



NACB: Guía de Consenso para el Diagnóstico y Seguimiento de la Enfermedad Tiroidea
Liliana M. Bergoglio, Bioquímica Endocrinóloga y Jorge H. Mestman, Médico Endocrinólogo

**THE NATIONAL ACADEMY
OF CLINICAL BIOCHEMISTRY**

Guía de Consenso para el Diagnóstico y Seguimiento de la Enfermedad Tiroidea

EDITORES

**Liliana M. Bergoglio
Jorge H. Mestman**



GUÍA DE CONSENSO PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD TIROIDEA

Índice

Presentación de la Edición en Idioma Español.....	III
Prefacio.....	IV
Traducción de la Edición en Idioma Inglés	VI
Sección 1. Prólogo e Introducción	1
Sección 2. Factores pre-analíticos	3
Sección 3. Ensayos tiroideos para el bioquímico y el médico.....	17
A. Tiroxina Total (T4T) y Triyodotironina Total (T3T)	17
B. Tiroxina Libre (T4L) y Triyodotironina Libre (T3L)	19
C. Tirotrofina (TSH)	32
D. Anticuerpos Antitiroideos:	45
• Anticuerpos anti-Peroxidasa Tiroidea (TPOAb)	
• Anticuerpos anti-Tiroglobulina (TgAb)	
• Anticuerpos anti-Receptor de TSH (TRAb)	
E. Tiroglobulina (Tg)	58
F. Calcitonina (CT) y Proto-oncogen RET.....	70
G. Yodo urinario	77
H. Punción Aspirativa con Aguja Fina (PAAF) y Citología Tiroidea.....	83
I. Screening de Hipotiroidismo Congénito	91
Sección 4. Importancia del contacto entre el Laboratorio y los Médicos.....	100
Apéndices y Glosario	104
Referencias	109

Presentación de la Edición en Idioma Español

EDITORES

Liliana M. Bergoglio, Bioquímica Endocrinóloga, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

Jorge H. Mestman, Médico Endocrinólogo, Universidad del Sur de California, Los Angeles, CA, Estados Unidos

Mencionamos con reconocimiento los nombres de los profesionales que participaron en la revisión de la traducción del documento original sobre el cual está basada esta monografía:

Claudio Aranda, Hospital Carlos C. Durand, Buenos Aires, Argentina

Aldo H. Coleoni, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

N. Liliana F. de Muñoz, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina

Silvia Gutiérrez, Hospital Carlos C. Durand, Buenos Aires, Argentina

H. Rubén Harach, Hospital Dr. A. Oñativia, Salta, Argentina

Gustavo C. Maccallini, Hospital Carlos C. Durand, Buenos Aires, Argentina

Mirta B. Miras, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina

Hugo Niepomniszcze, Universidad Nacional de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Adriana Oneto, Hospital Carlos C. Durand, Buenos Aires, Argentina

Eduardo Pusiol, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina

Gerardo C. Sartorio, Hospital J. M. Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina

Prefacio

Las pruebas bioquímicas constituyen el pilar fundamental para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tiroidea. A pesar de los avances en los instrumentos de medición y las mejoras en la sensibilidad y especificidad de los ensayos actuales, todavía se observa variabilidad método a método y susceptibilidad a las interferencias.

La amplia variedad de herramientas disponibles para evaluar la función tiroidea, generó por parte de numerosas organizaciones profesionales la idea de racionalizar su uso mediante recomendaciones prácticas que no excluyeran la relación costo-beneficio.

La National Academy of Clinical Biochemistry (NACB), integrante de la Asociación Americana de Química Clínica, continuando con el propósito de ofrecer pautas de consenso sobre pruebas de laboratorio relacionadas con distintas patologías, alentó y respaldó la elaboración de esta monografía, dedicada a médicos y profesionales del laboratorio clínico. Sin duda, de las recomendaciones elaboradas por la NACB hasta el presente, las de Tiroides han sido las más difundidas.

Las recomendaciones, surgieron a partir de un proceso colaborativo que involucró a múltiples organizaciones de todo el mundo dedicadas a estudiar los problemas de tiroides. Miembros de la Asociación Americana de Química Clínica, Asociación Americana de Endocrinología Clínica, Asociación de Tiroides de Asia y Oceanía, Asociación Americana de Tiroides, Asociación Británica de Tiroides, Sociedad Americana de Endocrinología, Asociación Europea de Tiroides, y Asociación Latinoamericana de Tiroides, dedicaron tiempo y experiencia a la elaboración o a la crítica del texto final, y son reconocidos en el apéndice A.

El objetivo era establecer pautas de consenso a nivel internacional, y paralelamente identificar los aspectos para los cuales un consenso era muy difícil de lograrse a causa de las asimetrías culturales, político-económicas, medioambientales y nutricionales entre los distintos países.

Con la conciencia de estas divergencias, el proceso de revisión global fue considerado crítico. Pero sorprendentemente, la mayoría de las pautas contenidas en esta monografía alcanzaron un consenso superior al 95%.

El proceso, llevó dos años. El primer borrador se elaboró con el valioso aporte de los manuscritos solicitados a los expertos reconocidos en el Prólogo, y fue distribuido en el Congreso Internacional de Tiroides en Kyoto en octubre del 2000 y exhibido en el sitio web de la NACB (www.nacb.org) durante el año 2001 para su discusión. Las recomendaciones básicas también fueron presentadas en sesiones destinadas a edificar el consenso en varios eventos científicos durante el mismo año.

Los resultados de estas sesiones, junto con los de la revisión electrónica, fueron utilizados para desarrollar un segundo borrador que fue puesto en el sitio web de la NACB en enero del 2002 para el comentario final. El texto fue concluido para la publicación y la visualización electrónica en junio del 2002, y fue publicado como el número de enero del 2003 de la revista *Thyroid* (*Thyroid* 2003; 13: 4-126).

La presente traducción al idioma español corresponde a esa actualización. La monografía ha sido traducida también a los siguientes idiomas: polaco, ruso, francés, y está en proceso la versión en chino.

Las recomendaciones están orientadas a integrar los aspectos técnicos de las pruebas bioquímicas y citológicas para evaluar la función tiroidea, con los criterios de comportamiento analítico necesarios para su óptima utilización clínica en un entorno global cada vez más sensible a los costos. Están diseñadas para ofrecer a médicos y bioquímicos una descripción de la robustez y de las limitaciones de estas pruebas. En este contexto, es deseable que la información presentada ayude a los médicos a actuar en forma conjunta y eficaz con el laboratorio cuando se introduzca o se cambie un método, o cuando un resultado sea discordante con la clínica del paciente. Los laboratorios, a su vez, deberían poder definir, a partir de ellas, su perfil de eficiencia óptimo.

La importancia de esta relación entre el laboratorio y los médicos se enfatiza en cada capítulo.

La monografía provee información bioquímica y clínica actualizada contenida en secciones referidas a Factores Pre-analíticos, determinación de Hormonas Tiroideas Totales y Libres, Anticuerpos Antitiroideos, TSH, Tiroglobulina, Calcitonina y proto-oncogen RET, mediciones de Yodo, Punción Aspirativa con Aguja Fina (PAAF) y Screening para el Hipotiroidismo Congénito.

Estas recomendaciones fueron objeto de unanimidad en cuanto a su necesidad, pero de manera esperable apareció la primera limitación que es la de conciliar esa necesidad con su insuficiencia actual para abarcar una realidad global.

En los intentos de consensuar, nunca es posible unificar de manera ideal todas las opiniones, especialmente cuando existen asimetrías como las mencionadas entre distintos países, por lo cual, realidades muy diferentes deberían continuar siendo abordadas de maneras originales.

Sin embargo, los procesos de consenso conllevan una necesaria gradualidad, continuando con la cual, los diálogos críticos podrán incrementarse en la medida en que con la traducción a más idiomas, la información presentada tenga aún mayor difusión.

Por otra parte, ninguna pauta debería ser estática, y es en este sentido, que se espera que los comentarios y las críticas, que puedan sumarse luego de la lectura del texto en español, puedan contribuir al enriquecimiento de una futura versión.

Liliana M. Bergoglio
Jorge H. Mestman
Carole A. Spencer



Traducción de la Edición en Idioma Inglés

EDITORES

Laurence M. Demers, Ph.D., F.A.C.B.
Carole A. Spencer Ph.D., F.A.C.B.

Comisión de Redacción:

La revisión de esta monografía en la versión original en Inglés se ha logrado gracias al aporte experto de los Editores, de los miembros de la Comisión de Recomendaciones, de los especialistas que enviaron manuscritos para cada sección y de los revisores incluidos en el Apéndice A. El material de esta monografía representa las opiniones de los editores y no refleja la posición oficial de la National Academy of Clinical Biochemistry ni de ninguna de las organizaciones co-patrocinantes. La National Academy of Clinical Biochemistry es la Academia Oficial de la American Association of Clinical Chemistry.

Se permite la impresión de copias individuales para uso personal de fuentes autorizadas en Internet tales como la Página de Inicio (Home Page) de NACB (www.nacb.org), siempre que los trabajos se impriman en su totalidad y se incluya el presente aviso. Además se permite la impresión para uso personal de párrafos extraídos del documento siempre que el usuario también imprima e incluya la página inicial y las de la portada y contraportada correspondientes al material seleccionado, o bien que se identifique claramente a la NACB como autora del material. No se permite la reproducción total ni parcial de este documento bajo ninguna otra circunstancia, su almacenamiento en un sistema de búsqueda, su traducción a otros idiomas, ni su transmisión en ninguna forma sin el permiso expreso por escrito de la National Academy of Clinical Biochemistry (NACB, 2101 L Street, N.W., Washington, DC 20037-1526). Generalmente se otorgan permisos siempre que el logo de la NACB y el siguiente anuncio se destaquen en la portada del documento: *Reproducido (traducido) con permiso de la National Academy of Clinical Biochemistry, Washington, DC*

Es posible adquirir copias individuales o múltiples solicitándolas a la NACB en la dirección anterior o bien a través de la Página de Inicio (www.nacb.org).

