

Fundamentos moleculares del hipotiroidismo congénito

J.C. Moreno

AMC Medical Research B.V. (AMR). Organización Holandesa de Investigación (NWO).

INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas, el importante avance experimentado en nuestra comprensión del proceso de síntesis de hormonas tiroideas ha venido de la mano de la identificación de proteínas preferentemente expresadas en la célula tiroidea. Algunos de los genes que codifican para estas proteínas están exclusivamente expresados en tejido tiroideo. Algunos otros, especialmente los que codifican factores de transcripción, comparten expresión en otros órganos lejanos de la región faríngea, origen embriológico de la glándula tiroidea.

Todos estos genes con expresión tiroidea se han encontrado mutados o deletados en pacientes con diferentes tipos de hipotiroidismo congénito (HC)¹. Sin embargo, el porcentaje de pacientes con HC de los que actualmente sabemos su etiología molecular es muy reducido, sin llegar al 5% de todos los pacientes sometidos a estudio molecular en el momento actual. En general se acepta que aún no conocemos una serie de otras proteínas con funciones cruciales tanto para el desarrollo embriológico como para la función correcta de una glándula tiroidea madura². Esto explicaría el relativamente bajo porcentaje de mutaciones descritas en el ámbito del HC. Otra causa puede ser la incompleta identificación clínica de subtipos de HC a través de las necesarias determinaciones complementarias al propio despistaje de la enfermedad. En consecuencia, el HC de estos pacientes no puede ser asignado con certeza al fallo de pasos concretos de la hormonogénesis tiroidea y obviamente, no pueden formar parte del estudio de genes candidatos concretos en el laboratorio. Por último, formas sindrómicas de hipotiroidismo, a veces de expresión clínica o bioquímica leve, se siguen activamente identificando y definiendo con precisión en la actualidad. Estas variantes clínicas se pueden deber a alteraciones en genes con patrones de expresión tisular múltiple, a veces genes ya conocidos, pero cuya función en la célula tiroidea no ha sido estudiada en profundidad. Un intere-

sante capítulo de incipiente estudio es el de la posible base epigenética, no hereditaria, del hipotiroidismo congénito³.

A continuación se revisará la base molecular del HC tal y como la conocemos en la actualidad, con particular atención a formas clínicas recientemente identificadas, y a otras variantes, definidas clásicamente en literatura, para las cuales aún no existen genes candidatos. Por último, se describirá sucintamente nuestra propia aproximación a la identificación de nuevos genes tiroideos utilizando la técnica conocida como Análisis en Serie de la Expresión Génica o SAGE.

SUBTIPOS DE HIPOTIROIDISMO CARACTERIZADOS MOLECULARMENTE

El hipotiroidismo puede ser clasificado como de origen tiroideo (o primario), central (o secundario) y periférico. Dentro del hipotiroidismo de origen tiroideo, dos grandes tipos se pueden definir: las *disgenesias*, o hipotiroidismos por alteración de la embriología del tiroideo que resultan en ectopia, hipoplasia o bien en la completa agenesia de la glándula, y las *dishormonogénesis*, causadas por el defecto en alguno de los pasos en la síntesis de hormonas tiroideas.

En las figuras 1 a 4 se exponen gráficamente los pasos susceptibles de alteraciones en el desarrollo embriológico del tiroideo (fig. 1), la hormonogénesis tiroidea (fig. 2), la diferenciación celular hipofisaria con alteración de la línea celular tirotrópica (fig. 3) y, por último, alteraciones en la disponibilidad intracelular y la acción de la hormona tiroidea en los tejidos periféricos (fig. 4). Las figuras incluyen información sobre la función de cada proteína, la nomenclatura actualizada del gen que las codifica y el fenotipo clínico diferenciado de hipotiroidismo a que conducen las alteraciones moleculares en estas proteínas, junto al tipo de herencia conocida para cada enfermedad. Definiciones más extensas, tanto de la clínica como de su diagnóstico y base molecular pueden encon-

