *Arch Surg* 133:288-92.
11. Sakorafas GH, Sampanis D, Safioleas M 2010 Cervical lymph node dissection in papillary thyroid cancer: current trends, persisting controversies, and unclarified uncertainties. *Surg Oncol* 19:57–70.
12. Dzodic R, Markovic I, Inic M, Jokic N, Djuriscic I, Zegarac M, Pupic G, Milovanovic Z, Jovic V, Jovanovic N 2006 Sentinel lymph node biopsy may be used to support the decision to perform modified radical neck dissection in differentiated thyroid carcinoma. *World J Surg* 30:841-6.
13. Boi F, Baghino G, Atzeni F, Lai ML, Faa G, Mariotti S 2006 The diagnostic value for differentiated thyroid carcinoma metastases of thyroglobulin (Tg) measurement in washout fluid from fine-needle aspiration biopsy of neck lymph

nodes is maintained in the presence of circulating anti-Tg antibodies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91:1364–1369.

14. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W 2006 European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 154:787–803.

15. Baskin HJ 2004 Detection of recurrent papillary thyroid carcinoma by thyroglobulin assessment in the needle washout by fine-needle aspiration of suspicious lymph nodes. *Thyroid* 14:959-63.

16. Spencer CA 2004 Challenges of serum thyroglobulin (Tg) measurement in the presence of Tg autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3702–3704.

17. Schlumberger M, Mancusi F, Baudin E, Pacini F 1997 131I therapy for elevated thyroglobulin levels. *Thyroid* 7:273-6.

18. Maxon HR 1999 Detection of residual and recurrent thyroid cancer by radionuclide imaging. *Thyroid* 9:443-6.

19. Costante G, Filetti S 2009 Thyroglobulin in fine-needle aspirate: a clue to metastasis? *Nat Rev Endocrinol* 5:249-50.

20. Dessler A, Rappaport Y, Blank A, Marmor S, Weiss J, Graif M 2003 Cystic appearance of cervical lymph nodes is characteristic of metastatic papillary thyroid carcinoma. *J Clin Ultrasound* 1:21-5.

21. Pacini F, Fugazzola L, Lippi F, Ceccarelli C, Centoni R, Miccoli P, Elisei R, Pinchera A 1992 Detection of thyroglobulin in fine-needle aspirates of

nonthyroidal neck masses: a clue to the diagnosis of metastatic differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 74:1401–4.

22. Frasoldati A, Toschi E, Zini M, Flora M, Caroggio A, Dotti C, Valcavi R 1999 Role of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration biopsies of cervical lymph nodes in patients with differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 9:105–11.

23. Franklin WA, Mariotti S, Kaplan D, DeGroot LJ 1982 Immunofluorescence localization of thyroglobulin in metastatic thyroid cancer. *Cancer* 50:939–945.

24. Orija IB, Hamrahian AH, Reddy SS 2004 Management of nondiagnostic thyroid fine-needle aspiration biopsy: survey of endocrinologists. *Endocr Pract* 10:317–323.

25. Florentine BD, Staymates B, Rabadi M, Barstis J, Black A 2006 The reliability of fine-needle aspiration biopsy as the initial diagnostic procedure for palpable masses: a 4-year experience of 730 patients from a community hospital-based outpatient aspiration biopsy clinic. *Cancer* 107:406–416

26. Lee MJ, Ross DS, Mueller PR, Daniels GH, Dawson SL, Simeone JF 1993 Fine-needle biopsy of cervical lymph nodes in patients with thyroid cancer: A prospective comparison of cytopathologic and tissue marker analysis. *Radiology* 187:851-854.

27. Cignarelli M, Ambrosi A, Marino A, Lamacchia O, Campo M, Picca G, Giorgino F 2003 Diagnostic utility of thyroglobulin detection in fine-needle aspiration of cervical cystic metastatic lymph nodes from papillary thyroid cancer with negative cytology. *Thyroid* 13:1163–1167.

28. Snozek CL, Chambers EP, Reading CC, Sebo TJ, Sistrunk JW, Singh RJ, Grebe SK 2007 Serum thyroglobulin, high-resolution ultrasound, and lymph node thyroglobulin in diagnosis of differentiated thyroid carcinoma nodal metastases. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92:4278–4281.
29. Borel AL, Boizel R, Faure P, Barbe G, Boutonnat J, Sturm N, Seigneurin D, Bricault I, Caravel JP, Chaffanjon P, Chabre O 2008 Significance of low levels of thyroglobulin in fine needle aspirates from cervical lymph nodes of patients with a history of differentiated thyroid cancer. *European Journal of Endocrinology* 158:691–698.
30. Cunha N, Rodrigues F, Curado F, Ilhéu O, Cruz C, Naidenov P, Rascão MJ, Ganho J, Gomes I, Pereira H, Real O, Figueiredo P, Campos B, Valido F 2007 Thyroglobulin detection in fine-needle aspirates of cervical lymph nodes: a technique for the diagnosis of metastatic differentiated thyroid cancer. *European Journal of Endocrinology* 157:101–107.
31. Uruno T, Miyauchi A, Shimizu K, Tomoda C, Takamura Y, Ito Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Amino N, Kuma K 2005 Usefulness of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration biopsy specimens for diagnosing cervical lymph node metastasis in patients with papillary thyroid cancer. *World Journal of Surgery* 29:483–485.
32. Kim MJ, Kim EK, Kim BM, Kwak JY, Lee EJ, Park CS, Cheong WY, Nam KH 2009 Thyroglobulin measurement in fine-needle aspirate washouts: the criteria for neck node dissection for patients with thyroid cancer. *Clin Endocrinol* 70:145–151.

33. Jeon SJ, Kim E, Park JS, Son KR, Baek JH, Kim YS, Park do J, Cho BY, Na DG 2009 Diagnostic benefit of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration for diagnosing metastatic cervical lymph nodes from papillary thyroid cancer: correlations with US features. *Korean J Radiol* 10:106-11.
34. Sohn YM, Kim MJ, Kim EK, Kwak JY 2012 Diagnostic performance of thyroglobulin value in indeterminate range in fine needle aspiration washout fluid from lymph nodes of thyroid cancer. *Yonsei Med J* 53:126-31.
35. Salmaslıhoğlu A, Erbil Y, Cıtlak G, Ersöz F, Sarı S, Olmez A, Tunacı M, Yılmazbayhan D, Colak N, Ozarmağan S 2011 Diagnostic value of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration biopsy for detecting metastatic lymph nodes in patients with papillary thyroid carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 396:77-81.
36. Bournaud C, Charrié A, Nozières C, Chikh K, Lapras V, Denier ML, Paulin C, Decaussin-Petrucci M, Peix JL, Lifante JC, Cornu C, Giraud C, Orgiazzi J, Borson-Chazot F 2010 Thyroglobulin measurement in fine-needle aspirates of lymph nodes in patients with differentiated thyroid cancer: a simple definition of the threshold value, with emphasis on potential pitfalls of the method. *Clin Chem Lab Med* 48:1171-7.
37. Sigstad E, Heilo A, Paus E, Holgersen K, Grøholt KK, Jørgensen LH, Bogsrud TV, Berner A, Bjørø T 2007 The usefulness of detecting thyroglobulin in fine-needle aspirates from patients with neck lesions using a sensitive thyroglobulin assay. *Diagn Cytopathol* 35:761-7.

38. Biscolla RPM, Ikejiri ES, Mamone MC, Nakabashi CCD, Andrade VP, Kasamatsu TS, Crispim F, Chiamolera MI, Andreoni DM, Camacho CP, Hojaij FC, Vieira JGH, Furlanetto RP, Maciel RMB 2007 Diagnóstico de Metástases de Carcinoma Papilífero de Tiróide Através da Dosagem de Tiroglobulina no Líquido Obtido da Lavagem da Agulha Utilizada na Punção Aspirativa [Diagnosis of Metastases in Patients With Papillary Thyroid Cancer by the Measurement of Thyroglobulin in Fine Needle Aspirate]. *Arq Bras Endocrinol Metab* 51:419-425.

39. Zanella AB, Meyer EL, Balzan L, Silva AC, Camargo J, Migliavacca A, Guimarães JR, Maia AL 2010 Thyroglobulin measurements in washout of fine needle aspirates in cervical lymph nodes for detection of papillary thyroid cancer metastases. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54:550-4.

40. Leboulleux S, Girard E, Rose M, Travagli JP, Sabbah N, Caillou B, Hartl DM, Lassau N, Baudin E, Schlumberger M 2007 Ultrasound criteria of malignancy for cervical lymph nodes in patients followed up for differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3590–3594.

41. Frates MC, Benson CB, Charboneau JW, Cibas ES, Clark OH, Coleman BG, Cronan JJ, Doubilet PM, Evans DB, Goellner JR, Hay ID, Hertzberg BS, Intenzo CM, Jeffrey RB, Langer JE, Larsen PR, Mandel SJ, Middleton WD, Reading CC, Sherman SI, Tessler FN 2005 Management of thyroid nodules detected at Us: society of Radiologists in Ultrasound consensus conference statement. *Radiology* 237:794–800.

42. Frasoldati A, Pesenti M, Gallo M, Caroggio A, Salvo D, Valcavi R 2003 Diagnosis of neck recurrences in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer* 97:90-6.
43. García-Pascual L, Barahona MJ, Balsells M, del Pozo C, Anglada-Barceló J, Casalots-Casado J, Veloso E, Torres J 2011 Complex thyroid nodules with nondiagnostic fine needle aspiration cytology: histopathologic outcomes and comparison of the cytologic variants (cystic vs. acellular). *Endocrine* 39:33–40.
44. Alexander EK, Heering JP, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Cibas ES, Marqusee E 2002 Assessment of nondiagnostic ultrasound-guided fine needle aspirations of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4924–4927.
45. Maia FF, Matos PS, Pavin EJ, Vassallo J, Zantut-Wittmann DE 2011 Value of repeat ultrasound-guided fine-needle aspiration in thyroid nodule with a first benign cytologic result: impact of ultrasound to predict malignancy. *Endocrine* 40:290–296.
46. García-Pascual L, Balsells M, Fabbi M, Pozo CD, Valverde MT, Casalots J, González-González JM, Veloso E, Anglada-Barceló J 2011 Prognostic factors and follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma with false negative or nondiagnostic FNAC before surgery. Comparison with a control group. *Endocrine* 40:423–431.
47. Georges A, Corcuff J-B, Brossaud J, Bordenave L 2012 Particularités méthodologiques et interprétation du dosage de thyroglobuline sérique [Methodological peculiarities and interpretation of serum thyroglobulin measurements]. *Medecine Nucleaire* 36:24-28.