©2002 de la National Academy of Clinical Biochemistry.

Expresamos nuestro agradecimiento a los siguientes profesionales que aportaron los manuscritos originales sobre los que se basa esta monografía:

Zubair Baloch, M.D., Ph.D.

Dept. of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Pennsylvania Medical Center, Filadelfia, PA, EE.UU.

Laurence M. Demers, Ph.D., F.A.C.B.

Pennsylvania State University College of Medicine
M. S. Hershey Medical Center, Hershey, PA, EE.UU.

Pierre Carayon, M.D., D.Sc

U555 INSERM and Department of Biochemistry & Molecular Biology,
University of the Medeterranea Medical School, Marsella, Francia

Bernard Conte-Devolx, M.D. Ph.D.

U555 INSERM and Department of Endocrinology,
University of the Medeterranea Medical School, Marsella, Francia

Ulla Feldt Rasmussen, M.D.

Department of Medicine, National University Hospital, Copenhagen, Dinamarca

Jean-François Henry M.D.

U555 INSERM and Department of Endocrine Surgery,
University of the Medeterranea Medical School, Marsella, Francia

Virginia LiVolsi, M.D.

Dept. of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Pennsylvania Medical Center, Filadelfia, PA, EE.UU.

Patricia Niccoli-Sire, M.D.

U555 INSERM and Departments of Endocrinology and Surgery
University of the Medeiterranea Medical School, Marsella, Francia

Rhys John, Ph.D., F.R.C.Path,

University Hospital of Wales, Cardiff, Gales, Reino Unido

Jean Ruf, M.D.

U555 INSERM and Department of Biochemistry & Molecular Biology,
University of the Medeiterranea Medical School, Marsella, Francia

Peter PA Smyth, M.S., Ph.D.

University College Dublin, Dublín, Irlanda

Carole A. Spencer, Ph.D., F.A.C.B.

University of Southern California, Los Angeles, CA, EE.UU.

Jan R. Stockigt, M.D., F.R.A.C.P., F.R.C.P.A.,

Ewen Downie Metabolic Unit, Alfred Hospital, Melbourne, Victoria, Australia



Sección 1. Prólogo e Introducción

Los médicos necesitan el respaldo de un laboratorio de alta calidad para lograr un diagnóstico preciso y un manejo efectivo, y a un costo razonable de los problemas tiroideos. En algunos casos, cuando hay una sospecha clínica fuerte de disfunción tiroidea, por ejemplo en el hipertiroidismo clínico en un adulto joven, o ante la presencia de una masa tiroidea de crecimiento rápido, las pruebas de laboratorio simplemente confirman la sospecha clínica. Pero en la mayoría de los pacientes, los síntomas son tan sutiles que la patología sólo se puede detectar mediante una evaluación bioquímica o citopatológica. Independientemente de cuán evidente o poco claro sea el problema, es fundamental lograr la amplia colaboración entre médicos y profesionales del laboratorio para alcanzar un manejo óptimo y efectivo en costos del paciente.

La disfunción tiroidea, en especial el hipotiroidismo causado por deficiencia de yodo, es un problema mundial de la salud pública, pero la carencia de yodo no es un problema que afecta de manera homogénea a la población de un mismo país. Estudios tanto europeos como estadounidenses sugieren que esta deficiencia debería considerarse más bien como un “problema localizado”, es decir que puede tener una mayor prevalencia en algunas áreas de un país que en otras (1-3). La creación de esta Monografía de Consenso es el resultado de un esfuerzo conjunto que involucró a muchos especialistas en tiroides de una serie de organizaciones profesionales mundiales dedicadas a la patología tiroidea: American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), Asia & Oceania Thyroid Association (AOTA), American Thyroid Association (ATA), British Thyroid Association (BTA), European Thyroid Association (ETA) y Latin American Thyroid Society (LATS). Estas organizaciones son líderes en materia de tiroides y han publicado normas para el tratamiento de la enfermedad tiroidea en cada región del mundo. Debido a que los factores geográficos y económicos influyen en el uso de los métodos para explorar la función tiroidea, esta monografía se centrará en los aspectos técnicos de dichas pruebas y en los criterios de calidad necesarios para su utilización óptima en un entorno global cada vez más afectado por los costos. Los médicos y los laboratorios del mundo se inclinan de manera individual por diferentes estrategias para evaluar la función tiroidea. (4). La presente Guía de Consenso no puede abarcar toda esta gama de opiniones, sin embargo, se espera que sus lectores aprecien los esfuerzos realizados para conciliar algunas de estas diferencias en una estrategia recomendable. El texto incluye la mayoría de los ensayos y procedimientos en general realizados para diagnosticar y tratar la enfermedad tiroidea, de manera que pueda ofrecer tanto al bioquímico como al médico un panorama general de la capacidad y de las limitaciones actuales de aquellos de uso más generalizado. Las recomendaciones se acordaron con un 95% de consenso, a menos que se indique lo contrario. Se halla abierta la recepción de comentarios que pudieran mejorar la presente monografía para una próxima revisión.

A. Recursos adicionales

Las recomendaciones clínicas vigentes, están publicadas en las referencias 4-11. Además, los libros de texto “Thyroid” y “The Thyroid and Its Diseases” (www.thyroidmanager.org) son también referencias útiles (12,13). El sitio web de la American Thyroid Association (ATA) (www.thyroid.org) ofrece una lista de los síntomas que sugieren enfermedad tiroidea, junto con los códigos ICD-9 recomendados a Medicare. Las recomendaciones pueden variar en función de las diferentes regiones del mundo. Se puede obtener mayor información en cada una de las organizaciones nacionales e internacionales de tiroides: Asia & Oceania Thyroid Association (AOTA: www.dnm.kuhp.kyoto-u.ac.jp/AOTA); American Thyroid Association (ATA: www.thyroid.org); European Thyroid Association (ETA: www.eurothyroid.com) y Latin American Thyroid Society (LATS: www.lats.org).

B. Perspectiva histórica

Durante los últimos cuarenta años los avances en la sensibilidad y especificidad de los métodos bioquímicos para evaluar la función tiroidea, el desarrollo de la punción aspirativa con aguja fina (PAAF) y las mejoras en las técnicas citológicas han tenido un notable impacto en las estrategias clínicas para diagnosticar y tratar la enfermedad tiroidea. En la década del 50, sólo se disponía de una prueba tiroidea sérica, una estimación indirecta de la concentración de tiroxina total circulante (TT4) (libre y unida a proteínas), mediante la técnica del yodo unido a proteínas (PBI). En la actualidad, la concentración urinaria

de yodo se determina directamente mediante las técnicas de cenizas secas o húmedas y se la utiliza para calcular la ingesta de yodo en la dieta. El desarrollo de inmunoensayos competitivos a principios de la década del 70 y más recientemente de ensayos inmunométricos “sandwich” no competitivos (IMA) ha mejorado gradualmente la especificidad y sensibilidad de los ensayos tiroideos. Actualmente están disponibles las determinaciones séricas de hormonas tiroideas circulantes totales (T4T y T3T) y libres (T4L y T3L) (14,15). Además se cuenta con las determinaciones de proteínas transportadoras de hormonas tiroideas: Globulina transportadora de tiroxina (TBG), Transtiretina (TTR) / Prealbúmina (TBPA) y Albúmina (16). Los avances en la sensibilidad de los ensayos de Tirotrofina (TSH), posibilitaron su uso para la detección tanto del hiper como del hipotiroidismo. Además, las determinaciones séricas de Tiroglobulina (Tg), proteína precursora de las hormonas tiroideas, y de Calcitonina (CT) se han convertido en importantes marcadores tumorales para el manejo de pacientes con carcinomas tiroideos diferenciados y medulares, respectivamente. El reconocimiento de que la autoinmunidad es una causa muy importante de disfunción tiroidea ha conducido al desarrollo de métodos más sensibles y específicos para autoanticuerpos anti-peroxidasa tiroidea (TPOAb), anti-tiroglobulina (TgAb) y anti-receptor de TSH (TRAb). Actualmente, los ensayos tiroideos de rutina se realizan en muestras de suero por métodos automáticos o manuales que utilizan anticuerpos específicos (17). La metodología continúa evolucionando a medida que se establecen normas de calidad y se desarrollan nuevas tecnologías e instrumentos.

Sección 2. Factores Pre-analíticos

Afortunadamente, la mayor parte de las variables pre-analíticas tienen poco efecto en la determinación de TSH, el análisis más comúnmente utilizado para evaluar el estado tiroideo en pacientes ambulatorios. Las variables analíticas, y la presencia de sustancias interferentes en la muestra, pueden influir en la unión de las hormonas tiroideas a las proteínas plasmáticas, y así disminuir la exactitud de un diagnóstico basado en las determinaciones de hormonas tiroideas totales y libres más que en las de TSH (ver Tabla 1). Como se discutirá más adelante [Sección-2 B2 y Sección-3 B3(c)viii] los valores de T4L y de TSH pueden conducir a diagnósticos erróneos en pacientes hospitalizados con enfermedades severas no tiroideas (NTI). De hecho, estos pacientes eutiroideos, con frecuencia presentan valores anormales de TSH y/o de hormonas tiroideas totales y libres. Lo mismo puede ocurrir por ingestión de medicamentos que interfieren con la secreción o la síntesis hormonal. Cuando existe una sospecha importante de que alguna de estas variables pudiera afectar los resultados de los ensayos, es necesario consultar con el médico o el bioquímico especialistas.