Gen	Locus	Función proteína	Fenotipo clínico	Heren.	OMIM
?		Budding			
Foxe1	9q22	Regulación transcripcional de genes implicados en migración del brote tiroideo y otros procesos embriológicos de línea media	Agenesia de tiroides, labio leporino y atresia de coanas	A.R.	602617
PAX8, NKX2.1	2q13-14	Regulación transcripcional de genes implicados en la supervivencia y diferenciación de las células tiroideas en migración	Hipoplasia y/o extopía del tiroides con HC profundo	A.D.	167415
?	14q12-q21	Regulación transcripcional de genes implicados en la supervivencia y diferenciación de las células tiroideas en migración	Coreoatetosis, distres respiratorio neonatal e hipoplasia tiroidea y/o elevación de la TSH	A.D.	600635
?		Follicle formation			

Figura 1. Proteínas implicadas en el desarrollo y diferenciación de la glándula tiroidea. Los factores responsables del “brote” inicial del primordio tiroideo desde el intestino primitivo anterior, de la expansión celular prenatal del rudimento tiroideo y de la formación de los folículos permanecen sin identificar. AD, autosómica dominante; AR, autosómica recesiva; Foxe1 y Nkx2.1 son las nomenclaturas actuales para los factores de transcripción TTF-1 y TTF-2 respectivamente; HC, hipotiroidismo congénito.

Gen	Locus	Función proteína	Fenotipo clínico	Heren.	OMIM
TSH-R	14q31	Activación de vías metabólicas específicas de tiroides	Hipoplasia tiroidea e HC profundo	A.R.	275200
GNAS1	20q13	Transducción de señales desde GPCRs para estimular la adenilil ciclasa	Hipertirotropinemia eutiroidea	A.R., A.D.	103580
NIS	19p13	Transporte basal de yodo desde el torrente sanguíneo hacia dentro de la célula tiroidea	HC profundo o moderado	A.R.	601843 600044
TG	8q24	Matriz (pro-hormona) para la síntesis y almacenamiento de hormona tiroidea	Bocio e HC profundo o moderado	A.R.	188450
TPO	2p25	Nodación de residuos tirosil de la tiroglobulina (organificación) y acoplamiento de yodotirosinas para formar T3+T4	Bocio eutiroideo	A.D.	274500
PDS	7q31	Transporte de yodo desde el citoplasma al lumen folicular	HC profundo debido a TIOD	A.R.	274500
THOX2	15q21	Generación de H ₂ O ₂ en el folículo tiroideo	"Síndrome de Pendred": sordera y bocio o hipotiroidismo moderado debido a PIOD	A.R.	274500
-	-	Dehalogenación de MIT y DIT para reciclaje intratiroideo del yodo	HC permanente y profundo (TIOD)	A.R.	607200
-	-		Defecto de dehalogenación de yodotirosinas	A.D.	274800

Figura 2. Proteínas implicadas en la síntesis de hormona tiroidea. AD, autosómica dominante; AR, autosómica recesiva; GPCR: receptor acoplado a proteína G; MIT/DIT: Mono-/Di-yodotirosina; SLC2A5, proteína basal transportadora de sodio y yodo (NIS); SLC26A4, proteína apical transportadora de yodo (pendrina). TIOD/POD, defecto de organificación del yodo total/parcial; TG, tiroglobulina; THOX, oxidasa tiroidea; TPO, tiroperoxidasa; TSHR, receptor de TSH; HC, hipotiroidismo congénito. Modificada de²² con permiso de Society of Endocrinology.

trarse a través del número de referencia de cada enfermedad en la base de datos conocida como OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man).

SUBTIPOS DE HIPOTIROIDISMO SIN BASE MOLECULAR CONOCIDA

Existen distintas variedades de hipotiroidismo de las que, aún siendo bien definidas y reconocibles clínicamente, no conocemos los defectos genéticos que las producen, o bien han comenzado a identificarse muy recientemente.

Hipotiroidismo congénito transitorio “idiopático”. El HC transitorio se ha considerado clásicamente una variedad de hipotiroidismo con base ambiental (falta de yodo), inmunológica (paso trasplacentario de anticuerpos antitiroideos maternos al feto) o iatrogénica (intoxicación de yodo con povidona yodada, utilizada como antiséptico en el periodo neonatal). Pero en la mayoría de las grandes series de hipotiroidismo en distintos países, en un porcentaje variable entre el 15-20% de HC transitorio no se puede identificar ninguna de las causas conocidas de HC transitorio, etiquetándose de “idiopático”. En un estudio reciente