48. Maia AL, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RMB, Maciel LMZ, Rosário PW, Vaisman M 2007 Nódulos de tireóide e câncer diferenciado de tireóide: consenso brasileiro [Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: Brazilian consensus]. *Arq Bras Endocrinol Metab* 51:867-893.
49. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM 2009 Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 19:1167-214.
50. Hoofnagle A, Wener MH 2006 Serum thyroglobulin: a model of immunoassay imperfection. *CLI Lab Technology* 8:12-14.
51. Spencer CA, Bergoglio LM, Kazarosyan M, Fatemi S, LoPresti JS 2005 Clinical impact of thyroglobulin (Tg) and Tg autoantibody method differences on the management of patients with differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5566–5575.
52. Zucchelli GC, Pilo A, Massini S, Prontera C, Ferdeghini M 1996 Large between-laboratory variability of thyroglobulin immunoassays: data collected in a collaborative study. *J Clin Ligand Assay* 19:234–8.
53. Whitley RJ, Ain KB 2004 Thyroglobulin: a specific serum marker for the management of thyroid carcinoma. *Clin Lab Med* 24:29–47.
54. Lee JI, Kim JY, Choi JY, Kim HK, Jang HW, Hur KY, Kim JH, Kim KW, Chung JH, Kim SW 2010 Differences in serum thyroglobulin measurements by

3 commercial immunoradiometric assay kits and laboratory standardization using Certified Reference Material 457 (CRM-457). *Head Neck* 32:1161-6.

55. 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 1996 Human thyroglobulin reference material (CRM: Assessment of homogeneity, stability and immunoreactivity. *Ann Biol Clin (Paris)* 54:337–342.

56. 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, DeVijlder JJ 1996 Human thyroglobulin reference material (CRM 457). 2nd Part: Physicochemical characterization and certification. *Ann Biol Clin (Paris)* 54:343–348.

57. Anne Charrié 2012 The Thyroglobulin: A Technically Challenging Assay for a Marker of Choice During the Follow-Up of Differentiated Thyroid Cancer. In: Ward LS (ed), *Thyroid and Parathyroid Diseases - New Insights into Some Old and Some New Issues*. Available at: <http://www.intechopen.com/books/thyroid-and-parathyroid-diseases-new-insights-into-some-old-and-some-new-issues/the-thyroglobulin-a-technically-challenging-assay-for-a-marker-of-choice-during-the-follow-up-of-dif>. Accessed November 15, 2012.

58. Iervasi A, Iervasi G, Carpi A, Zucchelli GC 2006 Serum thyroglobulin measurement: clinical background and main methodological aspects with clinical impact. *Biomed Pharmacother* 60:414–24.

59. Spencer C, Fatemi S, Singer P, Nicoloff J, Lopresti J 2010 Serum Basal thyroglobulin measured by a second-generation assay correlates with the recombinant human thyrotropin-stimulated thyroglobulin response in patients treated for differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 20:587–95.
60. Leenhardt L, Borson-Chazot F, Calzada M, Carnaille B, Charrié A, Cochand-Priolet B, Cao CD, Leboulleux S, Le Clech G, Mansour G, Menegaux F, Monpeyssen H, Orgiazzi J, Rouxel A, Sadoul JL, Schlumberger M, Tramalloni J, Tranquart F, Wemeau JL 2011 Good practice guide for cervical ultrasound scan and echo- guided techniques in treating differentiated thyroid cancer of vesicular origin. *Ann Endocrinol* 72:173-97.
61. Giovanella L, Ceriani L, Suriano S, Crippa S 2009 Thyroglobulin measurement on fine-needle washout fluids: Influence of sample collection methods. *Diagn Cytopathol* 37:42-4.
62. Kim DW, Jeon SJ, Kim CG 2012 Usefulness of thyroglobulin measurement in needle washouts of fine-needle aspiration biopsy for the diagnosis of cervical lymph node metastases from papillary thyroid cancer before thyroidectomy. *Endocrine* 42:399-403.
63. Alfayate R, López A, Mauri M, Serrano S, Gil S, De la Iglesia P, et al. 2009 Determinación de tiroglobulina en líquido de punción aspiración con aguja fina (PAAF) de adenopatías cervicales para diagnóstico de metástasis en cáncer diferenciado de tiroides [Determination of thyroglobulin levels in fine-needle aspiration biopsy (FNAB) washout fluid of neck adenopathies for diagnosing differentiated thyroid cancer metastases]. *Endocrinol Nutr* 56:52-3.

64. Cappelli C, Pirola I, De Martino E, Gandossi E, Cimino E, Samoni F, Agosti B, Rosei EA, Casella C, Castellano M 2013 Thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration biopsy of metastatic lymph nodes after rhTSH stimulation. *Head Neck* 35:E21-3.

ANEXO**Decision Letter (THY-2013-0244.R1)**

From: p-kopp@northwestern.edu

To: rosetorres.maria@gmail.com

Subject: THYROID - Decision on Manuscript ID THY-2013-0244.R1

Body:

31-Aug-2013

Dear Dr. Torres:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Thyroglobulin in the washout fluid of lymph node biopsy: what is its role in the follow-up of differentiated thyroid carcinoma?" for publication in Thyroid.

The following step needs your careful and immediate attention:
It is key to receive copyright assignment forms from EACH of the authors in order to complete the acceptance of your manuscript.

Each author will receive an E Mail, sent to the E Mail of record, requesting them to click on a link to Manuscript Central (<http://mc.manuscriptcentral.com/thyroid>). They, and you as well, should use the link to go directly to their Author Center in order to complete the copyright form. Then click on "Manuscripts with Decisions" or "Manuscripts I have Co-authored" and look for the copyright form under the most recently accepted manuscript.

Delay in receiving the copyright forms from any of the authors will greatly delay publication since we do not have the resources to monitor this process in a timely fashion. Please make sure that 1) All of your coauthors receive this message, 2) ALL COAUTHORS EMAIL ADDRESSES ARE CORRECT IN MANUSCRIPT CENTRAL, and 3) THEIR EMAIL ADMINISTRATOR DOES NOT DELETE EMAILS TO THEM FROM MANUSCRIPT CENTRAL OR ASSIGN THEM TO SPAM OR SIMILAR FOLDERS.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Thyroid, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Peter Kopp, MD
Editor-in-Chief
Thyroid
p-kopp@northwestern.edu

Date Sent: 31-Aug-2013

Title: Thyroglobulin in the washout fluid of lymph node biopsy: what is its role in the follow-up of differentiated thyroid carcinoma?

Maria Roseneide dos Santos Torres^I; Sebastião Horácio Nóbrega Neto^{II}; Rosalina Jenner Rosas^{III}; Aline Lemos Barros Martins^{IV}; André Luis Correia Ramos^V; Thomaz Rodrigues Porto da Cruz^{VI}.

I. MD. Master's degree in Medicine and Health at the Federal University of Bahia. Attending inter-institutional doctorate in Medicine and Health at the Federal University of Bahia and the Federal University of Campina Grande, Department of Endocrinology and Diabetes, Federal University of Campina Grande, Campina Grande, Brazil; rosetorres.maria@gmail.com. Telephone number: 55 (83) 88405391.

II. MD. Radiologist. Campina Grande, Brazil; horacionobrega@hotmail.com. Telephone number: 55 (83) 99711965.

III. MD. Pathologist. Master's degree in Medicine and Health at the Federal University of Bahia. Professor at the Federal University of Campina Grande, Campina Grande, Brazil; rosalina.rosas@hotmail.com. Telephone number: 55 (83) 33210404.

IV. Medical student at the School of Medicine of the Federal University of Campina Grande, Campina Grande, Brazil; alinelbm@live.com. Telephone number: 55 (83) 99939930.

V. Biochemist. Master's degree in Public Health at the State University of Paraíba. Substitute professor at the State University of Paraíba, Campina

Grande, Brazil; uepbandreroscgl@labprosanguel.com.br. Telephone number: 55 (83) 88405100.

VI. MD, PhD. Associate Professor at the Federal University of Bahia Medical School, Brazil; thomazcruz@lableme.com.br. Telephone number: 55 (71) 99855408.

Running Head: The role of FNAB-Tg in the follow-up of DTC.

Keywords: thyroglobulin; thyroid cancer - general; thyroid cancer - clinical; thyroid diseases; endocrinology - adult.

ABSTRACT

Background: The clinical evaluation of enlarged local lymph nodes (LNs) is difficult at the beginning and throughout the follow-up of differentiated thyroid carcinoma (DTC). Although the examination of samples collected from LNs by fine-needle aspiration biopsy cytology (FNAB-C) is extremely specific for the diagnosis of metastases, its sensitivity is low, especially in paucicellular samples.

Summary: The measurement of thyroglobulin (Tg) in the fine-needle aspiration biopsy (FNAB) washout fluid (FNAB-Tg) increases the diagnostic performance of cytology to up to 100% sensitivity and specificity. However, the application of FNAB is currently hindered by the absence of methodological standardization, a lack of definite cutoff points, and the ongoing debate regarding its accuracy in non-thyroidectomized patients, those with elevated serum Tg, and those with circulating anti-Tg antibodies.

Conclusion: FNAB-Tg improves the diagnostic performance of FNAB-C in LN metastases, even when the latter is unable to diagnose the metastases. For that reason, FNAB-Tg should be included in the monitoring of DTC.

INTRODUCTION

The incidence of thyroid cancer has increased worldwide in the past few years (1-5). An estimated 60,220 new cases of thyroid cancer will be diagnosed in 2013 in the United States of America (USA), with three out of four cases occurring in females (6). The incidence rate of thyroid cancer has been dramatically increasing since the mid-90s, and it is the fastest-increasing cancer in both men and women (6), mainly due to the papillary histotype (1-3, 7).

Up to 30% of the patients with papillary thyroid carcinoma (PTC) exhibit recurrent or persistent metastasis to the neck lymph nodes (LNs) (8,9). The data from centers where sentinel LN biopsy or routine cervical LN dissection are performed show that occult metastases may occur in up to 90% of PTC patients (10, 11, 12).

The clinical evaluation of enlarged local LNs is difficult at the beginning and throughout the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma (DTC) because inflammatory lymphadenopathies are extremely frequent. Furthermore, neck lymph node metastases from a multiplicity of extrathyroidal malignancies are a relatively common finding (13).

