

Optimización de una Estrategia Bioquímica para el Diagnóstico de Hipotiroidismo Primario

Mahler GA¹, Lussana MS¹, Leiva SE¹, Muñoz NL², Bergoglio LM¹.

1 Laboratorio de Endocrinología. Hospital Nacional de Clínicas. Universidad
Nacional de Córdoba.

2 Hospital de Niños de la Santísima Trinidad. Córdoba.

Laboratorio de Endocrinología. Hospital Nacional de Clínicas. Universidad
Nacional de Córdoba.

Correspondencia relativa al manuscrito: Mahler Gay, Germán Adolfo. Dirección
electrónica: german_mahler@hotmail.com. Dirección Postal: Laboratorio de
Endocrinología. Hospital Nacional de Clínicas. Santa Rosa 1564. Córdoba
5000.

Resumen

Introducción: En el hipotiroidismo primario (HP) la producción disminuida de hormonas tiroideas conduce a un aumento de tirotrófina (TSH). Para su diagnóstico se han propuesto distintas estrategias iniciales.

Objetivos: Evaluar el aporte diagnóstico adicional de tiroxina libre (T4L), tiroxina total (T4T) e índice de T4L (IT4L) al de TSH aislada en la estrategia diagnóstica inicial, comparar la robustez de T4L con la de T4T e IT4L, y proponer otra estrategia primaria alternativa [TSH + anticuerpos antiperoxidasa tiroidea (TPOAb)] del par habitual (TSH + T4L). Sujetos y Métodos: Se analizaron los resultados de 97 pacientes ambulatorios, no gestantes, sin tratamiento, que concurren al laboratorio entre Marzo y Junio de 2013 para evaluación de la función tiroidea. Se determinó: TSH, TPOAb, T4L, y T4T (por IMMULITE, Siemens), e IT4L (por Elecsys Roche).

Estadística: descriptiva, correlación de Spearman, y test de Fisher. Resultados:

Eutiroideos: TSH N (normal) 69/97 (71,1%); TSH N/T4T N 69/97 (71,1%); TSH N/IT4L N 69/97 (71,1%); $r = 0,9779$ ($p < 0,0001$) para la correlación T4-IT4L, TSH N/T4L N 58/97 (59,8%); $r = 0,6141$ ($p < 0,0001$) para la correlación T4L-IT4L. Hipotiroides: TSH elevada 28/97 (28,9%); Subclínicos definidos con T4T N 25/28 (89,3%)*; Subclínicos definidos con T4L N 20/28 (71,4%)*; *Fisher: $p < 0,05$. Clínicos definidos con T4T baja 3/28 (10,7%)**; Clínicos definidos con T4L baja 8/28 (28,6 %)**; **Fisher: $p < 0,05$.

TPOAb+/TSH N 11/97 (11,3%); TPOAb+/TSH 13/97 (13,4%).

Discusión: Con TSH sola, se logró caracterizar al 71,1% de los eutiroideos, ninguno de los cuales tuvo T4T ni IT4L bajos, pero sí T4L paradójicamente

bajas, y al 28,9% de hipotiroideos. Hubo excelente correlación positiva entre T4T e IT4L, aunque moderada entre T4L e IT4L. El alto porcentaje de hipotiroidismo clínico cuando se definió con T4L, parecería sobreestimado por la poca robustez del inmunométodo utilizado. La prevalencia de TPOAb + coincidió con la de la literatura.

Conclusiones: La ventaja de conocer desde el inicio la etiología autoinmune del hipotiroidismo, sumada a la falla de T4L en demostrar información adicional y robusta a la proporcionada por TSH sola, permiten sugerir el par TSH + TPOAb en pacientes no tratados, como estrategia inicial para confirmar eutiroidismo, en lugar de la dupla habitualmente solicitada (TSH + T4L). Ante una TSH elevada, (para categorizar condición clínica o subclínica), o ante sospecha de patología no primaria se sugiere realizar T4T o IT4L preferiblemente a T4L.

Palabras clave: Estrategia diagnóstica bioquímica, Hipotiroidismo primario, Tiroxina libre, Tiroxina total, Anticuerpos antiperoxidasa.