TABLA 1. CAUSAS DE DISCORDANCIA ENTRE T4L Y TSH EN AUSENCIA DE ENFERMEDAD GRAVE ASOCIADA

Ensayo discordante	Resultado		Causas probables	Acción a realizar
	TSH	T4L		
T4L	↑	N	1. Hipotiroidismo leve (subclínico) no tratado 2. o tratado con dosis inadecuada de L-T4, o no adhesión al tratamiento	1. Determinar TPOAb. Confirmar TSH después de 6 semanas 2. Aumentar la dosis de L-T4. aconsejar cumplimiento del tratamiento
	↓	N o ↓	1. Hipertiroidismo leve (subclínico) 2. Sobretratamiento con T3	1. ¿Bocio funcionante autónomo? 2. Determinar T3L para descartar tirotoxicosis por T3
	N	↑	1. Común durante el tratamiento con L-T4 2. Alteraciones en las proteínas transportadoras (por ejemplo en la FDH) 3. Interferencia por anticuerpos (anticuerpo anti T4, HAMA o factor reumatoideo)	1. Situación esperada en el trat. del hipotiroidismo que debe controlarse 2 y 3. Determinar la T4L con un método alternativo, idealmente con alguno que use separación física (por ejemplo diálisis de equilibrio o ultrafiltración)
	N	↓	1. Fármacos que compiten con las proteínas transportadoras [ver Sección-3 B3 (c) vi] 2. Embarazo	1. Determinar la T4L mediante un método que use dilución mínima 2. Determinar la T4L con un método insensible a la albúmina. Usar rangos de referencia específicos para el método y para cada trimestre.
TSH	↑	N	1. Desequilibrio (primeras 6 a 8 semanas de trat. con L-T4 para el hipotiroidismo primario) 2. HAMA y otras interferencias	1. Controlar nuevamente la TSH antes de ajustar la dosis de L-T4. Una TSH alta persiste meses después del trat. para el hipotiroidismo severo 2. Controlar la TSH (nueva muestra) con un método alternativo
	↓	N	1. Desequilibrio (primeros 2 a 3 meses post trat. para el hipertiroidismo) 2. Medicamentos (por ejemplo glucocorticoides, dopamina)	1. Usar T4L y T3L al comienzo del trat. del hipertiroidismo para controlar el estado tiroideo. La TSH puede demorar meses en normalizarse después de iniciado el trat. para el hipertiroidismo severo
	N o ↑	↑	1. Adenoma hipofisario secretante de TSH	1. Controlar la TSH (nueva muestra) con un método alternativo 2. Hacer prueba de TRH/TSH o prueba de supresión con L-T3 o L-T4 3. Medir sub unidad alfa de TSH 4. Realizar estudios de imágenes de la hipófisis
	N	↓	1. Hipotiroidismo central	Evaluar: 1. ¿bioactividad reducida de la TSH inmunorreactiva? 2. ¿otros signos de deficiencia hipofisaria? 3. ¿respuesta plana al TRH?

Además de la variabilidad fisiológica intrínseca, factores individuales, tales como anomalías genéticas en las proteínas transportadoras, o enfermedades severas no tiroideas (NTI) pueden influir en la sensibilidad y en la especificidad clínicas de un ensayo. Asimismo, factores iatrogénicos como la administración de medicamentos tiroideos y no tiroideos (por ejemplo: glucocorticoides, betabloqueantes), y otros factores en la muestra, como la presencia de autoanticuerpos anti-hormonas tiroideas, anti-Tg, y anticuerpos heterófilos (HAMA) puede afectar la exactitud del diagnóstico al conducir a una interpretación errónea del resultado de un ensayo. La Tabla 2 enumera los factores pre-analíticos que se deben considerar en la interpretación de los ensayos tiroideos.

A. Variables fisiológicas

En la práctica, en los adultos ambulatorios, variables como edad, sexo, raza, estación del año, fase del ciclo menstrual, hábito de fumar, actividad física, ayuno o estasis venosa inducida por la flebotomía, ejercen efectos menores sobre los rangos de referencia de los ensayos tiroideos (18). Dado que las diferencias debido a estas variables fisiológicas son menores que las diferencias entre los distintos métodos de ensayo, se las considera insignificantes, en la práctica clínica.

Tabla 2.

A. Variables fisiológicas	<ul style="list-style-type: none">• Relación TSH/T4L• Edad• Embarazo• Variación biológica
B. Variables patológicas	<ul style="list-style-type: none">• Disfunción tiroidea• Disfunción hepática o renal• Medicamentos• Enfermedades sistémicas
C. Variables propias de las muestras	<ul style="list-style-type: none">• Factores interferentes

Recomendación N° 1. Orientación General para los Laboratorios y los Médicos

- Los laboratorios deberían conservar (entre 4 y 8°C) las muestras de suero utilizadas para los ensayos tiroideos por lo menos durante una semana después de que se hayan informado los resultados a fin de permitir a los médicos solicitar pruebas adicionales.
- Las muestras provenientes de pacientes con cáncer diferenciado de tiroides (CDT) enviadas para determinaciones de Tiroglobulina (Tg) sérica se deberían conservar (a -20°C) durante seis meses como mínimo.

1. Relación TSH / T4L

La comprensión de la relación normal que existe entre los niveles séricos de T4 libre (T4L) y TSH es esencial para la interpretación de los ensayos tiroideos. Un eje hipotálamo-hipofisario intacto es un requisito necesario si se quieren usar las determinaciones de TSH para diagnosticar disfunción tiroidea primaria (19). Varias condiciones clínicas y agentes farmacológicos pueden alterar la relación T4L / TSH. Como muestra la Tabla 1 es más frecuente encontrar falsos resultados en la determinación de T4L que en la de TSH.

Cuando la función hipotálamo-hipofisaria es normal, se produce una relación logarítmica / lineal inversa entre la TSH y la T4L séricas por la retroalimentación negativa que ejercen las hormonas tiroideas inhibiendo la secreción de TSH hipofisaria. Por lo tanto, la función tiroidea se puede determinar directamente, midiendo el producto primario de la glándula tiroides, T4 (preferentemente como T4 libre) o indirectamente, midiendo TSH, que refleja (de manera inversa) la concentración de la hormona tiroidea detectada por la hipófisis. De esto se desprende que una TSH elevada y una T4L baja son características del hipotiroidismo, mientras que una TSH baja y una T4L elevada lo son del hipertiroidismo. De hecho, desde que ha mejorado la sensibilidad y especificidad de los ensayos de TSH, se acepta que el procedimiento indirecto (determinación de TSH sérica) ofrece una mayor sensibilidad para la detección de disfunción tiroidea que el procedimiento directo (determinación de T4L) (10).

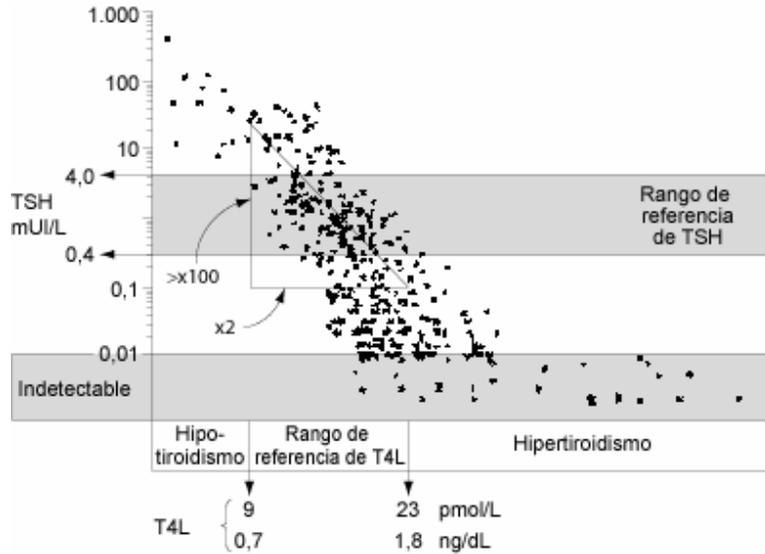


Fig 1. Relación entre la TSH y la T4L séricas en individuos que presentan un estado tiroideo estable y una función hipotálamo-hipofisaria normal. Adaptado de la referencia (20).

Existen dos razones para utilizar una estrategia diagnóstica basada en la TSH para pacientes ambulatorios:
 1) Como lo muestra la Figura 1, las concentraciones séricas de TSH y de T4L presentan una relación inversa logarítmica / lineal, de manera tal que ligeras modificaciones en la T4L producirán una respuesta mucho mayor (amplificada) en la TSH (20).

2) Las variaciones individuales en los valores de los ensayos tiroideos junto con estudios realizados en gemelos sugieren que cada individuo tiene un nivel propio de T4L genéticamente determinado (21, 22). Cualquier exceso o deficiencia leves de T4L será detectado por la hipófisis con relación al valor de T4L propio de ese individuo en particular, y provocará una respuesta amplificada e inversa en la secreción de TSH. En consecuencia, en las primeras etapas de la disfunción tiroidea, una anomalía en la TSH precederá a una anomalía en la T4L, ya que la TSH responde exponencialmente a cambios sutiles de la T4L que aún se halla dentro de los límites de referencia de la población. Esto se debe a que los límites de referencia de T4L de la población son amplios, y reflejan los diferentes niveles individuales de la cohorte de sujetos normales incluidos en el estudio para determinar el rango de referencia.

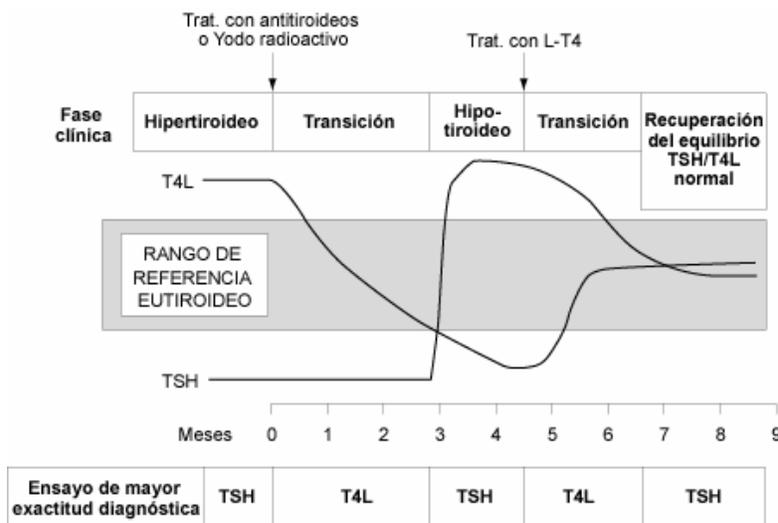


Fig 2. Demora en la reestabilización de la TSH hipofisaria durante los períodos de transición con estado tiroideo inestable posteriores al tratamiento del hiper o del hipotiroidismo.