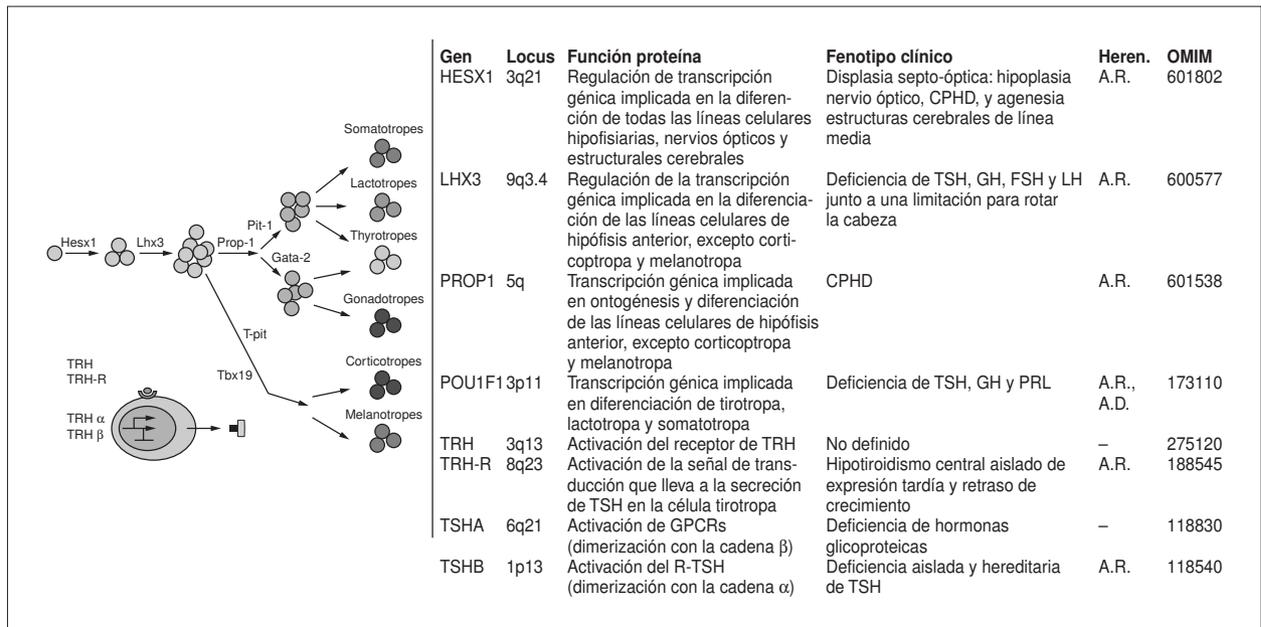


Figura 3. Proteínas implicadas en el desarrollo y función de las células tirotropas de la hipófisis. La expresión ordenada en tiempo y espacio de una serie de factores de transcripción hipofisarios gobierna la diferenciación de las líneas celulares de la hipófisis. La secreción de TSH por parte de las células tirotropas requiere la estimulación del péptido hipotalámico TRH (thyrotropin releasing hormone) y la expresión adecuada de los genes del receptor de TRH (TRH-R), TSH-α (CGA) y TSH-β (TSHB). Pit-1 es el homólogo en el ratón del factor POU1F1. AD, autosómica dominante; AR, autosómica recesiva; CPHD, deficiencia hormonal hipofisaria combinada.