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Introducción

El HP se caracteriza por una producción deficiente de hormonas tiroideas (HT) que puede ser severa o moderada. El déficit severo origina el hipotiroidismo clínico (HC), y la forma moderada el hipotiroidismo subclínico (HSC), y ambos comparten la misma etiología. El HSC presenta signos y síntomas sólo ocasionalmente, y se define bioquímicamente por la concentración de TSH por encima del percentilo 97,5º del rango de referencia para el método, con HT normales. Este concepto sólo es aplicable cuando la función tiroidea ha permanecido estable durante varias semanas, el eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo es normal, y no hay ninguna enfermedad severa reciente o en curso. La causa más frecuente de HP es la tiroiditis crónica autoinmune o tiroiditis de Hashimoto^{1,2}.

El hipotiroidismo secundario y terciario también obedecen a una producción disminuida de hormonas tiroideas, pero por un estímulo reducido de TSH, o de hormona liberadora de tirotrófina (TRH) respectivamente. Por otra parte, una acción reducida de hormonas tiroideas en los órganos blanco, se observa en los casos raros de resistencia a las hormonas de tiroideas³.

Para el diagnóstico de HP se han propuesto distintas estrategias iniciales: TSH o T4L aisladas, TSH + TPOAb, TSH + T4L, y para pacientes internados TSH + T4T⁴.

La TSH como test de primera línea para detectar hipotiroidismo, se utiliza en pacientes con estado tiroideo estable y función hipotálamo-hipofisaria intacta.

Es más sensible que la T4L debido a la relación logarítmica lineal entre ambas, que determina que pequeñas disminuciones en las concentraciones de T4L se asocien con un aumento exponencial en las concentraciones de TSH⁵.

Además, los ensayos de TSH son exactos, ampliamente disponibles, seguros, y relativamente económicos. Los de tercera generación, tienen muy alta sensibilidad y especificidad¹.

En consecuencia, algunos países con un sentido estrictamente conservador promueven la determinación de TSH sola para comenzar la evaluación en pacientes ambulatorios, seguida de T4L (para distinguir HC de HSC) solamente si la TSH es anormal, o si se sospecha una anormalidad en su secreción (condición secundaria)¹.

La dupla inicial TSH + TPOAb también ha ganado cierta popularidad a partir del reconocimiento de que la autoinmunidad tiroidea se asocia con elevaciones tempranas de TSH, y de las mejoras en los métodos para determinar autoanticuerpos, además de evitar el pobre desempeño técnico que presenta la determinación de T4L por inmunométodos cuando forma parte de la estrategia primaria^{4,6}.

El rango de referencia de TSH aceptado tradicionalmente en individuos sin enfermedad tiroidea es 0,45-4,5 mU/L, y corresponde a los percentilos 2,5° y 97,5° respectivamente de la curva de distribución de TSH en estudios poblacionales o experimentales para definir rangos de normalidad¹.

También se ha propuesto un rango de referencia "empírico" entre 0,30 y 3,0 mU/L (Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos y Academia Nacional de Bioquímica Clínica)⁷ como una alternativa al rango de referencia "experimental" debido al gran número de factores que afectan el límite superior en todos los estudios demográficos, que incluyen variables individuales (etnicidad, estado nutricional, y área geográfica, entre otras)¹.

El límite superior de TSH también puede aumentar con la edad como se observó en el estudio poblacional americano NHANES III, el cual demostró que, si es mantenido en 4,5 mU/L, el 74 % de los pacientes mayores de 80 años o más, sin TPOAb positivos tienen valores de TSH por encima de este límite⁸. Por eso, en un nuevo análisis del NHANES III de las curvas de distribución de TSH en individuos TPOAb negativos, el límite superior de TSH en sujetos entre 50-59 años correspondió a 4,2 mU/L, entre 60-69 años, a 4,7 mU/L, entre 70-79 años, a 5,6 mU/L y en los de más de 80 años a 6,3 mU/L⁹.

Asimismo, en el escenario de los enfermos críticos hospitalizados en los que las fluctuaciones transitorias de TSH son habituales, se recomienda un rango de referencia más amplio (0,05 a 10 mU/L) para el diagnóstico de HP¹⁰.

Sin embargo, no existe una única herramienta bioquímica considerada como el patrón de oro. Aunque la introducción de las pruebas de TSH de tercera generación mejoró el estudio de la enfermedad tiroidea, en particular del hipertiroidismo, la exactitud diagnóstica de TSH para la detección de hipotiroidismo aún tiene sus limitaciones^{1,11}.