Therefore, several tools have been proposed to facilitate the accurate identification of metastatic LNs before or after primary surgery. The monitoring of DTC after thyroidectomy and radioiodine ablation is based on the measurement of baseline and thyrotropin (TSH)-stimulated serum thyroglobulin levels, whole-body scans (WBS) using radioactive iodine (RAI), neck ultrasound (US) (13), and fine-needle aspiration biopsy (FNAB) with cytological analysis of the LNs. Additionally, staging of the neck LNs is mandatory in the management of thyroid cancer before thyroidectomy, which subjects patients with metastatic

DTC to more radical surgery. Staging is based on the neck US, and in suspected cases, the metastatic nature of LNs is confirmed by cytological analysis of the FNAB (14).

Although the specificity of serum Tg (sTg) to detect recurrent disease is high, it is not the ideal measurement for metastases affecting small LNs. In addition, it is not able to establish the location of the neoplastic focus and is highly affected by the presence of serum anti-thyroglobulin antibodies (TgAb), which are found in 25-30% of patients with DTC (15, 16). In turn, the results of WBS might be affected by the tumor size, RAI dose, and radiotracer uptake. For instance, LN metastases might not take up iodine in 20-40% of cases, even when high ^{131}I doses are applied (17, 18).

The role of US has become increasingly important in the follow-up of patients with DTC after initial treatment (19). The sensitivity of US in detecting occult masses and non-palpable neck LNs is well documented. However, despite the establishment of predictive criteria for malignancy, their precision is not sufficient to distinguish between benign (inflammatory or reactive) and metastatic or suspected LNs, even when pooled together (20). In addition, proper identification might only be achieved by a skilled and experienced operator.

The cytological analysis of FNAB samples (FNAB-C) from LNs has been widely used to confirm suspect findings on US, mainly in patients with undetectable sTg due to suppressed TSH or with a non-iodine-concentrating metastasis (19). Nevertheless, the sensitivity of this method is far from ideal, as it varies from 75 to 85% (21, 22), with a rate of false-negative results of 6 to 8% (21, 23) and a rate of up to 20% of non-representative samples or samples with

inadequate cellularity, which are a function of the cytopathologists' skill and experience (24, 25).

To improve the diagnostic performance of FNAB-C, several authors have suggested measuring Tg in the needle washout fluid (FNAB-Tg). This method was initially suggested in 1992 by Pacini and colleagues (21), who showed that high FNAB-Tg in the LNs of individuals subjected to thyroidectomy and radioablation was due to thyroid carcinoma metastasis, whereas undetectable FNAB-Tg indicated inflammatory lymphadenopathy or lymphadenopathy of non-thyroid origin. In that study, the sensitivity of FNAB-Tg was 100%, whereas the sensitivity of cytology was only 85.7%. In 1993, Lee et al. (26) reported that the combination of FNAB-C and FNAB-Tg detected a larger number of metastatic LNs than either technique alone and reached 100% sensitivity and specificity.

Several authors have performed FNAB-Tg and found that its sensitivity varied from 81.4% to 100% and its specificity from 85% to 100% (13, 21, 22, 27-39). In spite of those results, controversy remains on some issues, including the scarcity of studies validating the alleged benefit of FNAB-Tg over FNAB-C alone and the variation of the cutoff points used, which range from 0.9 to 39 ng/mL as a function of the method used in the measurement of Tg (22, 28-30), in addition to divergences related to its diagnostic performance in patients not yet subjected to thyroidectomy. Moreover, the best method of FNAB-Tg has not yet been standardized, and thus, all published studies on this topic exhibit significant differences in the techniques used to wash needles and to measure Tg, as well as the units used (ng/FNAB, ng/mL) and the interpretation of the FNAB-Tg values. In consequence, the proper role of FNAB-Tg in the follow-up of patients with DTC is still a subject of debate.

Thus, the aims of this article are to summarize the published evidence on the use of FNAB-Tg in the follow-up of individuals with DTC and to discuss the following topics: 1) the accuracy of FNAB-Tg in the detection of neck metastases in individuals subjected to or awaiting total thyroidectomy; 2) the diagnostic benefit of FNAB-Tg compared to FNAB-C alone in DTC recurrence in cervical LNs; 3) the methods reported in the literature to establish the cutoff points of FNAB-Tg, including a comparison of their diagnostic performance to detect malignancy; and 4) the differences among the techniques used to measure FNAB-Tg, including an assessment of the possible influence of technical variations on its diagnostic accuracy.

REVIEW

The European consensus for the management of patients with DTC recommends screening the patients six to 12 months after the initial treatment by means of neck US and recombinant TSH-stimulated Tg (14).

The selection of patients for FNAB must be grounded on the architecture of the investigated LN on US. The most reliable indicators of malignancy are the presence of heterogeneous hyperechogenicity compatible with microcalcifications, loss of hilum, cystic alterations, and peripheral vascularization (40). All such ultrasonographic findings exhibit strong correlations with malignant findings on postoperative histological analysis (19).

Some authors (14, 40, 41) suggest that FNAB should be performed only in cases when the smallest diameter of the LN is greater than 5 mm, as this criterion is associated with a satisfactory balance between the sensitivity and specificity of cytology alone for detection of metastatic PTC (61% and 96%, respectively) (19).

Because Pacini et al. (21) reported approximately 20 years ago that high Tg concentrations are detectable in LNs with thyroid cancer metastases, several studies have shown that the sensitivity of FNAB-Tg to detect DTC neck LN metastases is higher than the sensitivity of FNAB-C (13, 21, 22, 27-39). Frasoldati et al. (22) assessed the role of FNAB-Tg in the detection of LN metastases in patients with DTC before thyroidectomy and found a sensitivity and specificity of 78.6% and 100%, respectively. In addition, the sensitivity of combined FNAB-C and FNAB-Tg to assess neck LNs was better compared to WBS and sTg measurement. In a later study on patients with neck-recurrent DTC, those same authors showed that the diagnostic sensitivity increased from 84.8% to 95.6% when FNAB-Tg was added to cytology (42).

In 2003, Cignarelli et al. (27) showed that FNAB-Tg might also contribute to diagnosis in paucicellular samples from cystic metastases. The diagnosis in two out of the six patients with PTC cystic metastases in the neck LNs included in the study was established by FNAB-Tg but not by cytology alone.

Bournaud et al. (36) assessed 114 consecutive patients with thyroid cancer and 16 controls. The sensitivity of FNAB-Tg was 94.2% and its specificity 97.8%. As for FNAB-C, although its specificity was 100%, its sensitivity was 71%, mostly due to inadequate samples.

Salmaslıhoğlu et al. (35) compared the final histological diagnosis of 255 LNs with the results of preoperative FNAB-C and FNAB-Tg. FNAB-C failed to detect 17% of the metastatic LNs, versus 1% by FNAB-Tg. The specificity, accuracy, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of FNAB-Tg were significantly higher compared to FNAB-C.

The cystic degeneration of PTC metastatic deposits is not uncommon (43, 44), and FNAB of LNs in those cases, even with ultrasonographic guidance, might only show colloidal material, cell remnants, and macrophages, but no identifiable tumor cells. Such samples are usually classified as “nondiagnostic” or “inadequate” (45-47). In turn, FNAB-Tg has shown high sensitivity in the detection of cystic metastases when cytology is inconclusive. For instance, Cunha et al. (30) assessed 83 enlarged neck LNs from 67 patients with DTC and found that the sensitivity of FNAB-Tg was 100%, whereas cytology alone failed to diagnose nine out of the 17 patients with recurrent disease. FNAB-C alone identified only one out of six metastatic LNs with a cystic component (16.7% sensitivity).

Uruno et al. (31) studied 129 enlarged LNs from 111 patients with DTC and found that the sensitivity of FNAB-Tg and cytology was 81.4 and 78%, respectively, and that the sensitivity of FNAB-Tg for detection of cystic or mixed PTC metastases was 100%. On the whole, 36.4% of the cases classified as benign and 37.5% of the cases classified as inadequate on cytological examination were classified as malignant based on FNAB-Tg.

Snozek et al. (28) assessed 122 FNAB samples from 88 patients with a history of DTC and thyroidectomy. They found that the Tg level was 1 ng/mL or lower in 50 out of the 52 benign samples (96.2%) and higher than 1 mg/mL in all 70 malignant samples. Five (4.9%) of the 103 samples with diagnostic cytology, had discordant Tg results, and in four of these samples, FNAB-Tg was concordant with the final diagnosis. As 18 out of 19 (94.7%) cases classified as nondiagnostic or with absent cytology were correctly diagnosed by FNAB-Tg,

the authors suggested replacing FNAB-C with FNAB-Tg in the assessment of neck LN metastases.

The European consensus regarding the management of patients with DTC (14) and the Brazilian Consensus on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer (48) currently recommend combining FNAB-Tg with the cytological assessment of the FNAB samples to confirm suspected LN metastases. The American Thyroid Association (49), however, made no mention of that method in its guidelines, most likely because thyroid specialists in the United States have less experience with FNAB-Tg. The available data on the diagnostic value of FNAB-Tg were collected using several types of Tg assays, variable amounts of washout fluid, and different cutoff points to define the negative results (19). The lack of consensus regarding the recommendation of FNAB-Tg among the various international guidelines for the management of DTC is most likely due to the lack of international standards for the performance and interpretation of the technique.

Factors that might affect the accuracy of Tg assays

Measuring Tg poses one of the major challenges to laboratories due to interfering factors that might alter the test results, the lack of methodological standards, inadequate functional sensitivity, and variability in the specificity of the commercially available antibody kits. All of these factors affect the accuracy of the results and are associated with large inter-assay variation, which makes comparison among studies difficult.

The methods available to measure Tg include immunoassays, such as immunometric assay (IMA) and radioimmunoassay (RIA), in addition to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which is seldom used. The older

competition-based measurement methods using radioactive iodine tracers have progressively been replaced by the more specific and sensitive IMA, which comprises immunoradiometric (IRMA) and immunochemiluminescence assays (ICMA) (47). The IMA method allows Tg levels lower than 0.1 ng/mL to be detected, and its technical advantages include shorter incubation periods and more stable reagent antibodies (50). Historically, high between-method variability in the Tg methods has been reported (51). Inter-assay precision must always be maximized so that the interpretation of results is not compromised by changes in the reagents or the equipment calibration over the course of the patients' follow-up (51).