Recomendación N° 2 Ensayos para evaluar la función tiroidea en pacientes ambulatorios

- *Pacientes con estado tiroideo estable:* Cuando el estado tiroideo es estable y la función hipotálamo-hipofisaria está intacta, la determinación de TSH es más sensible que la de T4L para detectar exceso o deficiencia leves (subclínicos) de hormonas tiroideas. La mayor sensibilidad diagnóstica de la TSH refleja la relación logarítmica / lineal que existe entre TSH y T4L, y la gran sensibilidad de la hipófisis para detectar las anomalías de T4L en relación con el nivel genéticamente determinado para cada individuo.
- *Pacientes con estado tiroideo inestable:* La determinación de T4L es un indicador más confiable del estado tiroideo que la TSH cuando el estado tiroideo es inestable, como por ejemplo durante los 2 ó 3 primeros meses de tratamiento para el hipo o el hipertiroidismo. Los pacientes con hipotiroidismo severo crónico pueden desarrollar hiperplasia del tirotrofo hipofisario que quizás simule un adenoma hipofisario, pero que se resuelve después de varios meses de tratamiento con L-T4. En pacientes hipotiroideos en los que se sospecha falta de cumplimiento con la terapia de reemplazo con L-T4, el seguimiento se debería realizar con ambas determinaciones: TSH y T4L, ya que estos pacientes pueden presentar valores discordantes de TSH y de T4L (TSH elevada / T4L elevada) debido a un desequilibrio persistente entre ambas.

En la actualidad, la determinación de TSH sérica es el indicador más confiable del estado tiroideo a nivel tisular. En los estudios de exceso o deficiencia leves de hormona tiroidea (TSH anormal / T4L y T3L normales) se observan anomalías en los marcadores de acción de la hormona tiroidea en diversos tejidos (corazón, cerebro, hueso, hígado y riñón). Estas anomalías generalmente se revierten cuando se inicia el tratamiento para normalizar la TSH (23-26).

Es importante reconocer las situaciones clínicas en las que los valores de TSH o de T4L pueden generar un diagnóstico erróneo. Entre ellas se incluyen anomalías en la función hipotalámica o hipofisaria, incluyendo tumores hipofisarios productores de TSH (27-29). Además, como se muestra en la Figura 2, los valores de TSH resultan equívocos para el diagnóstico durante los períodos transitorios de estado tiroideo inestable, como el que se presenta en la fase temprana del tratamiento para el hiper o el hipotiroidismo, o en el cambio de dosis de L-T4. Se necesitan entre 6 y 12 semanas para que la TSH hipofisaria se reequilibre de acuerdo al nuevo estado de hormonas tiroideas (30). Estos períodos de estado tiroideo inestable también pueden presentarse luego de una tiroiditis, incluyendo la tiroiditis post parto durante la cual es posible observar discordancia entre TSH y T4L.

Las drogas que influyen en la secreción hipofisaria de TSH (por ejemplo, dopamina, glucocorticoides, etc.) o que alteran la unión de las hormonas tiroideas a las proteínas plasmáticas, también pueden provocar valores discordantes de TSH [Sección-3 B3(c)vi].

2. Efectos de la edad cronológica sobre los rangos de referencia de los ensayos tiroideos

(a) Adultos

A pesar de que ciertos estudios muestran diferencias leves entre individuos jóvenes y de mayor edad, no es necesario desarrollar rangos de referencia ajustados por edad en adultos, para hormonas tiroideas ni para TSH. Con respecto a los individuos añosos eutiroideos, el valor medio de TSH aumenta cada década, lo mismo que la prevalencia de concentraciones bajas y altas, en comparación con individuos más jóvenes (18, 34, 35). A pesar de la amplia variabilidad de TSH sérica observada a su vez en individuos de mayor edad, tampoco parece justificarse el uso de un rango de referencia más amplio ni ajustado por edad en estos individuos (31, 32). Este enfoque conservador se justifica en base a estudios que sostienen que la TSH sérica ligeramente suprimida o elevada se asocia con un aumento en la morbilidad y mortalidad cardiovasculares. (36, 37).

(b) Neonatos, infantes y niños

En los niños, el eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo sufre una maduración y un cambio progresivos. Específicamente, hay una continua disminución en la relación TSH/T4L desde la mitad de la gestación hasta que se completa la pubertad (38-43). Como resultado, en los niños habitualmente se observan concentraciones más altas de TSH (44). Este proceso de maduración determina el uso en pediatría de límites de referencia específicos para cada edad. Sin embargo, existen diferencias significativas entre las determinaciones de T4L y de TSH en función de los métodos empleados [ver Secciones 3B y 3C]. Debido a que la mayoría de los fabricantes de equipos de reactivos no ha establecido intervalos de referencia específicos para cada edad, estos pueden ser calculados para los diferentes ensayos ajustando los límites superior e inferior del rango de referencia adulto por medio de la relación entre los valores de niños vs adultos, como se indica en la Tabla 3.

Durante el período neonatal, la privación calórica y en las personas afeadas, se observa una disminución en la T3 sérica total y libre (determinadas por la mayoría de los métodos) En el último trimestre del embarazo la T3 libre también se encuentra disminuida (15). Además, es típico observar concentraciones más elevadas de T3 total y libre en niños eutiroideos. Esto sugiere que el límite superior de T3 para pacientes jóvenes (menores de 20 años) debería establecerse como un gradiente: entre 6,7 pmol/L (4,4 pg/mL) para los adultos y 8,3 pmol/L (5,4 pg/mL) para los niños menores de 3 años de edad (45).

Tabla 3*. Rangos de referencia relativos para TSH y T4L durante la gestación e infancia

Edad	TSH Relación Niño/Adulto	Rangos de TSH mUI/L	T4L Relación Niño/Adulto	Rangos de T4L pmol/L (ng/dL)
Feto a mitad de la gestación	2,41	0,7-11	0,2	2-4 (0,15-0,34)
Suero del cordón de neonatos con bajo peso al nacer	4,49	1,3-20	0,8	8-17 (0,64-1,4)
Recién nacidos a término	4,28	1,3-19	1	10-22 (0,8-1,9)
3 días	3,66	1,1-17	2,3	22-49 (1,8-4,1)
10 semanas	2,13	0,6-10	1	9-21 (0,8-1,7)
14 meses	1,4	0,4-7,0	0,8	8-17 (0,6-1,4)
5 años	1,2	0,4-6,0	0,9	9-20 (0,8-1,7)
14 años	0,97	0,4-5,0	0,8	8-17 (0,6-1,4)
Adultos	1	0,4-4,0	1	9-22 (0,8-1,8)

* Datos tomados de la referencia (42). T4L determinada por diálisis de equilibrio directa.

Recomendación N° 3. Ensayos para evaluar la función tiroidea en niños

El eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo madura durante la infancia hasta el final de la pubertad.

- Las concentraciones de TSH y T4L son más altas en niños, especialmente en la primera semana de vida y durante el primer año. No reconocer esto podría provocar la pérdida del diagnóstico o el subtratamiento de casos de hipotiroidismo congénito.
- Deberían usarse valores de referencia ajustados por edad para todos los ensayos. (Ver tabla 3).

3. Embarazo

Durante el embarazo, la producción de estrógenos aumenta progresivamente, elevando la concentración de TBG. Los valores de TBG aumentan al doble o triple de los niveles previos al embarazo, y alcanzan un plateau hacia las 20 semanas de gestación (46, 47). Este aumento de TBG provoca un cambio en los rangos de referencia de T4T y T3T, hacia las 16 semanas de gestación, de aproximadamente 1,5 veces con respecto a los niveles de no embarazadas. (48-50). Estos cambios se asocian con una disminución en la TSH sérica durante el primer trimestre, de modo que es posible observar valores subnormales de TSH en aproximadamente el 20% de los embarazos normales (46, 47, 51). Esta disminución en la TSH se atribuye a la actividad estimulante de la tiroides de la gonadotropina coriónica humana (hCG), que tiene homología estructural con la TSH (52, 53). El pico de hCG y el nadir de TSH se producen simultáneamente alrededor de las 10 a 12 semanas de gestación. En aproximadamente el 10% de esos casos (es decir, en el 2% de todos los embarazos), el aumento de T4 libre alcanza valores supranormales, que cuando se prolongan, pueden provocar un síndrome denominado “tirototoxicosis gestacional transitoria” (TGT) caracterizado por síntomas y signos más o menos pronunciados de tirototoxicosis (52-54). Esta condición se asocia con frecuencia con hiperemesis en el primer trimestre del embarazo (55, 56).

La disminución de TSH durante el primer trimestre del embarazo se asocia con un modesto aumento de T4L (46, 47, 51). A partir de entonces, en el segundo y tercer trimestres se ha consensuado una disminución de T4L y T3L de aproximadamente entre el 20 y el 40 por ciento por debajo de la media normal, disminución que se intensifica cuando el estado nutricional de la madre con respecto al yodo está restringido o es deficiente. (46, 47, 51). En algunos casos, la T4L puede caer por debajo del límite inferior de referencia para pacientes no embarazadas (51, 57-60). La frecuencia de concentraciones de T4L subnormales es dependiente del método utilizado para la determinación. (57, 59, 60). Las pacientes que reciben terapia de reemplazo con L-T4 y quedan embarazadas pueden necesitar un aumento en la dosis para mantener los niveles de TSH normales (61, 62). El estado tiroideo de dichas pacientes se debería controlar con TSH + T4L en cada trimestre. La dosis de L-T4 se debería ajustar para mantener normales las concentraciones de TSH y de T4L. Las concentraciones séricas de Tg, en general aumentan durante el embarazo normal (46). Las pacientes con carcinoma diferenciado de tiroides (CDT) con tejido tiroideo remanente, muestran un incremento característico de dos veces en la Tg sérica, que vuelve al nivel basal hacia las 6 a 8 semanas después del parto.