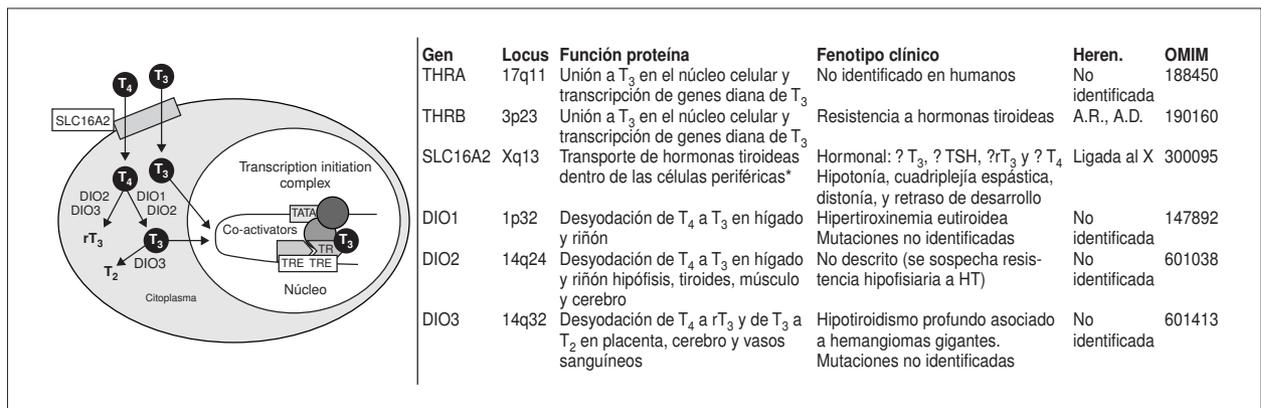


Figura 4. Proteínas implicadas en la disponibilidad intracelular y la acción de la hormona tiroidea en tejidos periféricos. AD, autosómica dominante; AR, autosómica recesiva; rT₃, triyodotironina reversa; T₂, 3,3'-diyodotironina (rT₃ y T₂ son biológicamente inactivas); DIO, desyodasas de yodotironinas; TRE, elemento de respuesta a hormona tiroidea. SLC16A2, transportador de hormonas tiroideas (nomenclatura alternativa, MCT8, por monocarboxilate transporter 8). *El transportador SLC16A2 muestra un transporte preferente de T₃ y no de T₄ (comunicación personal del Prof. T. Visser, Universidad Erasmus de Róterdam).

te, nuestro laboratorio ha caracterizado mutaciones heterocigotas inactivantes de la proteína THOX2 (thyroid oxidase 2) en pacientes con HC transitorio con un defecto parcial de organificación del yodo (fig. 5)⁴. Este estudio demuestra el carácter genético de algunos casos de HC transitorio que antes se catalogaban de idiopáticos, a la vez que abre la posibilidad de identificar otros casos de dishormonogénesis tiroideas moderadas en pacientes con HC transitorios no filiados desde el punto de vista molecular.

Deficiencia de Dehalogenasa tiroidea. En los años 1950 la deficiencia de dehalogenasa de mono- y di-yodotirosinas (MIT y DIT), principales compuestos yodados derivados de la síntesis de hormonas tiroideas, era descrito como un error (metabólico tiroideo⁵). Su base bioquímica era la falta de una actividad enzimática que desyodaba MIT y DIT para reciclar el yodo resultante para la hormonogénesis tiroidea. El fenotipo clínico se describió en una familia consanguínea que presentaba

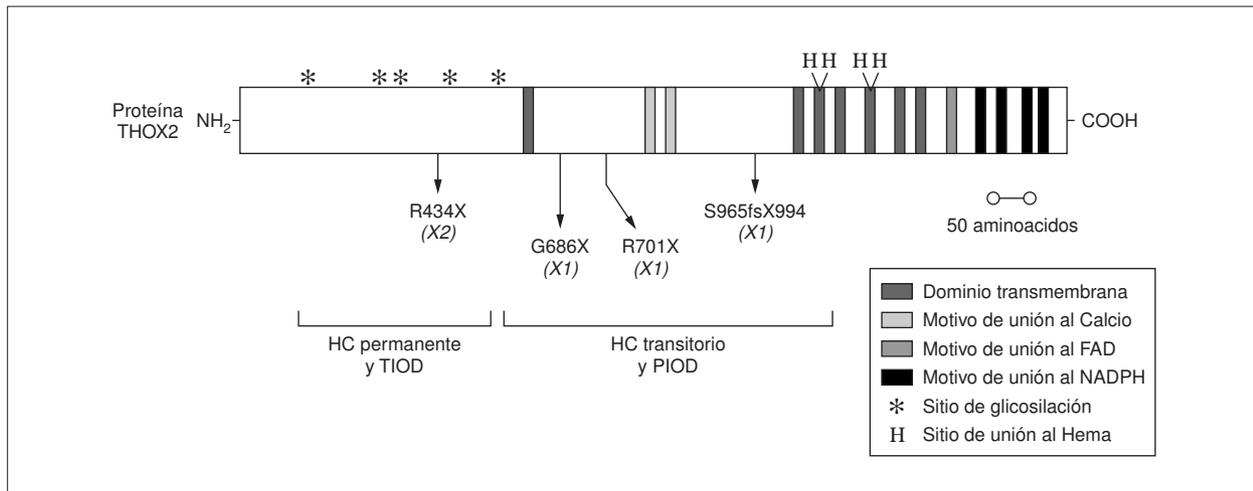


Figura 5. Dominios funcionales y mutaciones de la proteína Oxidasa tiroidea 2 (THOX2) encontradas en pacientes con hipotiroidismo congénito permanente y transitorio. Las flechas indican el lugar donde las proteínas mutadas son truncadas prematuramente. TIOD/POD, defecto de organificación del yodo total/parcial; X2, mutación homocigota; X1, mutaciones heterocigotas. Reproducida con permiso de⁴.