Coefficients of inter-assay variation of 48% for sTg values of approximately 5.0 ng/mL and 80-120% for undetectable Tg values have been reported (52). Such discrepancies are partially accounted for by the heterogeneity of human Tg and the differences in the epitope specificity of the antibodies used as reagents in the various immunoassays (53). In particular, thyroid carcinomas might secrete one predominant or various Tg isoforms, which are detected with variable intensity as a function of the antibodies and assay methods used (54).

Various guidelines and consensus statements recommend the use of kits that comply with the European standards for manufacturing Tg assays, e.g., CRM 457 (55, 56), which recommends the use of purified Tg obtained from human thyroid as the antigenic stimulus (57). Unfortunately, because many assays do not comply with that consensus, although it reduces the variability in the methods available to measure Tg, it cannot eliminate it completely (51, 54).

Additionally, the functional sensitivity is of fundamental importance in the assessment of the performance of Tg measurement kits. Performance is defined as the lowest measured Tg concentration with a coefficient of inter-assay variation equal to or lower than 20% (58), and it represents the lowest clinically relevant value detected by the test. The functional sensitivity has gradually improved since the earliest methods for Tg measurement, from 5–10 ng/mL with the older RIAs, to 0.5–0.9 ng/mL with the first-generation IMAs, and to 0.05–0.1 ng/mL with the “ultrasensitive” IMAs (59).

The functional sensitivity of a method directly influences the cutoff points. The original study by Pacini et al. (21) showed that the cutoff point, defined as the mean + two standard deviations (SD) of the FNAB-Tg value of patients with the final diagnosis of benign or malignant non-thyroid disease, was 21.7 ng/FNAB. Such a high cutoff point might be explained by the low functional sensitivity of the method used to measure Tg, which was 3 ng/mL. The greater functional sensitivity of the currently available assays accounts for the progressive reduction of the suggested diagnostic thresholds. Thus, some authors suggest that the FNAB-Tg cutoff point might be adapted to the method of Tg measurement used by each individual center (36).

Several published studies focus on methodological factors that might influence the Tg values found in the FNAB washout fluid, such as the volume and type of fluid used, procedures for sample collection, and the interference of TgAb and sTg with the FNAB-Tg values.

Needle washing

Needle washout fluid

The medium used to wash the needle used in FNAB varies among studies, from 0.9% saline solution to Tg-free serum, the standard "zero" provided in the Tg assay kit (Table 1). Saline solution is the most widely accessible and least expensive option and is therefore the most commonly used (28-30, 32-35). To compare the various types of washout fluid used in FNAB, Frasoldati et al. (22) used different needles to collect two consecutive samples from the same 10 metastatic and 10 non-malignant LNs; one needle was washed with 1.0 mL of saline solution, and the other was washed with 1.0 mL of Tg-free solution. The FNAB-Tg concentration did not differ between washouts as a function of the rinsing method.

However, the studies by Baskin et al. (15) and Snozek et al. (28) pointed out the possibility of a matrix effect when saline solution is used. The matrix effect is a type of interference that alters the reactivity of Tg with the assay antibodies due to the medium components. Snozek et al. (28) performed a recovery test after exogenous Tg overload and found that the Tg values increased by approximately 25% (varying from 100 to 140% of the expected values) when the FNAB-Tg needle was washed with saline solution. In fact, the nature of the buffer used to wash the needle might influence the protein conformation, thereby affecting the binding of antibodies, which was observed in the case of Tg when saline solution was used as a buffer (28, 29, 31, 37). Such a matrix effect might account for the high Tg levels found by some authors in benign LNs (36). Nonspecific interactions might be the cause of such interference in the measurement of Tg, as observed by Baskin et al. (15).

Therefore, although the amount of solution included in the kits is limited and its cost higher, it is preferable to saline solution, as this procedure avoids

creating a bias in the measurement of Tg in the FNAB washout fluid (36). Nevertheless, when saline solution is used for practical reasons, ruling out the presence of a matrix effect is recommended (60). To validate the use of saline solution in their study, Borel et al. (29) measured the immunoreactivity of Tg in samples of Tg-free solution, saline solution, and saline solution supplemented with 70 g/L of human serum albumin. The results showed that the immunoreactivity of Tg did not reach the assay detection threshold in any of the study samples.

Volume of washout fluid

In various studies, the volume of fluid used to rinse the FNAB needle varies from 0.5 to 3.0 mL (Table 1), and 1.0 mL is the amount most widely used (22, 29, 30, 32-34, 36, 42). That is also the amount recommended in the consensus published by Leenhardt et al. (60). Some authors suggest washing the needle several times and collecting the full amount of washout fluid in a single tube. According to Borel et al. (29), three rinses adding up to 1.0 mL of fluid suffice to collect more than 97% of the Tg present in the needle.

Sample collection

Several test tubes are commercially available, and their use in FNAB-Tg must be validated. According to Giovanella et al. (61), the different types of tubes used to store the washout fluid might be a cause of bias in the measurement of FNAB-Tg. Following US-guided FNAB of 156 LNs from 108 patients subjected to thyroidectomy and radioablation for DTC, those authors washed the needles using 1.0 mL of saline solution, which they divided homogeneously into three different types of test tubes: the plain serum tube, the

serum separator tube, and the lithium-heparin tube. The use of the serum separator or lithium heparin tubes was associated with significantly reduced FNAB-Tg compared to the plain serum tube. In addition, the measurement of FNAB-Tg from the plain serum tube and serum separator tubes had 100% sensitivity, whereas two false-negative results occurred in the samples collected in lithium heparin tubes (98% sensitivity). Thus, the serum separator tubes and the lithium-heparin tubes may decrease the measured FNA-Tg concentration, and the collection of washout fluids into plain serum tubes is recommended.

Interference by circulating thyroglobulin

Only a few studies have reported on the diagnostic value of FNAB-Tg for the LN staging of PTC before thyroidectomy (22, 32, 36, 37, 62), and their results tend to disagree.

Although Frasoldati et al. (22) found 100% specificity in the FNAB-Tg of patients awaiting thyroidectomy and Cunha et al. (30) found 100% PPV in patients before surgery, false-positive results have been reported in patients with high sTg (15, 21, 32). Indeed, Tg as high as 88.8 ng/mL has been found in benign LNs from patients awaiting surgery for thyroid cancer (32, 36) and in patients without any thyroid disease, which could lead to unnecessary surgery for many of those patients (31).

According to Sigstad et al. (37), thyroid manipulation or palpation in patients who conserve all or part of the gland might lead to Tg escaping into the lymph, resulting in false-positive LN FNAB-Tg results. The FNAB-Tg must also be avoided in the examination of the LNs close to the thyroid (e.g., paratracheal, pretracheal, and prelaryngeal LNs) before thyroidectomy, when the risk for the biopsy needle to run through the thyroid is high, resulting in elevated FNAB-Tg

independently of the presence of LN malignancy (31). Other possible explanations for the false-positive results include contamination of the LN by circulating sTg and artifacts caused by the method used for Tg detection because of nonspecific binding of the antibodies to various medium components. Such artifacts, described above as matrix effects, depend on the antibodies and the media that are used.

The data obtained by Borel et al. (29) do not support the hypothesis of sTg contamination of the LNs. According to them, even if the sample collected by FNAB was composed of blood alone, then as a function of the dilution, the rate of contamination of FNAB-Tg would be 0.2 times the sTg value, which in that study varied from 0.003 to 0.012% and was thus patently insignificant. To strengthen their argument, they further showed that FNAB-Tg was undetectable in negative controls who were not subjected to previous thyroidectomy and thus had detectable sTg. Finally, they measured FNAB albumin and showed that the contamination of FNAB-Tg by serum proteins was very low. They concluded that sTg might interfere significantly with the FNAB-Tg values only in patients with high sTg, in whom the measurement of FNAB-Tg is actually not needed because they usually exhibit evident metastases. Other authors, including Bournaud et al. (36) and Kim et al. (62), were also unable to identify any influence of the presence of the thyroid gland on the FNAB-Tg values and found that this test has high sensitivity, specificity, and accuracy in the staging of LNs before thyroidectomy.

In a large-scale study conducted by Kim et al. (32), FNAB-Tg performed before surgery showed less sensitivity and accuracy relative to five assessed cutoff points compared to the measurement after thyroidectomy. According to

Sohn et al. (34), it is not yet clear whether the interference of sTg on low or medium FNAB-Tg levels is negligible because the patients assessed by Borel et al. exhibited high FNAB-Tg; thus, the solution to this issue requires more thorough analysis.

Several cutoff points have been suggested for FNAB-Tg before thyroidectomy. According to some authors, who believe in the hypothesis of contamination by circulating Tg, different diagnostic thresholds ought to be established for patients who have undergone thyroidectomy and those awaiting thyroidectomy, whereas others recommend the adoption of a single cutoff point for both categories of patients. According to Borel et al. (29), any detectable level of FNAB-Tg in the neck LNs of patients without elevated sTg is associated with the presence of thyroid cells. That hypothesis is strengthened by the recent result that single FNAB-Tg cutoff points as low as 0.93 ng/mL correctly identified the LNs with DTC metastases (36).

Interference by anti-thyroglobulin antibodies (TgAb)

Doubtlessly, interference from circulating TgAb is the most serious technical complication that hinders the use of sTg as a marker of DTC recurrence (13, 16).

As the methods used to measure FNAB-Tg and sTg are the same, the possible interference of TgAb with FNAB-Tg values was taken into consideration (22, 42) until Boi et al. (13) showed the absence of any significant interaction between the TgAb and the Tg level measured in the neck LNs of patients with DTC, even in those with TgAb detectable inside the LNs, by either active synthesis or blood contamination. Although those authors reported that the presence of TgAb in the samples could result in underestimation of the

FNAB-Tg level, such interference actually exerted a small effect on the diagnostic performance of the test because the FNAB-Tg level in the washout fluid that contained TgAb was much higher than the selected cutoff point in all the evaluated cases (13).

Approximately two years earlier, Baskin et al. (15) reported on the lack of difference in the sensitivity and specificity for the detection of LN metastases between patients with and without serum TgAb. However, the small number of cases assessed in that study precluded any strong conclusion.

The reduced interference of TgAb with FNAB-Tg results compared to the interference exerted on the sTg measurements could be explained by the dilution of samples (most likely being 1:50 or higher) (37); elevated Tg concentrations in the washout fluid, which overcome the interference by saturating the TgAb-binding sites; or the absence or scarcity of TgAb inside the LNs (13).