Recomendación N° 4. Ensayos para evaluar la función tiroidea en pacientes embarazadas

Es cada vez mayor la evidencia que sugiere que el hipotiroidismo durante los primeros meses de embarazo tiene un efecto perjudicial sobre el feto (pérdida fetal) y sobre el infante (menor coeficiente intelectual).

- Es importante realizar un screening para disfunción tiroidea determinando TSH y TPOAb antes del embarazo o durante el primer trimestre, tanto para detectar insuficiencia tiroidea leve (TSH > 2,5 mUI/L) como para evaluar el riesgo de tiroiditis post parto (TPOAb elevados).
- Debería considerarse un tratamiento con levotiroxina (L-T4) si el nivel de TSH sérica es >2,5mUI/L en el primer trimestre de embarazo.
- Una concentración elevada de TPOAb durante el primer trimestre es un factor de riesgo para tiroiditis post parto.
- La TSH debería utilizarse para evaluar el estado tiroideo durante cada trimestre cuando las embarazadas reciben tratamiento con L-T4, con determinaciones más frecuentes si se cambia la dosis.
- Deberían utilizarse intervalos de referencia específicos para cada trimestre en los ensayos para embarazadas.
- Las determinaciones de T4T y T3T pueden resultar útiles durante el embarazo si no se dispone de determinaciones confiables de T4L, siempre que los rangos de referencia se aumenten 1,5 veces en relación con los rangos de no embarazadas.
- Los rangos de referencia de T3L y T4L durante el embarazo son dependientes del método empleado y deberían establecerse para cada uno de ellos.
- Deberían evitarse las determinaciones de tiroglobulina sérica (Tg) en los pacientes con CDT durante el embarazo. La Tg sérica se eleva durante el embarazo normal y vuelve a los niveles basales después del parto. Este aumento también se observa en las pacientes con CDT, con tiroides normal remanente o con tejido tumoral presente, y esto no debe ser necesariamente una causa de alarma.

La disminución en la disponibilidad de hormonas tiroideas maternas puede ser un factor crítico que dañe el desarrollo neurológico del feto en las etapas iniciales de gestación, antes de que la glándula tiroidea fetal se active. Varios estudios recientes informan aumento de pérdida fetal y déficit del coeficiente intelectual en los infantes nacidos de madres con hipotiroidismo no diagnosticado, T4L baja o TPOAb positivos (63-65). Sin embargo, un estudio sugiere que el diagnóstico y tratamiento precoces del hipotiroidismo leve pueden evitar los efectos a largo plazo de los niveles bajos de hormonas tiroideas sobre los sistemas sicomotor y auditivo de los neonatos (66).

B. Variables patológicas

1. Medicamentos

Los medicamentos pueden provocar efectos tanto *in vivo* como *in vitro* en los ensayos tiroideos. Esto puede generar una interpretación errónea de los resultados de laboratorio, diagnósticos inadecuados, pruebas adicionales innecesarias y aumento en los costos de salud (67, 68).

(a) Efectos *in vivo*

En general, los medicamentos afectan más las concentraciones de hormonas tiroideas que las de TSH (Tabla 1). Por ejemplo, el aumento de TBG inducido por estrógenos incrementa los niveles de T4T pero no afecta la concentración de TSH, porque la secreción hipofisaria de TSH es controlada por la T4L independientemente de los efectos de las proteínas transportadoras. Los glucocorticoides en dosis elevadas pueden disminuir el nivel de T3 sérica e inhibir la secreción de TSH (69, 70). También la dopamina inhibe la secreción de TSH e incluso puede enmascarar el aumento del nivel de TSH del hipotiroidismo primario en pacientes enfermos hospitalizados (71). El propranolol, a veces utilizado para tratar las manifestaciones de tirotoxicosis tiene un efecto inhibitorio de la conversión de T4 a T3, y administrado en dosis altas a individuos sin enfermedad tiroidea, puede provocar una elevación de TSH como resultado de esta conversión alterada (72).

El yodo, contenido en las soluciones desinfectantes de la piel, en los medios de contraste radiopacos usados en las coronariografías y en las tomografías computadas, puede provocar hiper e hipotiroidismo en individuos predispuestos (73). Además, la amiodarona (medicamento antiarrítmico que contiene yodo) utilizado para el tratamiento de las cardiopatías tiene efectos complejos sobre la función tiroidea y puede producir tanto hipo como hipertiroidismo en individuos predispuestos, con TPOAb positivos (74-78). Los pacientes tratados con L-T4 que toman amiodarona pueden tener niveles de TSH anormalmente elevados en relación con su concentración de T4L (75). Dos tipos de hipertiroidismo inducido por amiodarona (HIA), pueden desarrollarse durante el tratamiento, aunque se observan formas mixtas en el 20% de los casos. A veces es difícil distinguir entre los dos tipos. Un flujo sanguíneo reducido en el examen por Doppler Color y el aumento de interleuquina-6 sugieren el Tipo II (79, 80). Si la etiología es incierta, se debe orientar el tratamiento hacia los tipos I y II.

Recomendación N° 5. Ensayos para evaluar la función tiroidea en pacientes tratados con amiodarona

El tratamiento con amiodarona puede inducir el desarrollo de hipo-o hipertiroidismo entre el 14 y el 18% de los pacientes con glándula tiroidea aparentemente normal o con anomalías preexistentes.

- Antes de instaurar el tratamiento. Examen físico completo de tiroides y determinaciones de TSH y TPOAb basales. Las determinaciones de T4L y de T3L sólo son necesarias si la TSH es anormal. Los TPOAb positivos son un factor de riesgo para el desarrollo de disfunción tiroidea durante el tratamiento.
- Primeros 6 meses.* Se pueden observar pruebas de laboratorio anormales en los primeros seis meses de iniciada la terapia. La TSH puede ser discordante con las hormonas tiroideas (TSH elevada/ T4 elevada / T3 baja), y generalmente se normaliza durante el curso de un tratamiento a largo plazo si los pacientes permanecen eutiroideos.

□ *Seguimiento a largo plazo.* Controlar el estado tiroideo cada 6 meses con TSH. La TSH es el indicador más confiable del estado tiroideo durante el tratamiento.

□ *Hipotiroidismo.* Una tiroiditis de Hashimoto preexistente y/ o un valor positivo de TPOAb es un factor de riesgo para el desarrollo de hipotiroidismo en cualquier momento del tratamiento.

□ *Hipertiroidismo.* Un valor bajo de TSH sugiere hipertiroidismo. La T3 (total y libre) generalmente permanece baja durante el tratamiento pero puede ser normal. Una T3 alta sugiere hipertiroidismo.

Durante el tratamiento, es posible que se desarrollen dos tipos de hipertiroidismo inducido por amiodarona, si bien es frecuente observar formas mixtas (en el 20% de los casos). La distinción entre los dos tipos, con frecuencia es difícil. Un flujo sanguíneo reducido en el examen por Doppler Color y la elevación de interleuquina-6 sugieren el Tipo II. Si la etiología es incierta dirigir el tratamiento a los dos tipos, I y II.

•• *Tipo I* = Inducido por yodo. El tratamiento recomendado es la administración simultánea de tionamidas y perclorato de potasio (si está disponible). Algunos recomiendan ácido iopanoico antes de la tiroidectomía. La mayoría de los grupos recomienda la interrupción de la amiodarona. El tipo I se observa con mayor frecuencia en zonas de baja ingesta de yodo. Sin embargo, en áreas donde el aporte de yodo es suficiente, las captaciones de yodo radiactivo pueden ser bajas excluyendo al radioyodo como opción terapéutica. En regiones con deficiencia de yodo, las captaciones pueden ser normales o elevadas.

- *Tipo Ia:* Bocio nodular. Más frecuente en zonas geográficas con deficiencia de yodo, por ejemplo en Europa.

- *Tipo Ib:* Enfermedad de Graves. Más frecuente en zonas geográficas suficientes en yodo, por ejemplo en Estados Unidos.

•• *Tipo II* = tiroiditis destructiva inducida por amiodarona, enfermedad auto limitada

Tratamiento recomendado: glucocorticoides y/o betabloqueantes si el estado cardíaco lo permite. Cuando el hipertiroidismo es severo, se puede considerar la cirugía con pre-tratamiento con ácido iopanoico. La captación de yodo radiactivo es típicamente baja o inhibida. El Tipo II se observa con mayor frecuencia en áreas suficientes en yodo.

□ *Tipo I:* El HIA parece inducido en las glándulas tiroideas anormales por el exceso de yodo que contiene el medicamento. Se ha utilizado una combinación de tionamidas y perclorato de potasio para tratar estos casos.

□ *Tipo II:* El HIA parece resultar de una tiroiditis destructiva que generalmente se trata con prednisona y tionamidas. Algunos estudios informan niveles elevados de IL-6 en el Tipo II (79). La T3 sérica (libre y total) es típicamente baja durante el tratamiento. Un valor de T3 paradójicamente normal o elevado es útil para reforzar el diagnóstico de hipertiroidismo inducido por amiodarona.

El tratamiento con Litio puede causar hipo o hipertiroidismo en por lo menos el 10% de los pacientes, especialmente en aquellos con TPOAb detectables. (81-83). Algunos agentes terapéuticos y diagnósticos (por ejemplo, Fenitoína, Carbamazepina o Furosemida) pueden inhibir competitivamente la unión de la hormona tiroidea a las proteínas transportadoras en la muestra, y provocar un aumento agudo de T4L que resulta en una disminución de T4T por un mecanismo de retroalimentación (disminución de TSH) y de una mayor eliminación de T4 [ver Sección-3 B3(c)vi].