En pacientes ambulatorios, el ensayo inmunoradiométrico de segunda generación (IRMA) tiene una sensibilidad del 89% y una especificidad del 95%.

Resultados similares han sido obtenidos con el empleo de ensayos de tercera generación [inmunoquimioluminiscentes (ICMA)], que presentan el 76,9% de sensibilidad y el 96% de especificidad¹.

Respecto a la determinación de T4L aislada en pacientes ambulatorios, la sensibilidad y la especificidad han sido estimadas en 82% y 94% respectivamente. No obstante, si se tiene en cuenta que los niveles de T4L por inmunométodos no son el resultado de una medida directa de la hormona libre, sino una estimación de la misma, la determinación de T4L tiene sus propias limitaciones técnicas que pueden producir resultados espurios, especialmente cuando hay alteraciones en las proteínas transportadoras. Cuando la albúmina es anormal por ejemplo en la enfermedad no tiroidea, o en el embarazo se ven afectados los inmunoensayos basados en el método del análogo. Asimismo, cuando el paciente recibe fármacos que desplazan la T4 de la globulina fijadora de tiroxina (TBG), como fenitoína, carbamazepina, o furosemida, no deberían determinarse T4T o T4L como únicos tests sino siempre acompañadas de TSH^{12,13,14}.

La asociación de TSH con T4L aumenta la exactitud diagnóstica para el HC del 27% al 83% (IRMA) y del 28% al 84% (ICMA). Para el HSC, hay un aumento de la exactitud diagnóstica utilizando ambas pruebas, del 66% al 96% (IRMA) y del 68% al 97% (ICMA)¹. Esto propiciaría el uso del par como aparentemente ideal.

La determinación T4T sólo tiene relevancia diagnóstica si la capacidad de fijación de la tiroxina en suero es normal. Cuando esto no ocurre, además de la T4L puede utilizarse el IT4L¹⁵.

El IT4L se calcula mediante la relación entre T4T y T4-*uptake*. La T4-*uptake* es una prueba inmunológica in vitro para la determinación cuantitativa de la capacidad de fijación de tiroxina a las proteínas transportadoras, es decir, informa sobre la concentración de los sitios de unión disponibles para la tiroxina, con lo que se tienen en cuenta las modificaciones en las proteínas transportadoras para informar el nivel de tiroxina. El IT4L se considera el test que tiene en cuenta de manera más fiable esas modificaciones, y podría usarse cuando no se dispone de un método patrón como la espectrometría de masa^{14,16}.

En el pasado, para realizar la prueba de T-*uptake* con métodos manuales se agregaba T3 exógena para saturar la globulina fijadora de tiroxina, y el test se denominaba T3-*uptake*¹⁷. Actualmente algunas plataformas automatizadas añaden T4 exógena en lugar de T3 para lograr la saturación y la prueba se denomina test de T4-*uptake*.

En cuanto a los TPOAb, constituyen una herramienta útil para establecer si la autoinmunidad es la causa de hipotiroidismo, cuando se ha obtenido una TSH elevada confirmada con una segunda determinación luego de dos semanas a tres meses, (con T4L o T4T normales o bajas), es decir cuando estamos frente a un HSC o HC respectivamente^{18,19}. Los TPOAb están presentes en casi

todos los pacientes con tiroiditis de Hashimoto, con una sensibilidad y una especificidad del 91,9% y el 92,7% respectivamente¹.

Objetivos: El propósito del presente trabajo es: analizar si las determinaciones de T4L, T4T e IT4L representan un aporte diagnóstico adicional al de TSH aislada en la evaluación inicial del paciente para el diagnóstico de HP. Asimismo, comparar la robustez de T4L con la de T4T e IT4L para definir la condición subclínica, y finalmente proponer una estrategia diagnóstica alternativa (TSH + TPOAb) a la habitualmente requerida por el médico y realizada por la mayoría de los laboratorios (TSH + T4L).

Sujetos y métodos

Población

Se analizaron retrospectivamente los resultados de pacientes ambulatorios que concurrieron al Laboratorio de Endocrinología del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba para evaluación de su función tiroidea entre Marzo y Junio de 2013, a los que se les hubiera solicitado como mínimo las determinaciones de TSH, T4L y TPOAb.