cretinismo no endémico con bocio, que parecía sometido a transmisión hereditaria autosómica recesiva⁶. El diagnóstico se basaba en la presencia anormal de yodotirosinas en orina, base del hipotiroidismo por simple depleción del yodo contenido en estos compuestos que no se podían desyodar. La base molecular de estos defectos que conducen a hipotiroidismo y bocios familiares aún no se ha elucidado, pero se ha publicado un posible gen candidato, denominado *DEHAL1* que codifica una proteína nitroreductasa con capacidad de dehalogenar yodotirosinas⁷.

Síndrome de Down. En pacientes con trisomía 21 existe una frecuente aunque moderada disminución de los niveles de T₄ y elevación moderada de TSH detectables en el screening neonatal⁸. La fisiopatología de esta alteración es desconocida, aunque existen evidencias que apoyan la existencia de una alteración primaria de la glándula tiroidea y descartan una sugerida falta de bioactividad de la TSH de estos pacientes⁹.

FENOTIPOS SINDRÓMICOS DE HIPOTIROIDISMO DE RECIENTE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La búsqueda de la base molecular de ciertos defectos tiroideos ha sido la causa de la identificación y definición, en época reciente, de nuevos síndromes o constelaciones sintomáticas desconocidas con anterioridad, y que incluyen el fenotipo clínico o bioquímico de hipotiroidismo. Veamos algunos ejemplos:

Haploinsuficiencia del factor NKX2.1: Nkx2.1 (o TTF-1) es un factor de transcripción perteneciente a la familia *homeodomain* expresado en tiroidea, pulmón y determinadas áreas de cerebro ventral durante el periodo embri-

nario. La búsqueda de mutaciones en NKX2.1 en niños con HC fue inicialmente infructuosa^{10,11}, pero la identificación de deleciones monoalélicas de una región cromosómica que incluía este gen, y posteriormente la identificación de mutaciones heterocigotas en determinados pacientes ha permitido la definición clínica de un nuevo síndrome con alteraciones neurológicas, tiroideas y pulmonares^{12,13}. Las más prominentes son neurológicas, incluyendo una hipotonía muscular neonatal con evolución posterior de una coreoatetosis, derivada de la falta de expresión del gen en los ganglios basales cerebrales. Las alteraciones tiroideas y pulmonares son más discretas, a veces no detectadas, consistentes en una elevación moderada de la TSH en el periodo neonatal, y las pulmonares en un distrés respiratorio neonatal recuperable con asistencia ventilatoria.

Síndrome por defecto del transportador de hormona tiroidea SLC16A2: SLC16A2 es una proteína transportadora de membrana, aislada en 1998¹⁴ pero solo recientemente caracterizada desde el punto de vista funcional como un transportador selectivo de hormona tiroidea¹⁵. Dos grupos de investigación han encontrado simultáneamente mutaciones en el gen que codifica este transportador, también denominado MCT8 (por mono-carboxilate transporter 8)^{16,17}. El espectro clínico de los pacientes incluye una particular resistencia a hormonas tiroideas con elevación marcada de T₃ y moderada de TSH en plasma, y con disminución intensa de T₃ reversa y moderada de T₄. Pero, de nuevo, lo más florido de la presentación clínica es una abigarrada serie de alteraciones neurológicas que incluye un retraso global de desarrollo, la presencia de hipotonía central, cuadriplejía espástica, movimientos distónicos, nistagmo rotatorio y alteraciones de la visión y auditivas.

El gen SLC16A2 está situado en el cromosoma X, por lo que el síndrome es muy florido en varones, aunque el perfil hormonal descrito, más leve, se ha encontrado también en mujeres afectas, sin la presencia de alteraciones neurológicas.

Casos similares fueron la descripción de un *síndrome recesivo por deficiencia del factor de transcripción LHX3* que asociaba la presencia de una deficiencia hipofisaria combinada (de TSH, GH, FSH y LH) con una peculiar incapacidad de los pacientes para realizar una rotación completa de la cabeza, debido a una malformación estructural en el cuello (fig. 3)¹⁸.