In 2007, Sigstad et al. (37) studied the role of possible TgAb interference and found that those antibodies were absent in the FNAB washout fluid of individuals with positive serum TgAb and no or low FNAB-Tg. The absence of TgAb inside the LNs was also reported by other authors (13, 29, 37, 63).

According to Boi et al. (13), although one cannot rule out the possibility that the presence of TgAb in the FNAB washout fluid will sometimes hinder the detection of Tg in metastatic LNs, this phenomenon was not observed in their large case-series, and thus its frequency might be very low.

In turn, Cappelli et al. (64) recently observed a shift from undetectable to detectable FNAB-Tg in suspected LN metastases on US or WBS following recombinant human (rh)TSH stimulation in two patients with detectable serum

TgAb. Those authors believe that in such patients, the presence of TgAb fully prevented the measurement of Tg in the FNAB washout fluid and that the Tg in the LNs increased to levels sufficient to saturate all the TgAb-binding sites, and thus became detectable, only after stimulation with rhTSH, a possibility that had been suggested previously. As the presence of TgAb in the FNAB washout fluid of the LNs was not assessed because it is not recommended by most authors and because of the lack of histological data, that hypothesis could not be confirmed.

Zanella et al. (39) assessed the influence of serum TSH on the FNAB-Tg levels of patients without evidence of LN metastases on cytology who were undergoing levothyroxine-suppressive therapy (TSH = 0.07 mIU/mL) or were hypothyroid in order to measure a stimulated sTg (TSH = 82.2 mIU/mL). According to those authors, there was no significant difference in the median FNAB-Tg value between groups (3.3 ng/mL vs. 3.8 ng/mL, respectively), which suggests a lack of interference of serum TSH on the FNAB-Tg measurements.

Cutoff points for measuring thyroglobulin in the washout fluid of fine-needle aspiration biopsy

Although the diagnostic performance of FNAB-Tg is well established, its cutoff points remain controversial. A wide variety of possible diagnostic thresholds ranging from 0.9 to 39.3 ng/mL have been described in the literature (Table 2), but it is not yet clear whether the same cutoff point ought to be used before and after thyroidectomy and for patients with high sTg. The major hindrances to the definition of one specific cutoff point for FNAB-Tg are the variety of available measuring kits and the different techniques and volumes of fluid used to wash the FNAB syringes. In some studies, the cutoff point was

defined as the mean + 2 SD of the FNAB-Tg level of patients with negative cytology (15, 21, 27). Other authors established the cutoff point based on the comparison of the FNAB-Tg and sTg levels, whereby the LNs were considered metastatic when the former was higher than the latter (31, 33, 37, 62), which rules out the possibility of contamination by the circulating Tg. Cunha et al. (30) defined the cutoff point as the functional sensitivity of the Tg assay. In other studies, the cutoff point was established based on the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve that best represented the relationship between the sensitivity and specificity of the analysis (32, 34-36). Boi et al. (13) used the highest FNAB-Tg value found in benign LNs that showed ultrasonographic regression in six to 12 months as the cutoff point.

Due to ethical reasons, the patients with benign cytology are not usually subjected to surgery. Thus, in some studies, the cutoff point was based on the FNAB-C results. Nevertheless, cytology could not be used as a gold standard to define the cutoff point of FNAB-Tg because the aim of the studies was to compare the diagnostic performance of both procedures (36).

The use of the sTg value as the cutoff point for FNAB-Tg might be difficult in patients awaiting surgery because most consensus statements do not recommend measurement of sTg in such patients. In addition, the blood samples for sTg measurements and FNAB-Tg must be collected simultaneously because the sTg values vary over the course of days to weeks and might thus distort the data. It is also worth keeping in mind that in the presence of TgAb, the sTg level might be higher than the level actually measured by most available assays (13, 15).

Some authors (13, 15, 32) express FNAB-Tg results as nanograms/milliliter (or micrograms/liter), while others (21, 27, 29, 36) use the unit nanograms/punction (Table 2). According to some authors, the unit nanograms/punction better represents the test, as it reflects the dilution of the Tg left in the needle, whereas nanograms/milliliter might mislead the reader into believing that FNAB-Tg reflects the true concentration of Tg in the LN. Conversely, some authors assert that nanograms/milliliter allows for the comparison of the FNAB-Tg and sTg levels, which is important for decision-making regarding surgical excision of the LNs when the FNAB-Tg cutoff point is defined as the patient's sTg level.

Such differences in the reporting of values, the lack of standardization of the commercially available Tg kits, the heterogeneity of control groups or "negative" patients, and the fact that some authors studied patients subjected to thyroidectomy while others focused on patients awaiting surgery make it difficult to compare published data.

Due to their belief in the possible interference of sTg with FNAB-Tg, some authors suggest establishing different diagnostic thresholds for patients before and after thyroidectomy (13, 22, 35). Frasoldati et al. (22) defined the FNAB-Tg cutoff point as the 97.5th percentile of the FNAB-Tg levels of LNs with negative FNAB-C. In the patients awaiting surgery, that value was 39.3 ng/mL, compared with 1.1 ng/mL among those already subjected to thyroidectomy; the sensitivity and specificity, calculated based on patients with histological confirmation, were 84.0% and 95.4%, respectively. Boi et al. (13) defined as the cutoff point the highest FNAB-Tg value found in benign LNs (on histological examination or a combination of reactive FNAB-C and ultrasonographic

regression in six to 12 months), which was 36 ng/mL among the patients awaiting surgery and 1.7 ng/mL among the patients subjected to thyroidectomy, with sensitivity and specificity of 100%.

Other studies applied a single threshold to FNAB-Tg independently of the status of patients regarding thyroidectomy (30, 31-33, 36, 37, 62). Cunha et al. (30) selected the functional sensitivity of the method they used to measure Tg (0.9 ng/mL) as the cutoff point of FNAB-Tg, which resulted in 100% sensitivity in both groups and 100% specificity in the group of patients subjected to surgery. To rule out the possibility of contamination by circulating Tg, other studies (31, 33, 37, 62) used the sTg level as the cutoff point for FNAB-Tg. In the study by Kim et al. (62), the sensitivity and specificity were calculated based on the patients with histological confirmation, and the values found were 95% and 90.9%, respectively, before surgery and 80% and 100% after surgery. Bournaud et al. (36) and Kim et al. (32) suggest using an unique and simple threshold. This suggestion agrees with the current guidelines, which do not recommend the measurement of sTg in patients with thyroid cancer who are awaiting surgery. In those two studies, the cutoff point was established based on ROC curve analysis.

Independently of the values found, the sensitivity levels reported by the various authors have been similar (84–100% when different cutoff points are established for measurements before and after surgery versus 81–100% when a single cutoff point is used). Nevertheless, one might expect a lower number of false-positive results in the assessment after surgery due to the lack of thyroid tissue and sTg suppression (32).

The issues related to the cutoff point were recently addressed by Kim et al. (32), Bournaud et al. (36), and Sohn et al. (34), who each measured Tg in suspicious LNs using the same ultrasensitive immunoradiometric assay based on monoclonal antibodies. Kim et al. (32) studied 168 patients with PTC and neck LNs considered to be potentially malignant on US before and after surgery. The FNAB-Tg results were interpreted based on five different cutoff points (1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, the patient's sTg level, and mean + 2 SD of the FNAB-Tg level found in LNs shown not to be metastatic on histological examination, which was equal to 32 ng/mL) and compared to the final diagnosis as established by histological examination, TSH stimulated-Tg measurement, and US follow-up. The authors suggested using the sTg level, 10 ng/mL, or mean + 2 SD of the results of negative patients as the cutoff point for FNAB-Tg, as these criteria exhibited high sensitivity and accuracy in addition to similar diagnostic performance. Using these cutoff points, the sensitivity varied from 88.2 to 90.8%, specificity from 84.2 to 89.8%, PPV from 93.9 to 95.6%, NPV from 74.4 to 80.0%, and accuracy from 88.0 to 90.5%.

According to these authors, dissection of the neck LNs must be strongly recommended when the FNAB-Tg is ≥ 100 ng/mL, as no false-positive results have yet been reported at such levels, and merely suggested when Tg is > 10 ng/mL, Tg is $> \text{sTg}$, or Tg is $> \text{mean} + 2 \text{ SD}$ of the level of negative patients. Nevertheless, when the FNAB-Tg is < 1 ng/mL with a negative FNAB-C, a follow-up study should be considered, and when the Tg ranges from 1 to 10 ng/mL, the decision about LN dissection must be made based on the clinical and US findings. All five studied cutoff points were more sensitive and accurate in the assessment before than after thyroidectomy.

In the study by Bournaud et al. (36), 114 patients with thyroid cancer before surgery (n = 13) or throughout follow-up (n = 93) and 16 controls were subjected to FNAB-Tg and FNAB-C. The negative control group comprised 16 individuals with non-thyroid cancers, who exhibited 16 enlarged LNs suspected of metastasis on US performed during follow-up. The sensitivity and specificity of FNAB-Tg and FNAB-C were established for different cutoff points within a range of 0.24-32.60 ng/FNAB by means of ROC curve analysis. The LNs were classified as benign or malignant based on their histological features or, in the patients not subjected to surgery, on the scintigraphy findings and 12-month minimum follow-up. The most adequate cutoff point for diagnosis of LN metastases of thyroid cancer in that study was 0.93 ng/FNAB, which was slightly above the functional sensitivity of the method used to measure Tg. Using that cutoff point, sensitivity was 94.2%, specificity 97.8%, PPV 98.0%, and NPP 93.7%. The use of the method's functional sensitivity as the cutoff point, as suggested by Cunha et al. (27), which in the study by Bournaud et al. was 0.69 ng/mL (36), would have resulted in a similar sensitivity but lower specificity compared to the cutoff point of 0.93 ng/FNAB. Previous studies that used low cutoff points in the assessment of FNAB-Tg also reported excellent performance, with few false-positive or -negative results (13, 15, 28, 30). The adoption of a higher cutoff point in the study by Bournaud et al. (36), as suggested by some authors, could have resulted in the absence of false-positive results but would have increased the number of false-negative samples, leading to a significant reduction of the sensitivity (86.5% for the cutoff point of 4.95 ng/FNAB). In that series, the results of the 29 samples of the controls and

patients awaiting surgery were similar to each other, as were the results of the 93 samples collected after thyroidectomy.