Los criterios de exclusión fueron: (1) pacientes gestantes y (2) tratamiento con hormona tiroidea, antitiroideos o amiodarona.

Recolección de datos

La información respecto de: edad, sexo, tratamiento y motivo de consulta se obtuvo de los Registros de Recepción del paciente; y los valores de los

analitos, de los Registros de Resultados del Laboratorio, acorde al Sistema de Gestión de Calidad (SGC) del mismo.

Ensayos

Las concentraciones de TSH, T4T, T4L y TPOAb fueron medidas por inmunoensayo quimioluminiscente (IMMULITE 1, Siemens, Alemania) y T4-*uptake* por inmunoensayo electroquimioluminiscente (Elecsys 2010, Roche, Alemania).

Los rangos de referencia utilizados fueron: TSH: 0,45-4,5 mU/L; T4L: 0,89-1,76 ng/dL; TPOAb: < 35 KU/L; T4-*uptake*: 0,8-1,3 e IT4L: 4,4-11,4 µg/dL.

Estadística

Se realizó la estadística descriptiva de las prevalencias de eutiroidismo, HC e HSC según los valores de referencia mencionados. Para la definición de eutiroidismo se utilizó el rango de referencia de TSH de 0,45-4,5 mU/L. Con el test de Kolmogorov y Smirnov se probó la presunción de la distribución Gaussiana de T4T, T4L, IT4L. Las correlaciones entre T4T e IT4L y entre T4L e IT4L se establecieron con el test de Spearman; y con el test de Fisher se comparó la prevalencia de hipotiroidismos caracterizados como clínicos o subclínicos ya sea con T4T o con T4L. El nivel de significación fue $\leq 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad InStat (Inc., San Diego California USA) en versión 3.0.

Resultados

Acorde a los criterios de exclusión, un total de 97 pacientes, con edades entre 11 y 74 años fueron incluidos.

Prevalencia de TPOAb positivos

Entre los individuos con TSH normal hubo una prevalencia de 11,3% (n=11/97) de TPOAb positivos (tiroiditis eutiroideas), y entre los individuos con TSH elevada la prevalencia fue del 13,4 % (13/97).

Evaluación del aporte de HT e IT4L a TSH aislada en el abordaje inicial

Un 71,1% (69/97) de los pacientes tuvo TSH normal, coincidiendo con el obtenido al determinar T4T junto con TSH (TSH N + T4T N =69/97= 71,1%), o IT4L (TSH N + IT4L N =69/97= 71,1%). Cuando en cambio se incorporó a la TSH, la determinación de T4L, el porcentaje de pacientes con el par TSH N + T4L N fue significativamente menor: 59,8% (58/97). La correlación entre IT4L y T4T fue: $r = 0,9779$, $p < 0,0001$ (Fig.1) en tanto, entre IT4L y T4L fue: $r = 0,6141$, $p < 0,0001$ (Fig.2).

Fig.1. Correlación de Spearman entre T4T e IT4L.