Estos ejemplos conducen a la idea de que no todas las formas de hipotiroidismo en la actualidad están bien definidas y clasificadas en el terreno clínico. Se hace, por tanto, necesaria una especial atención profesional hacia la identificación de pacientes con hipotiroidismo con ciertas particularidades, tanto clínicas como bioquímicas, que puedan llevar a esclarecer la fisiopatología y las causas moleculares de todas las formas de hipotiroidismo.

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENES IMPLICADOS EN EL HC

La identificación de genes específicos de tejido es esencial para investigar el trasfondo molecular de las enfermedades humanas. Con el objetivo de profundizar en la base molecular del hipotiroidismo congénito, hemos buscado la identificación de genes relevantes para la fisiología tiroidea, siguiendo para ello una estrategia basada en la técnica del Análisis en Serie de la Expresión Génica (SAGE)¹⁹.

Someramente, primero construimos una librería SAGE partiendo de tejido tiroideo humano que contenía más de 4.000 pequeñas colas de secuencia (o tags) de 10 pares de bases, las cuales representan moléculas de ARN mensajero aun no identificadas²⁰. Posteriormente, desarrollamos un método para seleccionar un grupo reducido e interesante de las colas que se expresaban de manera preferente en tiroides con respecto de otros tejidos²¹. Aplicando este método *in silico*, tres de estas colas fueron seleccionadas para proseguir su investigación en el laboratorio.

La primera de estas colas de secuencia corresponde al recientemente identificado gen *THOX2*, implicado en la producción de H₂O₂ en el folículo tiroideo, un paso esencial en la síntesis de hormonas tiroideas. Con esta información procedimos al screening de mutaciones en el gen *THOX2* en niños con hipotiroidismo congénito "idiopático". Se identificaron cuatro mutaciones inactivadoras que conducían al truncado prematuro de la proteína *THOX2*⁴. Un paciente con hipotiroidismo congénito permanente y profundo era portador de una mutación en ambos alelos del gen. Otros tres pacientes, en los que uno sólo de los alelos se encontraba mutado, presentaban un hipotiroi-

dismo más moderado, asociado con defectos parciales de organificación del yodo (descargas parciales en el test del perclorato). El hipotiroidismo de estos tres niños tuvo una expresión clínica transitoria. Estos hallazgos muestran el papel crucial de la oxidasa tiroidea *THOX2* en la producción de H₂O₂ en el tiroides, pues la inactivación funcional de los dos alelos de este gen impide completamente la síntesis de hormona tiroidea. También constituyen la primera evidencia de que ciertas formas de hipotiroidismo congénito transitorio tienen una base genética.

Partiendo de la segunda cola SAGE hemos logrado la clonación del gen *DEHAL1*⁷. Este nuevo gen se expresa de manera intensa en tiroides y también en hígado, riñón y glándula mamaria. Su RNA mensajero tiene 7.2 Kb y está sujeto a splicing alternativo. Las proteínas codificadas a partir de este gen pertenecen a la familia de las nitroreductasas, enzimas que usan flavin mononucleótido (FMN) como cofactor. Recientemente hemos demostrado que la función de esta proteína es la deshalogenación de yodotirosinas (mono-iodotirosina, MIT, y di-iodotirosina, DIT), los principales subproductos yodados generados durante la síntesis de hormona tiroidea. Esta actividad enzimática es crucial para el reciclaje de yodo dentro de la glándula tiroidea, que es reutilizado en la hormonogénesis. En consecuencia, *DEHAL1* es el mejor gen candidato para la deficiencia de dehalogenasa tiroidea, una enfermedad que causa hipotiroidismo congénito y bocio a través de la pérdida excesiva de yodo, en forma de MIT y DIT, en orina.