To compare the frequency of metastatic and non-metastatic LNs diagnosed by means of FNAB-C and FNAB-Tg in a group of patients in whom the relationship between the FNAB-Tg level and malignancy is not yet well established, Sohn et al. (34) studied 691 consecutive patients with neck LNs bearing traits on US compatible with metastases of PTC. A total of 95 LNs with histological confirmation were included in the study, corresponding to patients with FNAB-Tg values of 0.2-100 ng/mL, because above 100 ng/mL, no false-negative results have been reported. The diagnostic performances of multiple Tg levels (0.7 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, and 50 ng/ml) were evaluated, and the best diagnostic performance was recorded using 5.0 ng/mL: the area under the curve (AUC) was 0.76 (95% confidence interval [CI]: 0.6731-0.8476) and the sensitivity, specificity, accuracy, PPV, and NPV were 69.0%, 83.0%, 76.8%, 76.3%, and 77.2%, respectively. However, that cutoff point did not exhibit a significant difference in the sensitivity, specificity, accuracy, PPV, NPV, or AUC compared to 10.0 and 20.0 ng/mL. The cutoff points 0.7, 1.0, and 50 ng/mL were not recommended due to their low sensitivity and AUC. Among the 78 cases with negative cytology, 25 (32%) were confirmed to be metastases on the final diagnosis and exhibited FNAB-Tg varying from 0.22 to 88.34 ng/mL. Although seven cases were classified as negative with all six analyzed FNAB-Tg cutoff points, 13 cases (52%) were identified as positive when a cutoff point of 10 ng/mL was applied, 15 cases (60%) with the cutoff point 5 ng/mL, 18 cases (72%) with the combined cutoff points 0.7 and 1.0 ng/mL, and eight cases (32%) with all six cutoff points.

A large prospective study was recently published, in which 255 neck LNs of 225 patients with neck LN metastases or PTC recurrence (35) were assessed by FNAB-C and FNAB-Tg. The final diagnosis, based on histological examination, was compared to the FNAB-C and FNAB-Tg values before surgery. When the FNAB-Tg cutoff point was established as 1 ng/mL, 200 metastatic LNs were correctly diagnosed, but the method failed to diagnose 55 LNs. The sensitivity, specificity, and diagnostic accuracy of FNAB-Tg (cutoff point = 1 ng/mL) for diagnosis of metastases of thyroid carcinoma before surgery were 100%, 0%, and 78%, respectively. The PPV and NPV were 78% and 0%, respectively. The cutoff point of FNAB-Tg with the best sensitivity and specificity on ROC curve analysis was 28.5 ng/mL, as 253 metastatic LNs were correctly diagnosed and only two were misdiagnosed using that cutoff point. The sensitivity, specificity, and accuracy of FNAB-Tg (cutoff point = 28.5 ng/mL) for diagnosis of metastases of thyroid carcinoma before surgery were 100%, 96%, and 99%, respectively. The PPV and NPV were 99%, and 100%, respectively.

SUMMARY

FNAB-Tg is simple to perform, is low cost, and improves the diagnostic performance of cytology in the early detection of LN metastases of DTC. This technique allows diagnosis even in cases of paucicellular samples (metastatic deposits with degeneration and a cystic component) and cases in which cytology fails to provide a diagnosis, and it is not affected by TgAb, is reliable in the case of very small lesions, and exhibits high diagnostic accuracy.

Because the current Tg methods are highly variable, they cannot be used interchangeably to manage patients with DTC (51). Therefore, it is

recommended that the measurements of sTg and FNAB-Tg levels be systematically performed using the same method, and assay and that they should be included in the clinical laboratory report in the patient's medical record.

In the case of patients treated with ^{131}I , the interval between treatment and FNAB-Tg must be sufficient (more than three months) to allow the definitive destruction of the metastatic LN (57), otherwise, FNAB-Tg might produce false-positive results. It is also not recommended to measure FNAB-Tg in masses found in the thyroid bed, because this test is unable to distinguish thyroid tissue remnants from cancer recurrence.

The diagnostic performance of FNAB-Tg is not affected by the presence of thyroid tissue. Therefore, it might be used for screening LN metastases in patients subjected to thyroidectomy, as well as to perform LN staging in patients with DTC who have not yet undergone initial surgery.

CONCLUSION

Measuring Tg in the FNAB washout fluid exhibits some advantages over cytology. The combination of FNAB-Tg and FNAB-C is recommended for the staging and follow-up of patients with DTC and suspected neck LNs.

FNAB-Tg measurements must be performed using the same methods as are used for the measurement of sTg levels. Washing the needle with the Tg-free serum provided in the Tg assay kit is preferable to washing with normal saline solution, and the use of 1 mL volume of washout fluid, which should be stored in plain serum tubes, is recommended. Although the cutoff point for the FNAB-Tg values has not yet been definitively established, values above 10

ng/ml are recommended for identifying neck LN dissection, as they showed high sensitivity and accuracy for the diagnosis of DTC metastases in the neck LNs in several studies.

Author Disclosure Statement: No competing financial interests exist.

Corresponding Author: Maria Roseneide dos Santos Torres, MD, Department of Endocrinology and Diabetes, Federal University of Campina Grande. Address: 750, Francisco Lobo Filho St, 602 apt, Zip Code: 58410183, Campina Grande, Paraíba, Brazil. Telephone number: 55 (83) 88405391. E-mail: rosetorres.maria@gmail.com

REFERENCES

1. Kent WD, Hall SF, Isotalo PA, Houlden RL, George RL, Groome PA 2007 Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. *CMAJ* 177:1357–1361.
2. Davies L, Welch HG 2006 Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA* 295:2164–2167.
3. Colonna M, Guizard AV, Schvartz C, Velten M, Raverdy N, Molinie F, Delafosse P, Franc B, Grosclaude P 2007 A time trend analysis of papillary and follicular cancers as a function of tumour size: a study of data from six cancer registries in France (1983–2000). *Eur J Cancer* 43:891–900.
4. Elisei R, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Masserini L, Ceccarelli C, Lippi F, Grasso L, Basolo F, Bevilacqua G, Miccoli P, Coscio G, Vitti P, Pacini F, Pinchera A 2010 Have the clinical and pathological features of differentiated thyroid carcinoma really changed over the last 35 years? Study on 4187 patients from a single Italian institution to answer this question. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1516–1527.
5. Pacini F 2012 Changing natural history of differentiated thyroid cancer. *Endocrine*. Epub. Jun 27.
6. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2013*. Atlanta: American Cancer Society; 2013. Available at <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf> Accessed June 14, 2013.

7. Enewold L, Zhu K, Ron E, Marrogi AJ, Stojadinovic A, Peoples GE, Devesa SS 2009 Rising thyroid cancer incidence in the United States according to demographic and tumor characteristics, 1980–2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:784–791.
8. Schuff KG 2011 Management of recurrent/persistent papillary thyroid carcinoma: efficacy of the surgical option. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2038–2039.
9. Mazzaferri EL, Kloos RT 2001 Clinical review 128: current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1447–1463.
10. Kelemen PR, Van Herle AJ, Giuliano AE 1998 Sentinel lymphadenectomy in thyroid malignant neoplasms. *Arch Surg* 133:288-92.
11. Sakorafas GH, Sampanis D, Safioleas M 2010 Cervical lymph node dissection in papillary thyroid cancer: current trends, persisting controversies, and unclarified uncertainties. *Surg Oncol* 19:57–70.
12. Dzodic R, Markovic I, Inic M, Jokic N, Djurasic I, Zegarac M Pupic G, Milovanovic Z, Jovic V, Jovanovic N 2006 Sentinel lymph node biopsy may be used to support the decision to perform modified radical neck dissection in differentiated thyroid carcinoma. *World J Surg* 30:841-6.
13. Boi F, Baghino G, Atzeni F, Lai ML, Faa G, Mariotti S 2006 The diagnostic value for differentiated thyroid carcinoma metastases of thyroglobulin (Tg) measurement in washout fluid from fine-needle aspiration biopsy of neck lymph

nodes is maintained in the presence of circulating anti-Tg antibodies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91:1364–1369.

14. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W 2006 European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 154:787–803.

15. Baskin HJ 2004 Detection of recurrent papillary thyroid carcinoma by thyroglobulin assessment in the needle washout by fine-needle aspiration of suspicious lymph nodes. *Thyroid* 14:959-63.

16. Spencer CA 2004 Challenges of serum thyroglobulin (Tg) measurement in the presence of Tg autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3702–3704.

17. Schlumberger M, Mancusi F, Baudin E, Pacini F 1997 131I therapy for elevated thyroglobulin levels. *Thyroid* 7:273-6.

18. Maxon HR 1999 Detection of residual and recurrent thyroid cancer by radionuclide imaging. *Thyroid* 9:443-6.

19. Costante G, Filetti S 2009 Thyroglobulin in fine-needle aspirate: a clue to metastasis? *Nat Rev Endocrinol* 5:249-50.

20. Dessler A, Rappaport Y, Blank A, Marmor S, Weiss J, Graif M 2003 Cystic appearance of cervical lymph nodes is characteristic of metastatic papillary thyroid carcinoma. *J Clin Ultrasound* 1:21-5.

21. Pacini F, Fugazzola L, Lippi F, Ceccarelli C, Centoni R, Miccoli P, Elisei R, Pinchera A 1992 Detection of thyroglobulin in fine-needle aspirates of

nonthyroidal neck masses: a clue to the diagnosis of metastatic differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 74:1401–4.

22. Frasoldati A, Toschi E, Zini M, Flora M, Caroggio A, Dotti C, Valcavi R 1999 Role of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration biopsies of cervical lymph nodes in patients with differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 9:105–11.

23. Franklin WA, Mariotti S, Kaplan D, DeGroot LJ 1982 Immunofluorescence localization of thyroglobulin in metastatic thyroid cancer. *Cancer* 50:939–945.

24. Orija IB, Hamrahian AH, Reddy SS 2004 Management of nondiagnostic thyroid fine-needle aspiration biopsy: survey of endocrinologists. *Endocr Pract* 10:317–323.

25. Florentine BD, Staymates B, Rabadi M, Barstis J, Black A 2006 The reliability of fine-needle aspiration biopsy as the initial diagnostic procedure for palpable masses: a 4-year experience of 730 patients from a community hospital-based outpatient aspiration biopsy clinic. *Cancer* 107:406–416

26. Lee MJ, Ross DS, Mueller PR, Daniels GH, Dawson SL, Simeone JF 1993 Fine-needle biopsy of cervical lymph nodes in patients with thyroid cancer: A prospective comparison of cytopathologic and tissue marker analysis. *Radiology* 187:851-854.