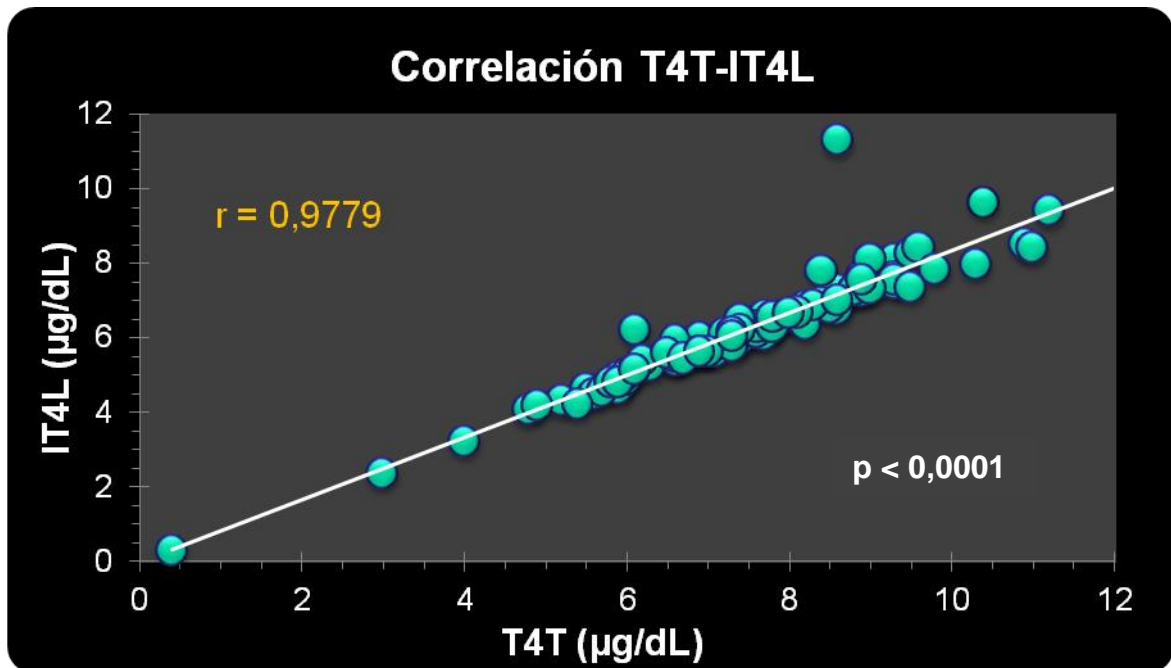
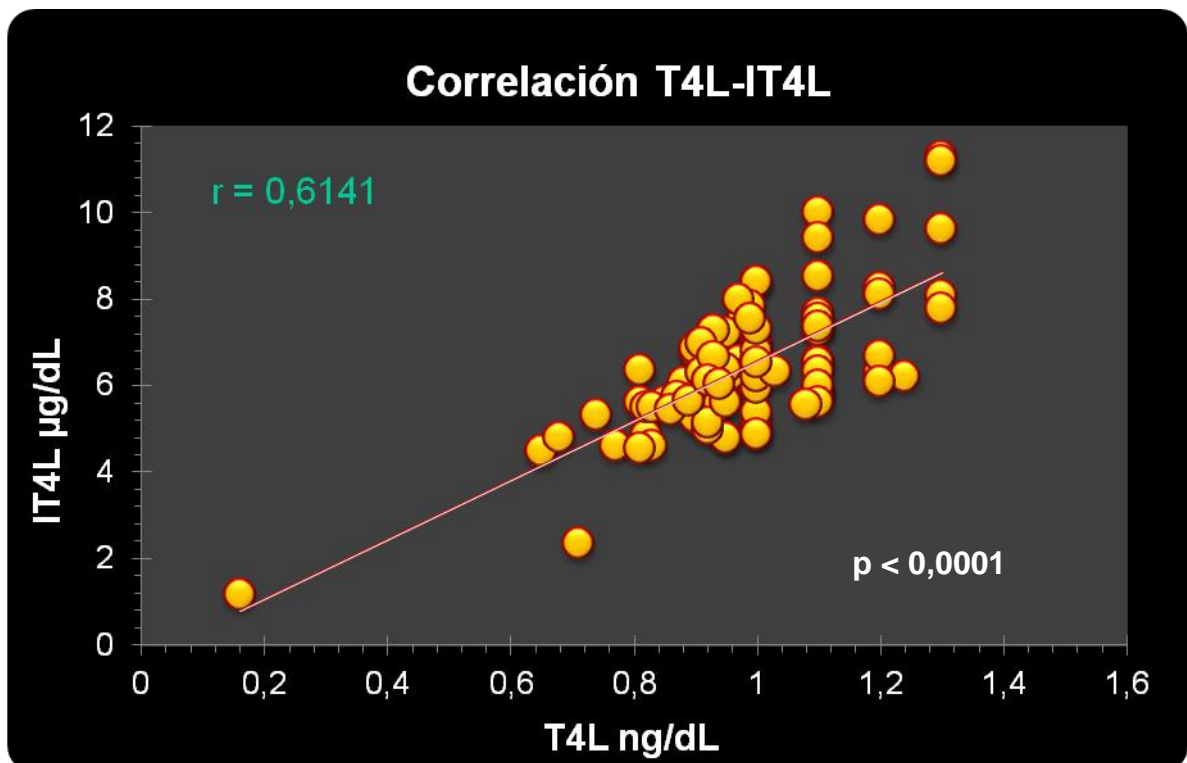


Fig.2. Correlación de Spearman entre T4L e IT4L.