(b) Efectos in vitro

La administración de Heparina por vía intravenosa, puede liberar ácidos grasos libres (FFA), por la estimulación in-vitro de la lipoproteína lipasa, que inhiben la unión de la T4 a las proteínas séricas, y elevan artificialmente la T4L [Sección-3 B3(c)vii] (84). En ciertas condiciones patológicas como la insuficiencia renal, elementos séricos anormales como el ácido indol acético, se pueden acumular e interferir con la unión de las hormonas tiroideas (85). Los métodos de ensayos tiroideos que utilizan señales fluorescentes pueden ser sensibles a la presencia en la muestra de agentes fluoróscoros terapéuticos o de diagnóstico (86).

2. Enfermedades no tiroideas (NTI).

Los pacientes en estado grave a menudo presentan anomalías en sus pruebas de laboratorio tiroideas pero normalmente no tienen disfunción tiroidea (87, 88). Estas anomalías se observan en las enfermedades críticas tanto agudas como crónicas, y se consideran el resultado de una inhibición central

“desadaptada” de las hormonas liberadoras del hipotálamo, incluido el TRH (89, 90). Para describir este subgrupo de pacientes a menudo se utilizan los términos “enfermedad no tiroidea”, (nonthyroidal illness o NTI) así como también “enfermo eutiroideo” y “síndrome de T3 baja” (91). Como se muestra en la Figura 3, el espectro de cambios en los ensayos tiroideos se relaciona tanto con la severidad como con la etapa de la enfermedad, así como con factores técnicos que afectan los métodos y en ciertos casos, con los medicamentos administrados a estos pacientes.

Se ha demostrado que las determinaciones de T4L y de TSH tienen una especificidad reducida para detectar disfunción tiroidea en los pacientes que tienen NTI severas, en comparación con los pacientes ambulatorios (20, 92, 93). Generalmente se recomienda que la evaluación de la función tiroidea en pacientes hospitalizados se limite a los que tienen síntomas clínicos o antecedentes de disfunción tiroidea (93). Las razones que explican la especificidad reducida de los ensayos tiroideos en estas circunstancias son multifactoriales. Muchos de estos pacientes reciben medicamentos tales como dopaminérgicos, glucocorticoides, furosemida o heparina que inhiben directamente la secreción hipofisaria de TSH o indirectamente la unión de T4 a proteínas, como se describió anteriormente. Además, se ha demostrado que en ciertas condiciones patológicas, las afinidades de las proteínas transportadoras están reducidas, posiblemente por la presencia de inhibidores endógenos circulantes (60, 85, 94-96).

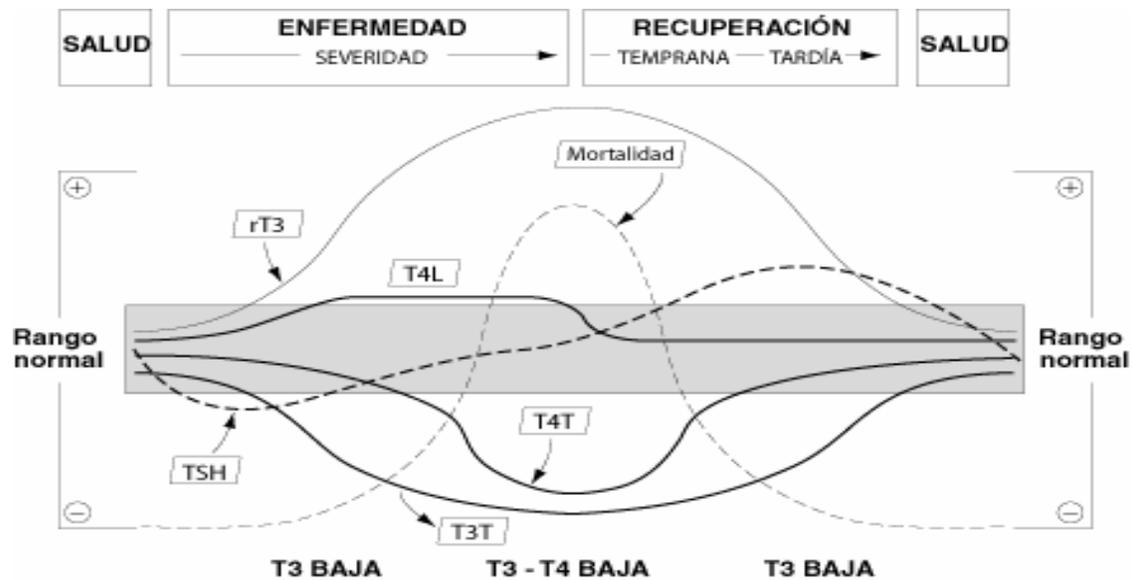


Fig 3. Cambios en los resultados de los ensayos tiroideos durante el curso de una NTI

La mayoría de los pacientes hospitalizados tienen T3T y T3L bajas, determinadas por la mayoría de los métodos (14, 97). A medida que aumenta la severidad de la enfermedad, generalmente cae también la T4T debido a una ruptura de las afinidades de las proteínas transportadoras, causada probablemente por los inhibidores de la unión de T4 presentes en la circulación. (91, 98, 99). Cabe observar que los valores subnormales de T4T sólo se manifiestan cuando la gravedad de la enfermedad es crítica (generalmente en las sepsis). Este tipo de pacientes habitualmente está en la UTI (unidad de terapia intensiva). Si una T4T baja no se asocia con una TSH alta (>20mUI/L) y el paciente no está gravemente enfermo, se debería considerar un diagnóstico de hipotiroidismo central secundario a una deficiencia hipofisaria o hipotalámica.

Recomendación N° 6. Ensayos para evaluar la función tiroidea en pacientes hospitalizados con enfermedad no tiroidea (NTI)

- Las enfermedades no tiroideas agudas o crónicas tienen efectos complejos sobre los resultados de los ensayos de la función tiroidea. Siempre que sea posible, las pruebas diagnósticas deberían postergarse hasta la resolución de la enfermedad, excepto cuando los antecedentes del paciente o su cuadro clínico sugieran la presencia de disfunción tiroidea.

- ❑ Los médicos deberían reconocer que ciertos ensayos tiroideos son fundamentalmente no interpretables en pacientes gravemente enfermos o a quienes se están administrando numerosos medicamentos.
- ❑ La TSH en ausencia de la administración de dopamina o de glucocorticoides, es la determinación más confiable en pacientes con NTI.
- ❑ Las estimaciones de T4 libre o las determinaciones de T4 total en presencia de una NTI deberían interpretarse con cuidado, y en conjunción con la TSH sérica. Las determinaciones combinadas de + TSH constituyen el modo más confiable de distinguir una verdadera disfunción tiroidea primaria (anormalidades concordantes T4/TSH) de las anormalidades transitorias resultantes de las NTI *per se* (anormalidades discordantes T4/TSH).
- ❑ Un ensayo de T4L anormal en presencia de una enfermedad somática severa no es confiable, ya que los métodos de T4L utilizados por los laboratorios clínicos carecen de especificidad diagnóstica para evaluar este tipo de pacientes.
- ❑ Un resultado de T4L anormal en un paciente hospitalizado se debería confirmar con una T4T “refleja”. Es posible que exista patología tiroidea si los valores de T4T y T4L son anormales (en el mismo sentido). Si hay discordancia entre los valores de T4T y T4L, es probable que la anormalidad en la T4L no se deba a una disfunción tiroidea sino que sea consecuencia de la enfermedad, de los medicamentos administrados o de un artefacto del método.
- ❑ Las anormalidades de T4T deberían ser interpretadas en relación con la severidad de la enfermedad, ya que una T4T baja en presencia de NTI generalmente sólo se ve en pacientes severamente enfermos con una alta tasa de mortalidad. Una T4T baja en un paciente que no está en la unidad de cuidados intensivos indica sospecha de hipotiroidismo.
- ❑ Un aumento de T3 total o libre es un indicador útil de hipertiroidismo en un paciente hospitalizado, pero una T3 normal o baja no lo descarta.
- ❑ La determinación de T3 reversa (r-T3) rara vez es útil en el ambiente hospitalario, porque valores paradójicamente normales o bajos pueden resultar de un daño en la función renal o de las concentraciones bajas de proteínas transportadoras. Además, el ensayo no está directamente disponible en la mayoría de los laboratorios.

Las estimaciones de los valores de T4L y de T3L dependen del método utilizado, y pueden estar falsamente elevados o disminuidos en función de los principios metodológicos en los que se basa el ensayo. Por ejemplo, los ensayos de T4L no son confiables si el método es sensible a la liberación de ácidos grasos libres generados *in vitro* después de la inyección de heparina intravenosa [ver Sección-3 B3(c)vii], o a los artefactos de dilución (84, 94, 97, 98, 100, 101). Los métodos de T4L como la diálisis de equilibrio y la ultrafiltración que separan físicamente la hormona libre de la unida a proteínas, habitualmente generan valores normales o elevados en pacientes en estado crítico [véase Sección-2 B2 y Sección-3 B3(c)viii] (94, 102). Los valores elevados, a menudo representan los efectos de la heparina administrada por vía intravenosa (101).

Las concentraciones de TSH sérica permanecen dentro de los límites normales en la mayoría de los pacientes con NTI, siempre que no se les administre dopamina ni glucocorticoides (87, 93). Sin embargo, en las NTI agudas, puede haber una disminución leve y transitoria de TSH en el rango de 0,02-0,3 mIU/L, seguido de un rebote a valores ligeramente elevados durante la fase de recuperación (103). En el ambiente hospitalario, es fundamental usar un ensayo de TSH con sensibilidad funcional óptima: <0,02 mIU/L. Sin esta sensibilidad, es imposible diferenciar de manera confiable los pacientes hipertiroideos enfermos con valores realmente bajos de TSH (< 0,02 mUI/L), de los pacientes que simplemente tienen una supresión leve y transitoria originada por la NTI (0,02-0,3 mUI/L). Las elevaciones menores de TSH son menos confiables para el diagnóstico de hipotiroidismo en el medio hospitalario. Los pacientes hipotiroideos enfermos presentan típicamente una combinación característica de T4 baja y TSH elevada (>20 mUI/L) (92).