La tercera cola SAGE corresponde a un nuevo gen que se expresa en tiroides y en las células endocrinas del estómago y el pulmón. Este gen, denominado *NM41*, está localizado en el brazo largo del cromosoma 16 y codifica un RNA mensajero de 1.4 kilobases. La correspondiente proteína tiene homología con las llamadas proteínas *cystine-knot*, moléculas secretables fuera de las células que se sabe juegan un papel importante en morfogénesis. Actualmente investigamos las características funcionales de esta nueva proteína tiroidea en el laboratorio. *NM41* puede tener una función durante la organogénesis tiroidea, y representa un posible gen candidato para el estudio de los trastornos disgenéticos de la glándula tiroidea.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moreno JC, de Vijlder JJM, Vulsma T, Ris-Stalpers C. Genetic basis of hypothyroidism: recent advances, gaps and strategies for future research. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:318-26.
2. Kimura S, Ward JM, Minoo P. Thyroid-specific enhancer-binding protein/thyroid transcription factor 1 is not required for the initial specification of the thyroid and lung primordia. *Biochimie* 1999;81:321-7.
3. Perry R, Heinrichs C, Bourdoux P, Khoury K, Szots F, Dussault JH, Vassart G, Van Vliet G. Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4072-7.

4. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 2002;347:95-102.
5. Hutchinson JH, McGirr EM. Hypothyroidism as an inborn error of metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1954;14:869-86.
6. Hutchinson JH, McGirr EM. Sporadic non-endemic goitrous cretinism. Hereditary transmission. *Lancet* 1956;1:1035-7.
7. Moreno JC, Keijser R, Gilhuijs-Pederson L, Gestel D, de Vijlder JJM, Ris-Stalpers C. Cloning and characterization of the human thyroid dehalogenase. *Horm Res* 2003;60(Suppl 2):2.
8. van Trotsenburg AS, Vulsma T, van Santen HM, Cheung W, de Vijlder JJM. Lower neonatal screening thyroxine concentrations in Down Syndrome newborns. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1512-5.
9. Konings CH, van Trotsenburg AS, Ris-Stalpers C, Vulsma T, Wiedijk BM, de Vijlder JJ. Plasma thyrotropin bioactivity in Down's syndrome children with subclinical hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2001;144:1-4.
10. Lapi P, Macchia P, Chiovato L et al. Mutations in the gene encoding thyroid transcription factor-1 (TTF-1) are not a frequent cause of congenital hypothyroidism (CH) with thyroid dysgenesis. *Thyroid* 1997;7:383-7.
11. Perna M, Civitareale D, De Filipis V, Sacco M, Cisternino C, Tassi V. Absence of mutations in the gene encoding thyroid transcription factor-1 (TTF-1) in patients with thyroid dysgenesis. *Thyroid* 1997;7:377-81.
12. Krude H, Schutz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, Tonnies H, Weise D, Lafferty A, Schwarz S, DeFelice M, von Deimling A, van Landeghem F, DiLauro R, Gruters A. Choreoathetosis, hypothyroidism and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest* 2002; 109:475-80.
13. Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D, Martine U, Schonberger W, Koo E, Weiss RE, Cohen RN, Kimura S, Refetoff S. Partial deficiency of Thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice. *J Clin Invest* 2002;109:469-73.
14. Debrand E, Heard E, Avner P. Cloning and localization of the murine Xpct gene: evidence for complex rearrangements during the evolution of the region around the Xist gene. *Genomics* 1998;48:296-303.
15. Friesema ECH, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap A P, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 2003;278:40128-35.
16. Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet* 2004;74:168-75.
17. Friesema E, Grueters A, Halestrap A, Reeser M, Visser T. Mutations in a thyroid hormone transporter in patients with severe psychomotor retardation and high serum T3 levels. (Abstract) *Thyroid* 2003;13:672.
18. Netchine I, Sobrier ML, Krude H, Schnabel D, Maghnie M, Marcos E, Duriez B, Cacheux V, Moers A, Goossens M, Gruters A, Amselem S. Mutations in the LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet* 2000;25:182-6.
19. Moreno JC. Identification of novel genes involved in congenital hypothyroidism using serial analysis of gene expression. *Horm Res* 2003;60(Suppl 3):96-102.
20. Pauws E, Moreno JC, Tijssen M, Baas F, de Vijlder JJM, Ris-Stalpers C. Serial analysis of gene expression as a tool to assess the human thyroid expression profile and to identify novel thyroidal genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1923-7.
21. Moreno JC, Pauws E, van Kampen AH, Jedlickova M, de Vijlder JJ, Ris-Stalpers C. Cloning of tissue-specific genes using serial analysis of gene expression and a novel computational subtraction approach. *Genomics* 2001;75:70-6.
22. van de Graaf SA, Ris-Stalpers C, Pauws E, Mendive FM, Targovnik HM, de Vijlder JJ. Up to date with human thyroglobulin. *J Endocrinol* 2001;170:307-21.