Robustez de T4L comparada con la de T4T e IT4L

La robustez de T4L fue evaluada en pacientes hipotiroideos (TSH > 4,5 mU/L) que representaron un 28,9% (28/97) del total, a los que luego se los categorizó en subclínicos (HT normal) y clínicos (HT baja) utilizando T4T, IT4L y T4L. La condición de HSC definida con T4T o con IT4L fue de 89,3%* (25/28), mientras que definida con T4L fue de 71,4%* (20/28). *Fisher: $p < 0,05$.

De la misma manera, la condición de HC efectuada con T4T o IT4L fue de 10,7%** (3/28), mientras que con T4L fue de 28,6%** (8/28). **Fisher: $p < 0,05$

Discusión

Con TSH como determinación aislada, se logró caracterizar al 71,1% de individuos eutiroideos, ninguno de los cuales tuvo T4T ni IT4L bajos, respondiendo estrictamente a la definición de eutiroidismo. Sin embargo, 11/97 de ellos (11,3%), tuvieron T4L paradójicamente bajas, habida cuenta que las hipotiroxinemias aisladas no representan una condición clínica descrita fuera del embarazo. Hubo excelente correlación positiva ($r = 0,9779$; $p < 0,0001$) entre T4T e IT4L, aunque moderada ($r = 0,6141$; $p < 0,0001$) entre T4L e IT4L. El alto porcentaje de HC 8,2% (8/97) definido con T4L, al compararlo con el de la literatura parecería indicar una sobreestimación del mismo debida a la poca robustez de T4L cuya ventana de validez es limitada²⁰.

En cuanto a la ventaja de incluir TPOAb en la estrategia inicial, es conocido que la presencia de títulos elevados de TPOAb es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de HC en pacientes con HSC, en los cuales, contribuye además a predecir la progresión hacia el HC, que es de 4,3 % por

año si los TPOAb son positivos, en contraste con el 2,6 % por año si son negativos¹. El mayor riesgo de desarrollar HC en pacientes con TPOAb positivos es la razón por la que varias Sociedades profesionales y algunos endocrinólogos clínicos recomiendan la valoración de TPOAb en pacientes con HSC cuyas prevalencias muestran una tendencia paralela a las elevaciones de TSH²¹.

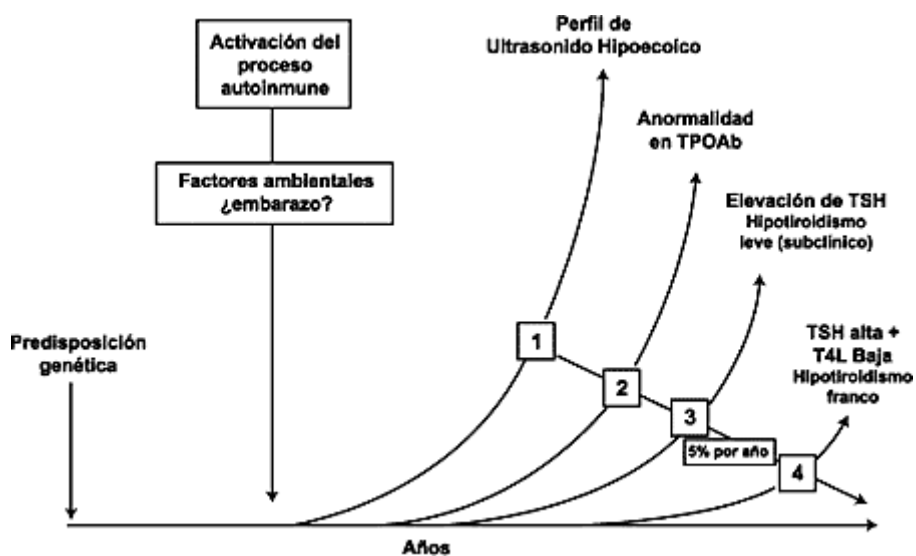
El estudio NHANES III en ~17.000 sujetos sin enfermedad tiroidea evidente, reportó una prevalencia de TPOAb positivos de 12,6% utilizando un inmunoensayo competitivo²². En nuestro trabajo, el porcentaje de tiroiditis eutiroideas (TSH normal/TPOAb positivos) fue coincidente.