27. Cignarelli M, Ambrosi A, Marino A, Lamacchia O, Campo M, Picca G, Giorgino F 2003 Diagnostic utility of thyroglobulin detection in fine-needle aspiration of cervical cystic metastatic lymph nodes from papillary thyroid cancer with negative cytology. *Thyroid* 13:1163–1167.

28. Snozek CL, Chambers EP, Reading CC, Sebo TJ, Sistrunk JW, Singh RJ, Grebe SK 2007 Serum thyroglobulin, high-resolution ultrasound, and lymph node thyroglobulin in diagnosis of differentiated thyroid carcinoma nodal metastases. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92:4278–4281.
29. Borel AL, Boizel R, Faure P, Barbe G, Boutonnat J, Sturm N, Seigneurin D, Bricault I, Caravel JP, Chaffanjon P, Chabre O 2008 Significance of low levels of thyroglobulin in fine needle aspirates from cervical lymph nodes of patients with a history of differentiated thyroid cancer. *European Journal of Endocrinology* 158:691–698.
30. Cunha N, Rodrigues F, Curado F, Ilhéu O, Cruz C, Naidenov P, Rascão MJ, Ganho J, Gomes I, Pereira H, Real O, Figueiredo P, Campos B, Valido F 2007 Thyroglobulin detection in fine-needle aspirates of cervical lymph nodes: a technique for the diagnosis of metastatic differentiated thyroid cancer. *European Journal of Endocrinology* 157:101–107.
31. Uruno T, Miyauchi A, Shimizu K, Tomoda C, Takamura Y, Ito Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Amino N, Kuma K 2005 Usefulness of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration biopsy specimens for diagnosing cervical lymph node metastasis in patients with papillary thyroid cancer. *World Journal of Surgery* 29:483–485.
32. Kim MJ, Kim EK, Kim BM, Kwak JY, Lee EJ, Park CS, Cheong WY, Nam KH 2009 Thyroglobulin measurement in fine-needle aspirate washouts: the criteria for neck node dissection for patients with thyroid cancer. *Clin Endocrinol* 70:145–151.

33. Jeon SJ, Kim E, Park JS, Son KR, Baek JH, Kim YS, Park do J, Cho BY, Na DG 2009 Diagnostic benefit of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration for diagnosing metastatic cervical lymph nodes from papillary thyroid cancer: correlations with US features. *Korean J Radiol* 10:106-11.
34. Sohn YM, Kim MJ, Kim EK, Kwak JY 2012 Diagnostic performance of thyroglobulin value in indeterminate range in fine needle aspiration washout fluid from lymph nodes of thyroid cancer. *Yonsei Med J* 53:126-31.
35. Salmaslıhoğlu A, Erbil Y, Cıtlak G, Ersöz F, Sarı S, Olmez A, Tunacı M, Yılmazbayhan D, Colak N, Ozarmağan S 2011 Diagnostic value of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration biopsy for detecting metastatic lymph nodes in patients with papillary thyroid carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 396:77-81.
36. Bournaud C, Charrié A, Nozières C, Chikh K, Lapras V, Denier ML, Paulin C, Decaussin-Petrucci M, Peix JL, Lifante JC, Cornu C, Giraud C, Orgiazzi J, Borson-Chazot F 2010 Thyroglobulin measurement in fine-needle aspirates of lymph nodes in patients with differentiated thyroid cancer: a simple definition of the threshold value, with emphasis on potential pitfalls of the method. *Clin Chem Lab Med* 48:1171-7.
37. Sigstad E, Heilo A, Paus E, Holgersen K, Grøholt KK, Jørgensen LH, Bogsrud TV, Berner A, Bjørø T 2007 The usefulness of detecting thyroglobulin in fine-needle aspirates from patients with neck lesions using a sensitive thyroglobulin assay. *Diagn Cytopathol* 35:761-7.

38. Biscolla RPM, Ikejiri ES, Mamone MC, Nakabashi CCD, Andrade VP, Kasamatsu TS, Crispim F, Chiamolera MI, Andreoni DM, Camacho CP, Hojaij FC, Vieira JGH, Furlanetto RP, Maciel RMB 2007 Diagnóstico de Metástases de Carcinoma Papilífero de Tiróide Através da Dosagem de Tiroglobulina no Líquido Obtido da Lavagem da Agulha Utilizada na Punção Aspirativa [Diagnosis of Metastases in Patients With Papillary Thyroid Cancer by the Measurement of Thyroglobulin in Fine Needle Aspirate]. *Arq Bras Endocrinol Metab* 51:419-425.
39. Zanella AB, Meyer EL, Balzan L, Silva AC, Camargo J, Migliavacca A, Guimarães JR, Maia AL 2010 Thyroglobulin measurements in washout of fine needle aspirates in cervical lymph nodes for detection of papillary thyroid cancer metastases. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54:550-4.
40. Leboulleux S, Girard E, Rose M, Travagli JP, Sabbah N, Caillou B, Hartl DM, Lassau N, Baudin E, Schlumberger M 2007 Ultrasound criteria of malignancy for cervical lymph nodes in patients followed up for differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3590–3594.
41. Frates MC, Benson CB, Charboneau JW, Cibas ES, Clark OH, Coleman BG, Cronan JJ, Doubilet PM, Evans DB, Goellner JR, Hay ID, Hertzberg BS, Intenzo CM, Jeffrey RB, Langer JE, Larsen PR, Mandel SJ, Middleton WD, Reading CC, Sherman SI, Tessler FN 2005 Management of thyroid nodules detected at Us: society of Radiologists in Ultrasound consensus conference statement. *Radiology* 237:794–800.

42. Frasoldati A, Pesenti M, Gallo M, Caroggio A, Salvo D, Valcavi R 2003 Diagnosis of neck recurrences in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer* 97:90-6.
43. García-Pascual L, Barahona MJ, Balsells M, del Pozo C, Anglada-Barceló J, Casalots-Casado J, Veloso E, Torres J 2011 Complex thyroid nodules with nondiagnostic fine needle aspiration cytology: histopathologic outcomes and comparison of the cytologic variants (cystic vs. acellular). *Endocrine* 39:33–40.
44. Alexander EK, Herring JP, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Cibas ES, Marqusee E 2002 Assessment of nondiagnostic ultrasound-guided fine needle aspirations of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4924–4927.
45. Maia FF, Matos PS, Pavin EJ, Vassallo J, Zantut-Wittmann DE 2011 Value of repeat ultrasound-guided fine-needle aspiration in thyroid nodule with a first benign cytologic result: impact of ultrasound to predict malignancy. *Endocrine* 40:290–296.
46. García-Pascual L, Balsells M, Fabbi M, Pozo CD, Valverde MT, Casalots J, González-González JM, Veloso E, Anglada-Barceló J 2011 Prognostic factors and follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma with false negative or nondiagnostic FNAC before surgery. Comparison with a control group. *Endocrine* 40:423–431.
47. Georges A, Corcuff J-B, Brossaud J, Bordenave L 2012 Particularités méthodologiques et interprétation du dosage de thyroglobuline sérique [Methodological peculiarities and interpretation of serum thyroglobulin measurements]. *Medecine Nucleaire* 36:24-28.

48. Maia AL, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RMB, Maciel LMZ, Rosário PW, Vaisman M 2007 Nódulos de tireóide e câncer diferenciado de tireóide: consenso brasileiro [Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: Brazilian consensus]. *Arq Bras Endocrinol Metab* 51:867-893.
49. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM 2009 Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 19:1167-214.
50. Hoofnagle A, Wener MH 2006 Serum thyroglobin: a model of immunoassay imperfection. *CLI Lab Technology* 8:12-14.
51. Spencer CA, Bergoglio LM, Kazarosyan M, Fatemi S, LoPresti JS 2005 Clinical impact of thyroglobulin (Tg) and Tg autoantibody method differences on the management of patients with differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5566–5575.
52. Zucchelli GC, Pilo A, Massini S, Prontera C, Ferdeghini M 1996 Large between-laboratory variability of thyroglobulin immunoassays: data collected in a collaborative study. *J Clin Ligand Assay* 19:234–8.
53. Whitley RJ, Ain KB 2004 Thyroglobulin: a specific serum marker for the management of thyroid carcinoma. *Clin Lab Med* 24:29–47.
54. Lee JI, Kim JY, Choi JY, Kim HK, Jang HW, Hur KY, Kim JH, Kim KW, Chung JH, Kim SW 2010 Differences in serum thyroglobulin measurements by

3 commercial immunoradiometric assay kits and laboratory standardization using Certified Reference Material 457 (CRM-457). *Head Neck* 32:1161-6.

55. 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 1996 Human thyroglobulin reference material (CRM: Assessment of homogeneity, stability and immunoreactivity. *Ann Biol Clin (Paris)* 54:337–342.

56. 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, DeVijlder JJ 1996 Human thyroglobulin reference material (CRM 457). 2nd Part: Physicochemical characterization and certification. *Ann Biol Clin (Paris)* 54:343–348.

57. Anne Charrié 2012 The Thyroglobulin: A Technically Challenging Assay for a Marker of Choice During the Follow-Up of Differentiated Thyroid Cancer. In: Ward LS (ed), *Thyroid and Parathyroid Diseases - New Insights into Some Old and Some New Issues*. Available at: <http://www.intechopen.com/books/thyroid-and-parathyroid-diseases-new-insights-into-some-old-and-some-new-issues/the-thyroglobulin-a-technically-challenging-assay-for-a-marker-of-choice-during-the-follow-up-of-dif>. Accessed November 15, 2012.

58. Iervasi A, Iervasi G, Carpi A, Zucchelli GC 2006 Serum thyroglobulin measurement: clinical background and main methodological aspects with clinical impact. *Biomed Pharmacother* 60:414–24.