Es claro que el diagnóstico y tratamiento de la disfunción tiroidea en presencia de una NTI severa no es simple y que requiere la intervención de un especialista endocrinólogo. El tratamiento empírico del estado de T4T baja en las NTI no ha producido mejoras (en la supervivencia por ejemplo), y aún se lo considera experimental (104-106). Para evaluar a estos pacientes, los ensayos de T4T pueden resultar más útiles que los inmunoensayos de T4L actualmente disponibles, los cuales presentan una importante variabilidad en la eficiencia diagnóstica, siempre que los valores de T4T sean interpretados en relación con la gravedad de la

enfermedad. Por ejemplo, un valor bajo de T4T en las NTI se observa fundamentalmente en los pacientes graves, en general en la unidad de cuidados intensivos (71). Valores bajos de T4T en pacientes hospitalizados que no se encuentran gravemente enfermos deberían instar a la búsqueda de un hipotiroidismo. Aunque la especificidad diagnóstica de la TSH se reduce en presencia de enfermedades somáticas, un valor detectable en el rango de 0,02-20 mUI/L, obtenido con un ensayo con sensibilidad funcional <0,02 mUI/L, normalmente excluye una disfunción tiroidea significativa, siempre que la función hipotálamo-hipofisaria esté intacta y que el paciente no esté recibiendo medicamentos que afecten la secreción hipofisaria de TSH. Sin embargo, es mejor evitar en lo posible las pruebas tiroideas de rutina en pacientes hospitalizados.

C. Variables de las muestras

1. Estabilidad

Pocos estudios han examinado los efectos de la conservación de las muestras de sangre sobre las concentraciones de las hormonas tiroideas séricas totales y libres, de TSH y de Tg (107). En general, estos estudios sugieren que las hormonas tiroideas son relativamente estables si la muestra es conservada a temperatura ambiente, refrigerada o congelada. Ciertos estudios han mostrado que la T4 sérica es estable durante meses a +4°C o durante años a -10°C (108, 109). La TSH y T4T de las gotas secas de sangre total utilizadas en el screening del hipotiroidismo neonatal también son estables durante meses si se las conserva con un desecante. Se ha informado que la TSH sérica es ligeramente más estable que la T4 (110). No obstante, es importante destacar, como se discutió anteriormente, que las muestras no congeladas de pacientes que reciben heparina pueden generar *in vitro* ácidos grasos libres, que pueden provocar una falsa elevación de T4L cuando es determinada por ciertas técnicas (84).

2. Constituyentes del suero

En general, la hemólisis, lipemia e hiperbilirrubinemia no provocan una interferencia significativa en los inmunoensayos. Sin embargo, los ácidos grasos libres pueden desplazar a la T4 de las proteínas de transporte séricas, lo cual explicaría parcialmente los valores de T4T bajos que se observan con frecuencia en las NTI (100).

3. Anticuerpos heterófilos (HAMA)

El suero de los pacientes puede contener anticuerpos heterófilos que pueden ser de dos clases. (111). Algunos son anticuerpos débilmente reactivos, multiespecíficos y polirreactivos que frecuentemente corresponden a un factor reumatoideo (de tipo IgM), y, otros, pueden ser muy reactivos, inducidos por infecciones o exposición a tratamientos con anticuerpos monoclonales (112, 114). Este segundo grupo recibe a veces el nombre de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA). Alternativamente estos anticuerpos pueden corresponder a inmunoglobulinas humanas específicas anti-animal (HAAA) producidas contra antígenos específicos bien definidos luego de una exposición a un agente terapéutico que contenga antígenos de origen animal (por ejemplo anticuerpos murinos) o por una inmunización ocasional ocurrida por exposición en el lugar de trabajo (por ejemplo, trabajadores que manipulan animales) (115). Tanto los HAMA como los HAAA afectan a los ensayos inmunométricos (IMA) más que a los inmunoensayos competitivos, al formar un puente entre los anticuerpos de captura y de señal, y generar una falsa señal que provoca un valor inapropiadamente alto del analito. (116, 117). El resultado erróneo puede no ser necesariamente anormal, sino que puede ser también inapropiadamente normal. En la actualidad, los fabricantes de reactivos están empleando diversos procedimientos para abordar el problema de los HAMA y neutralizar sus efectos sobre los métodos, con resultados variables, que incluyen por ejemplo el uso de combinaciones quiméricas de anticuerpos y de agentes bloqueantes (118).

4. Recolección y procesamiento de la muestra

La mayoría de los fabricantes recomienda utilizar suero preferentemente a plasma obtenido con heparina o EDTA. Para resultados óptimos y un máximo rendimiento del suero, se recomienda que las muestras de

sangre total se dejen coagular por lo menos durante 30 minutos antes de centrifugarlas y separarlas. El suero se puede conservar entre 4 y 8 °C hasta una semana. Si el ensayo se realiza después de una semana, se recomienda conservar el suero a -20°C. La obtención del suero en tubos con barrera de gel puede afectar los resultados de algunos ensayos tiroideos.

Recomendación N° 7. Evaluación de resultados discordantes en los ensayos tiroideos

Los resultados discordantes en los ensayos tiroideos pueden deberse a interferencia técnica o a condiciones clínicas raras

- Interferencias técnicas:* A veces una interferencia técnica puede ser detectada realizando la determinación por otro método, ya que la magnitud de la mayoría de las interferencias depende del método utilizado. Alternativamente la no linealidad en las diluciones de la muestra pueda indicar una interferencia técnica en las determinaciones de T4T, T3T o TSH. Nota: Una dilución 1 en 100 de un suero “normal” teóricamente produce una reducción insignificante (<2%) en la concentración de T4L. No se recomienda hacer diluciones de las muestras en los ensayos de T4L y T3L utilizados de rutina por los laboratorios clínicos, porque esos ensayos están influidos por la concentración de las proteínas de transporte y no dan respuestas lineales a las diluciones.
- Condiciones clínicas raras:* Es posible observar valores anormales o discordantes en los ensayos tiroideos en ciertas patologías inusuales pero clínicamente significativas como el hipotiroidismo central, los tumores hipofisarios secretantes de TSH, la resistencia a las hormonas tiroideas, la presencia de anticuerpos heterófilos (HAMA) o de autoanticuerpos anti-hormonas tiroideas (T4 y/o T3).

5. Parámetros de rendimiento de los ensayos tiroideos

(a) Variación biológica

Los niveles séricos de las hormonas tiroideas como de su proteína precursora, la tiroglobulina (Tg) son bastante estables dentro de un mismo individuo en el período de 1 a 4 años de edad (Tabla 4) (22, 119). Todos los analitos tiroideos muestran una mayor variabilidad inter-individual que intra-individual (Tabla 4) (33, 119, 120). La estabilidad de las concentraciones intra-individuales de T4 sérica refleja la vida media larga (7 días) de la tiroxina y el nivel individual de T4L genéticamente determinado (21). La estabilidad intra-individual de las concentraciones de T3 refleja la autorregulación del grado de conversión de T4 a T3 (121). La variabilidad inter-individual es particularmente importante para las concentraciones de Tg sérica, porque los individuos de una población presentan diferencias en cuanto a la masa tiroidea, el nivel de TSH, y pueden tener patologías asociadas con lesión tiroidea (por ejemplo tiroiditis), condiciones que influyen en las concentraciones de Tg (122). Los valores séricos de TSH también muestran gran variabilidad, tanto en el mismo individuo como entre un individuo y otro (22). Esto refleja básicamente la vida media de la TSH (~60 minutos) junto con sus variaciones circadianas y diurnas. Los niveles alcanzan un pico durante la noche y un nadir aproximadamente entre las 10.00 y las 16.00 horas (123, 124). La amplitud de la variabilidad diurna de TSH a lo largo de un período de 24 horas es aproximadamente del doble (123, 124). Sin embargo, como este cambio cae dentro del rango de referencia normal de TSH para el conjunto de la población (~0,4 a 4,0 mIU/L), no compromete la utilidad de un valor individual de TSH para diagnosticar disfunción tiroidea. Además, la TSH se determina habitualmente durante el día en los pacientes ambulatorios cuando su variabilidad es menor.

El comportamiento de un ensayo de laboratorio se puede evaluar biológica y analíticamente. La Tabla 4 muestra la variación biológica de diversos analitos tiroideos en suero, expresada en términos de variabilidad inter-individual e intra-individual, a lo largo de diferentes períodos de tiempo (22, 33, 119, 120, 125). El comportamiento analítico se evalúa típicamente en el laboratorio mediante los siguientes parámetros:

- Precisión intra- e inter-ensayo evaluada a diferentes concentraciones del analito
- Límite de detección (sensibilidad analítica) (126, 127)

- Sensibilidad funcional (definida como la mínima concentración del analito que puede determinarse con un dado CV% interensayo, el cual está relacionado con la variabilidad metodológica y con la variabilidad biológica específica para ese analito)
- Linealidad de las mediciones a lo largo del rango reportable de trabajo
- Recuperación del analito agregado a la matriz del estándar
- Intervalo normal de referencia (media \pm 2desvíos estándar de los valores) para una cohorte de individuos sanos
- Correlación con un método de referencia

Aunque los parámetros analíticos de comportamiento son el fundamento de los controles de calidad de la mayoría de los laboratorios y de los programas de aseguramiento de calidad, es ampliamente aceptado que los comportamientos analíticos ideales deberían establecerse sobre la base de principios biológicos (variación intra e inter-individuos) y en función de las necesidades clínicas (33). Se ha propuesto que el error analítico total debería ser idealmente menor que la mitad del coeficiente de variación biológica (% CV) intra-individual (33, 125, 128-130).

Tabla 4. Variabilidad intra e inter-individual de los ensayos tiroideos

Analito sérico	Lapso de tiempo	%CV*	%CV**
T4T /T4L	1 semana	3,5	10,8
	6 semanas	5,3	13,0
	1 año	9,2	17,1
T3T /T3L	1 semana	8,7	18,0
	6 semanas	5,6	14,8
	1 año	12,0	16,8
Tirotrófina (TSH)	1 semana	19,3	19,7
	6 semanas	20,6	53,3
	1 año	22,4	37,8
Tiroglobulina (Tg)	1 semana	4,4	12,6
	6 semanas	8,7	66,6
	4 meses	14,0	35,0

*intra-individual **inter-individual

Datos tomados de las referencias (22, 33, 119, 120, 125).