Pero las concentraciones de TPOAb reflejan la severidad de la infiltración linfocítica independientemente de la presencia o ausencia de hipotiroidismo. En este contexto, se ha encontrado una correlación significativa entre el grado de infiltración linfocítica y el título de anticuerpos^{23,24}, y en sujetos eutiroideos, también se ha descrito una asociación entre concentraciones de TPOAb y niveles de TSH²⁵.

Aunque la presencia de TPOAb por lo general precede el desarrollo de disfunción tiroidea, estudios recientes sugieren que un patrón ecográfico hipoecoico puede a la vez preceder a la aparición de anticuerpos (Fig 3)²⁶. La ausencia paradójica de TPOAb en algunos pacientes con anomalías de TSH probablemente refleje la falta de sensibilidad y/o especificidad clínica y metodológica de algunos ensayos de TPOAb²⁷.

Es decir que las estimaciones de la prevalencia de TPOAb en la población general dependen de la sensibilidad y la especificidad del método empleado. Así como la sensibilidad para los métodos de TgAb (Anticuerpos anti tiroglobulina) puede ser mejorada usando el límite de detección (sensibilidad analítica) en vez de las líneas de corte recomendadas por el fabricante, futuros estudios deberían evaluar si ocurre lo mismo con TPOAb, sin pérdida de especificidad.

Fig.3. Etapas del desarrollo de la disfunción tiroidea autoinmune. Tomada de Bergoglio LM, Mestman JH. Guía para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tiroidea. Rev Arg Endocrinol Metab 42:1-134, 2005.



Conclusiones

T4L, T4T ni IT4L demostraron un aporte adicional a TSH aislada para confirmar eutiroidismo en un paciente que concurre para evaluación bioquímica inicial de

su función tiroidea. T4L, históricamente propuesta como parte del par diagnóstico inicial (TSH + T4L) mostró poca robustez comparada con T4T e IT4L para definir HC o HSC.

Si bien no hay consenso sobre la determinación inicial conjunta de TPOAb + TSH para la detección inicial de disfunción tiroidea, excepto en algunas situaciones particulares como el embarazo^{19,28}, esta dupla que cuenta con la ventaja adicional de informar desde el inicio sobre la etiología autoinmune del hipotiroidismo, aparece como una alternativa de mayor costo/efectividad que la TSH + T4L con los métodos empleados, cuando TSH es normal. Si en cambio, TSH es elevada, o si se sospecha patología tiroidea no primaria se sugiere realizar además T4T o IT4L como tests de segunda línea preferiblemente a T4L.

Bibliografía

1. Brenta G, Vaisman M, Sgarbi JA, Bergoglio LM, Andrada NC, Bravo PP, Orlandi AM, Graf H. Clinical practice guidelines for the management of hypothyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 57:265-91, 2013.
2. Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F, Grimley Evans J, Hasan DM, Rodgers H, Tunbridge F, Young ET. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 43:55-68, 1995.

3. Mahler GA, Bergoglio LM. Inappropriate secretion of TSH syndrome. Rev Argent Endocrinol Metab 50:253-64, 2013.
4. Bergoglio L. Perfiles hormonales y de sustancias relacionadas. En Tratado Argentino de Tiroides. <http://www.tratadodetiroides.com.ar/swf/cap20/Cap20.aspx>, 2010
5. Clark PM, Holder RL, Haque SM, Hobbs FD, Roberts LM, Franklyn JA. The relationship between serum TSH and free T4 in older people. Postgrad Med J 88:668-70, 2012.
6. Effraimidis G, Strieder TG, Tijssen JG, Wiersinga WM. Natural history of the transition from euthyroidism to overt autoimmune hypo- or hyperthyroidism: a prospective study. Eur J Endocrinol 164:107–13, 2011.
7. Baskin HJ, Cobin RH, Duick DS, Gharib H, Guttler RB, Kaplan MM, Segal RL. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the evaluation and treatment of hyperthyroidism and hypothyroidism. Endocr Pract 8:457-69, 2002.
8. Surks MI, Hollowell JG. Age-specific distribution of serum thyrotropin and antithyroid antibodies in the US population: implications for the prevalence of subclinical hypothyroidism. J Clin Endocrinol Metab 92:4575-82, 2007.