59. Spencer C, Fatemi S, Singer P, Nicoloff J, Lopresti J 2010 Serum Basal thyroglobulin measured by a second-generation assay correlates with the recombinant human thyrotropin-stimulated thyroglobulin response in patients treated for differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 20:587–95.
60. Leenhardt L, Borson-Chazot F, Calzada M, Carnaille B, Charrié A, Cochand-Priolet B, Cao CD, Leboulleux S, Le Clech G, Mansour G, Menegaux F, Monpeyssen H, Orgiazzi J, Rouxel A, Sadoul JL, Schlumberger M, Tramalloni J, Tranquart F, Wemeau JL 2011 Good practice guide for cervical ultrasound scan and echo- guided techniques in treating differentiated thyroid cancer of vesicular origin. *Ann Endocrinol* 72:173-97.
61. Giovanella L, Ceriani L, Suriano S, Crippa S 2009 Thyroglobulin measurement on fine-needle washout fluids: Influence of sample collection methods. *Diagn Cytopathol* 37:42-4.
62. Kim DW, Jeon SJ, Kim CG 2012 Usefulness of thyroglobulin measurement in needle washouts of fine-needle aspiration biopsy for the diagnosis of cervical lymph node metastases from papillary thyroid cancer before thyroidectomy. *Endocrine* 42:399-403.
63. Alfayate R, López A, Mauri M, Serrano S, Gil S, De la Iglesia P, et al. 2009 Determinación de tiroglobulina en líquido de punción aspiración con aguja fina (PAAF) de adenopatías cervicales para diagnóstico de metástasis en cáncer diferenciado de tiroides [Determination of thyroglobulin levels in fine-needle aspiration biopsy (FNAB) washout fluid of neck adenopathies for diagnosing differentiated thyroid cancer metastases]. *Endocrinol Nutr* 56:52-3.

64. Cappelli C, Pirola I, De Martino E, Gandossi E, Cimino E, Samoni F, Agosti B, Rosei EA, Casella C, Castellano M 2013 Thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration biopsy of metastatic lymph nodes after rhTSH stimulation. *Head Neck* 35:E21-3.

Table 1 Review of the different methods of measuring Tg by fine-needle aspiration biopsy.

	Numbers of patients/lymph nodes	Tg measurement method (kit)	Needle (gauge)	Volume and type of washing fluid	Unit *
Boi et al. (13)	73/-	Immunoradiometric (CIS Bio International) or chemiluminescent immunometric (Immulite 2000 – automatic immunoassay analyzer, Siemens)	22-25	Tg-free serum 0.5 ml	ng/ml
Pacine et al. (21)	35/-	Immunoradiometric (Sorin)	21	Tg-free serum** 0.5 ml	ng/FNAB
Frasoldati et al. (22)	130/216	Immunoradiometric (Radim)	22-23 spinal needle	Tg-free serum or saline solution 1 ml	ng/ml
Snozek et al. (28)	88/122	Automatic immunoassay analyzer DXI (Beckman Coulter) or Immulite 2000 automatic immunoassay analyzer (Siemens)	25	Saline solution 0.5-1 ml	ng/ml
Borel et al. (29)	34/53	Immunoradiometric (CIS Bio International)	22 BD spinal® or 23 BD <i>Micro lance 3</i> ®	Saline solution 1 ml	ng/ml
Cunha et al. (30)	67/83	Chemiluminescent immunometric (Immulite 2000, Euro/DPC Ltd)	22 or 25	Saline solution 1 ml	ng/ml
Urano et al. (31)	111/129	–	22	Saline solution 0.5 ml	ng/ml
Kim et al. (32)	168/168	Immunoradiometric (CIS Bio International)	23	Saline solution 1 ml	ng/ml
Jeon et al. (33)	47/76	–	21-23	Saline solution 1 ml	ng/ml
Sohn et al. (34)	92/95	Immunoradiometric (CIS Bio International)	23	Saline solution 1 ml	ng/ml
Salmashöglu et al. (35)	225/255	Immunoradiometric (CIS Bio International)	–	Saline solution 3 ml	ng/ml

Bornaud et al. (36)	89/122	Immunoradiometric (CIS Bio International)	27	Tg-free serum 1 ml	ng/FNAB
Sigstad et al. (37)	145/256	Immunofluorometric	25 or 27	Tg-free serum or saline solution 0.5 ml	ng/ml
Biscolla et al. (38)	32/44	Immunofluorometric (Delphia)	—	Saline solution 1 ml	ng/ml
Zanella et al. (39)	43/43	Electrochemiluminescence (Modular E-170 Roche)	22-25	Saline solution 1 ml	ng/ml
Giovanella et al. (61)	108/156	Immunoradiometric DYNO test Tg-plus, (BRAHMS Diagnostica GmbH)	—	Saline solution 1 ml	ng/ml
Kim et al. (62)	68/91	Immunoradiometric (CIS Bio International)	21-23	Saline solution 0.5 ml	ng/ml

FNAB, fine-needle aspiration biopsy. *Unit used to express the results of the measurement of thyroglobulin in the washout fluid of fine-needle aspiration biopsy (FNAB-Tg). ** Tg-free serum, standard 'zero' given by the Tg kit company.

FNAB, fine-needle aspiration biopsy. *Unit used to express the results of the measurement of thyroglobulin in the washout fluid of fine-needle aspiration biopsy (FNAB-Tg). ** Tg-free serum, standard 'zero' given by the Tg kit company.

Table 2 – Diagnostic performances of FNAB-Tg and FNAB-C and the cutoff points of FNAB-Tg.

	Analytic sensitivity/functional sensitivity of the FNAB-Tg measurement kit	Method to establish the FNAB-Tg cutoff point	FNAB-Tg cutoff point	FNAB-C sensitivity/specificity	FNAB-Tg sensitivity/specificity	Gold standard ^a
Boi et al. (13)	0.2 (IRMA) or 0.5 ng/mL (ICMA)/-	Greatest FNAB-Tg value in benign LNs ^d	1.7 ng/mL (T) or 36 ng/mL (NT)	–	100%/100%	Histopathology or reactive FNAB-C + ultrasonographic regression in 6-12 months
Pacine et al. (21)	3 ng/mL/ -	Mean + 2 SD ^b	21.7 ng/FNAB	85.7%/-	100%/-	Histopathology
Frasoldati et al. (22)	0.25 ng/mL/ -	97.5 th percentile of LNs with benign FNAB-C ^c	1.1 ng/mL (T) or 39.3 ng/mL (NT)	–	84.0%/95.4%	Histopathology
Snozek et al. (28)	0.06 or 0.2 ng/mL/0.1 or 0.9 ng/mL	ROC curve	1 ng/mL	–	100%/96.2%	Histopathology. Neck US or clinical evidence after more than one-year follow-up
Borel et al. (29)	-/1 ng/FNAB	–	High: > 10 ng/mL Intermediate: 1 to 10 ng/mL Undetectable: < 1 ng/mL	–	–	–

Cunha et al. (30)	0.5 or 0.2 ng/mL/0.9 ng/mL	Kit's functional sensitivity	0.9 ng/mL	55% (T) and 57% (NT)/100%(T)	100% (T and NT)/100% (T)	Histopathology
Uruno et al. (31)	—	sTg	—	78%/-	81%/-	Histopathology
Kim et al. (32)	0.2 ng/mL/0.7 ng/mL	Assessed 5 cutoff points through ROC curve	sTg, mean + 2 SD (32 ng/mL) or 10 ng/mL	77.3%/98%	90.8%/89.8%	Histopathology and US follow-up
Jeon et al. (33)	—	Based on Uruno et al.	sTg or 36 ng/mL (when sTg is unavailable)	80.4%/100%	94.6%/90%	Histopathology
Sohn et al. (34)	0.2 ng/mL/0.7 ng/mL	Assessed 6 cutoff points through ROC curve	5 ng/mL	40.5%/100%	69%/83%	Histopathology
Salmash öglu et al. (35)	—	ROC curve	28.5 ng/mL	95%/40%	100%/96%	Histopathology
Bornaud et al. (36)	0.2 ng/mL/0.7 ng/mL	Assessed 7 cutoff points through ROC curve	0.93 ng/FNAB	71.1%/73%	94.2%/97.8%	Histopathology or WBS + disappearance/no progression on US
Sigstad et al. (37)	0.1 ng/mL/-	sTg	sTg	75%/50% and 100% (NT)	100%/100% and 83% (NT)	Histopathology
Biscolla et al. (38)	1 ng/ml/-	—	Positive: > 50 ng/mL Negative: < 1 ng/mL	86%/100%	—	Histopathology, periodic US
Zanella et al. (39)	1 ng/mL/-	Based on Kim et al. and Baskin et	10 ng/mL	—	100%/100%	Histopathology or negative FNAB-C + neck US

		al.				follow-up; and stimulated sTg for at least one year
Giovanel la et al. (61)	–	–	1 ng/mL	–	98 or 100%/100%	Histopatho logy, clinical examinati on, sTg, and neck US
Kim et al. (62)	0.2 ng/mL/0.7 ng/mL	sTg	sTg	96.4/68.9% (NT) and 100%/90% (T)	95%/90.9% (NT) and 80%/100% (T)	Histopatho logy

FNAB, fine-needle aspiration biopsy; FNAB-Tg, measurement of Tg in the washout fluid of fine-needle aspiration biopsy; FNAB-C, cytological assessment of samples collected by means of fine-needle aspiration biopsy; Tg, thyroglobulin; US, ultrasound; WBS, whole-body scan; NT, patients awaiting for thyroidectomy; T, patients submitted to thyroidectomy; LN, lymph node; IRMA, immunoradiometric assays; ICMA, immunochemiluminescence assays. ^aMethods considered gold standards to establish the sensitivity and specificity of FNAB-Tg and FNAB-C. ^bMean + two standard deviations of the FNAB-Tg values of benign LNs from patients with history of differentiated thyroid carcinoma (DTC). ^c97.5th percentile of the FNAB-Tg level of patients with negative FNAB-C. ^dLNs were classified as benign when they exhibited reactive FNAB-C associated with ultrasonographic regression in 6-12 months or when they had benign histology.

FNAB, fine-needle aspiration biopsy; FNAB-Tg, measurement of Tg in the washout fluid of fine-needle aspiration biopsy; FNAB-C, cytological assessment of samples collected by means of fine-needle aspiration biopsy; Tg, thyroglobulin; US, ultrasound; WBS, whole-body scan; NT, patients awaiting for thyroidectomy; T, patients submitted to thyroidectomy; LN, lymph node; IRMA, immunoradiometric assays; ICMA, immunochemiluminescence assays. ^aMethods considered gold standards to establish the sensitivity and specificity of FNAB-Tg and FNAB-C. ^bMean + two standard deviations of the FNAB-Tg values of benign LNs from patients with history of differentiated thyroid

carcinoma (DTC). c97.5th percentile of the FNAB-Tg level of patients with negative FNAB-C. dLNs were classified as benign when they exhibited reactive FNAB-C associated with ultrasonographic regression in 6-12 months or when they had benign histology.