9. Boucai L, Hollowell JG, Surks MI. An approach for development of age-, gender-, and ethnicity-specific thyrotropin reference limits. *Thyroid* 21:5-11, 2011.
10. Bergoglio LM. El laboratorio hormonal en el hipotiroidismo. En: Niepomniszcz H, Novelli JL, Hipotiroidismo. Capítulo 8:103-15. Ed. UNR, 2009.
11. Soldin OP, Chung SH, Colie C. The use of TSH in determining thyroid disease: How does it impact the practice of medicine in pregnancy?. *J Thyroid Res* 2013:148157, 2013.
12. Nelson JC, Wang R, Asher DT, Wilcox RB. The nature of analogue-based free thyroxine estimates. *Thyroid* 14:1030-6, 2004.
13. Stockigt J. Assessment of thyroid function: towards an integrated laboratory--clinical approach. *Clin Biochem Rev* 24:109-22, 2003.
14. Midgley JE. Direct and indirect free thyroxine assay methods: theory and practice. *Clin Chem* 47:1353-63, 2001.
15. Bartalena L, Bogazzi F, Brogioni S, Burelli A, Scarcello G, Martino E. Measurement of serum free thyroid hormone concentrations: an

- essential tool for the diagnosis of thyroid dysfunction. *Horm Res* 45:142-7, 1996.
16. Nelson JC, Tomei RT. Dependence of the thyroxin/thyroxin-binding globulin (TBG) ratio and the free thyroxin index on TBG concentrations. *Clin Chem* 35:541-4, 1989.
17. Konno N. Serum thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone and free thyroid hormone indices in patients with familial thyroxine-binding globulin deficiency. *Endocrinol Jpn* 23:313-7, 1976.
18. Karmisholt J, Andersen S, Laurberg P. Variation in thyroid function in subclinical hypothyroidism: importance of clinical follow-up and therapy. *Eur J Endocrinol* 164:317-23, 2011.
19. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, Demers LM, Feldt-Rasmussen U, Henry JF, Livolsi VA, Nicolli-Sire P, John R, Ruf J, Smyth PP, Spencer CA, Stockight JR. Guidelines Committee, National Academy of Clinical Biochemistry. Laboratory medicine practice guidelines: Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 13:3-126, 2003. (Versión castellana: Bergoglio LM, Mestman JH. Guía para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tiroidea. *Rev Arg Endocrinol Metab* 42:1-134, 2005).

20. Thienpont LM, Van Uytffanghe K, Poppe K, Velkeniers B. Determination of free thyroid hormones. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27:689-700, 2013
21. Garber JR, Cobin RH, Gharib H, Hennessey JV, Klein I, Mechanick JL, Pessah Pollack R, Singer PA, Woeber KA. American Association of Clinical Endocrinologists and American Thyroid Association Taskforce on Hypothyroidism in Adults. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. *Endocr Pract* 18:988-1028, 2012.
22. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 87:489-99, 2002.
23. Ban Y, Greenberg DA, Davies TF, Jacobson E, Concepcion E, Tomer Y. Linkage analysis of thyroid antibody production: evidence for shared susceptibility to clinical autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3589-96, 2008.
24. Menconi F, Monti MC, Greenberg DA, Oashi T, Osman R, Davies TF, Ban Y, Jacobson EM, Concepcion ES, Li CW, Tomer Y. Molecular amino acid signatures in the MHC class II peptide-binding pocket predispose to

- autoimmune thyroiditis in humans and in mice. *Proc Natl Acad Sci. USA* 105:14034-9, 2008.
25. Strieder TG, Prummel MF, Tijssen JG, Endert E, Wiersinga WM. Risk factors for and prevalence of thyroid disorders in a cross-sectional study among healthy female relatives of patients with autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 59:396-401, 2003.
26. Vejbjerg P, Knudsen N, Perrild H, Laurberg P, Pedersen IB, Rasmussen LB, Ovesen L, Jørgensen T. The association between hypoechogenicity or irregular echo pattern at thyroid ultrasonography and thyroid function in the general population. *Eur J Endocrinol* 155:547-52, 2006.
27. Pedersen OM, Aardal NP, Larssen TB, Varhaug JE, Myking O, Vik-Mo H. The value of ultrasonography in predicting autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 10:251-9, 2000.
28. Dosiou C, Barnes J, Schwartz A, Negro R, Crapo L, Stagnaro-Green A. Cost-effectiveness of universal and risk-based screening for autoimmune thyroid disease in pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 1536–46, 2012.