Para fines diagnósticos, los resultados de los ensayos tiroideos se informan junto con un rango de referencia “normal” que refleja la variabilidad inter-individual. Este rango provee un punto de referencia para detectar casos anormales. No obstante, los rangos de referencia no se pueden utilizar para determinar si las diferencias existentes entre los resultados de dos ensayos consecutivos realizados durante el seguimiento del tratamiento del paciente, constituyen un cambio clínicamente significativo, o simplemente reflejan la variabilidad técnica (imprecisión inter-ensayo) o biológica (variabilidad intra-individual) de la determinación (131). El intervalo “normal” de referencia generalmente carece de importancia durante el manejo clínico post-quirúrgico cuando se utilizan marcadores tumorales como la Tg (132). Claramente el desvío del método y la precisión requerida no deben ser tan estrictos cuando se utiliza el ensayo para diagnóstico como cuando se lo utiliza en determinaciones seriadas para el seguimiento de pacientes. Si bien el intervalo de referencia “normal” que aparece en el informe habitual de laboratorio ayuda al médico a establecer un primer diagnóstico, no ofrece información relevante para ayudarlo a evaluar el significado de los cambios resultantes del tratamiento.

Tabla 5. Desvío y Precisión ideales requeridos para los ensayos tiroideos

Ensayo	T4T nmol/L(μg/dL)	T4L pmol/L(ng/dL)	T3T nmol/L(ng/dL)	T3L pmol/L(ng/dL)	TSH mUI/L	Tg μg/L(ng/mL)
Rango Normal	58-160/4,5-12,6	9-23/0,7-1,8	1,2-2,7/80-180	3,5-7,7/0,02-0,05	0,4-4,0	3,0-40,0
%CV Intra individual	6,0	9,5	5,6	7,9	19,7	8,7
%CV Inter individual	12,1	12,1	14,8	22,5	27,2	66,6
W	3,5	3,8	4,0	6,0	14,3	16,8
X	1,3	2,4	1,4	2,0	5,2	2,2
Y	7,0	7,7	7,9	11,9	28,6	33,6
Z	2,7	4,8	2,8	4,0	10,3	4,4

W= Porcentaje ideal sugerido para el desvío máximo en el ensayo usado con fines diagnósticos.

X= Porcentaje ideal sugerido para el desvío máximo en el ensayo usado para el seguimiento de un paciente.

Y= Porcentaje ideal sugerido para la máxima imprecisión en el ensayo usado para diagnóstico.

Z= Porcentaje ideal sugerido para la máxima imprecisión en el ensayo usado para seguimiento de un paciente.

La Tabla 5 muestra los desvíos y las precisiones ideales para los principales ensayos tiroideos utilizados tanto para diagnóstico como para seguimiento. Los valores que se muestran se calcularon a partir de estudios de las estimaciones de precisión intra- e inter-individuales y se basan en conceptos bien establecidos (22, 33, 119, 120, 130, 133, 134).

La Tabla 5 y la Recomendación N° 8 muestran la magnitud del cambio en dos resultados consecutivos (que estén aproximadamente en la concentración media del rango normal del analito) que es clínicamente significativa para cada ensayo (22, 120). Estos patrones de referencia deberían ayudar al médico a juzgar la importancia clínica de los cambios observados durante el seguimiento seriado en el tratamiento de pacientes con problemas tiroideos.

Recomendación N° 8. Recomendaciones para la interpretación de los resultados de ensayos tiroideos

- Para los ensayos tiroideos con fines diagnósticos (búsqueda de casos anormales), los resultados típicamente se informan junto con un intervalo de referencia “normal” que refleja la variabilidad entre individuos.
- El intervalo de referencia “normal” no indica la magnitud de la diferencia que debe existir entre los resultados de dos ensayos en un paciente individual para considerar en él un cambio clínicamente significativo.

La variabilidad analítica junto con las estimaciones de la variabilidad biológica inter- e intra-individuales sugieren que las magnitudes de las diferencias entre dos resultados de ensayos tiroideos que sean clínicamente significativas, cuando se evalúa la respuesta de un paciente al tratamiento son:

T4T = 28 (2,2) nmol/L (μg/dL)
T4L = 6 (0,5) pmol/L (ng/dL)
T3T = 0,55 (35) nmol/L (ng/dL)
T3L = 1,5 (0,1) pmol/L (ng/dL)
TSH = 0,75 mUI/L
Tg = 1,5 μg/L (ng/mL)



Sección 3: Ensayos tiroideos para el bioquímico y el médico

A. Métodos para determinar Tiroxina Total (T4T) y Triyodotironina Total (T3T)

La tiroxina (T4) es la principal hormona secretada por la glándula tiroides. Toda la T4 circulante deriva de la secreción tiroidea. Por el contrario, sólo aproximadamente el 20% de la triyodotironina (T3) circulante es de origen tiroideo. La mayor parte de la T3 circulante se produce por acción enzimática en tejidos no tiroideos por la 5' monodeyodinación de la T4 (121). En efecto, la T4 aparece como una pro-hormona de la T3, biológicamente más activa. La mayor parte de la T4 circulante (~99,98%) está ligada a proteínas plasmáticas de transporte específicas: la globulina transportadora detiroxina (TBG) (60-75%), la TTR/TBPA (transtiretina/prealbúmina) (15-30%) y la albúmina (~10%) (12,16). Aproximadamente el 99,7% de la T3 circulante está unida a las proteínas plasmáticas, específicamente a la TBG, con una afinidad diez veces menor que la observada para la T4 (12). Las hormonas tiroideas unidas a proteínas no ingresan a las células y, por lo tanto, se las considera biológicamente inertes, y funcionan como reservorios para la hormona tiroidea circulante. Por el contrario, las pequeñas fracciones de hormona libre penetran fácilmente en las células mediante mecanismos específicos de transporte a través de la membrana para ejercer sus efectos biológicos. En la hipófisis, el mecanismo de retroalimentación negativo de las hormonas tiroideas sobre la secreción de TSH está mediado principalmente por la T3 producida *in situ a partir* de la T4 libre que entra en las células tirotróficas.

Técnicamente, ha sido más fácil desarrollar métodos para medir las concentraciones de hormonas tiroideas totales (libres + unidas a proteínas), que estimar las pequeñas concentraciones de hormonas libres. Esto se debe a que las concentraciones de hormonas totales (T4T y T3T) se determinan a niveles nanomolares mientras que las concentraciones de hormonas libres (T4L y T3L) se miden en el rango de picomoles, y para ser válidas, esas mediciones deben estar libres de interferencia por las concentraciones mucho más altas de hormonas totales.

1. Métodos para la determinación de hormonas tiroideas totales

Los métodos para determinar T4T y T3T séricas han evolucionado a través de diversas tecnologías durante las últimas cuatro décadas. Los ensayos de PBI, de la década del 50 que estimaban la concentración de T4T como “yodo unido a proteínas” fueron reemplazados en la década del 60, primero por métodos competitivos utilizando proteínas ligantes, y posteriormente en la década del 70 por métodos de radioinmunoensayo (RIA). Actualmente, las concentraciones de T4T y T3T se miden por inmunoensayos competitivos que son principalmente no isotópicos y que usan enzimas, moléculas fluorescentes o quimioluminiscentes como señales (135). Los métodos para hormonas totales requieren la inclusión de un inhibidor (agente desplazante o bloqueante) como el ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfónico (ANS) o el salicilato para liberar la hormona de las proteínas transportadoras (136). El desplazamiento por parte de estos agentes de la unión de la hormona a las proteínas transportadoras, junto con la gran dilución de la muestra utilizada en los ensayos modernos, facilita la unión de la hormona al anticuerpo. La determinación de T3T en una concentración diez veces menor en sangre, comparada con la de T4T, representa desafíos técnicos de sensibilidad y de precisión, a pesar del uso de mayores volúmenes de muestra (137). Si bien una determinación de T3 confiable en el rango alto es crítica para el diagnóstico de hipertiroidismo, también lo es una determinación confiable en el rango normal para ajustar la dosis de los fármacos antitiroideos, y detectar hipertiroidismo en pacientes enfermos hospitalizados, que pueden tener un valor paradójicamente normal de T3.

A pesar de la disponibilidad de preparaciones altamente purificadas de L-tiroxina y L-triyodotironina cristalizadas (de la United States Pharmacopoeia (16201 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852) aún no se han establecido métodos de referencia para T4T ni T3T (138,139). La naturaleza higroscópica de las preparaciones cristalinas puede afectar la exactitud de la medición gravimétrica (140). En segundo lugar, los diluyentes utilizados para reconstituir las preparaciones de L-T4 y L-T3 que se usarán como calibradores son matrices proteicas modificadas o mezclas de sueros humanos a los que se les ha extraído la hormona. En cualquier caso, la composición proteica de la matriz de los calibradores no es idéntica a la del

suelo del paciente. Esto puede provocar que el inhibidor de la unión a proteínas (por ejemplo el ANS) libere diferentes cantidades de hormona de las proteínas del calibrador que de la TBG en la muestra del paciente. Esto puede afectar la exactitud diagnóstica del ensayo cuando las proteínas transportadoras son anormales, como en las NTI.

Recomendación N° 9. Para los fabricantes que desarrollan métodos de T4T y de T3T

Las divergencias entre métodos deberían reducirse por:

- El desarrollo de preparaciones de referencia de L-T4 y L-T3 y el establecimiento de métodos de referencia internacionales.
- Asegurar que los instrumentos de medición no sean sensibles a las diferencias entre el suero humano y la matriz del calibrador.
- Asegurar que durante el proceso del ensayo, la cantidad de hormona tiroidea liberada de las proteínas transportadoras séricas sea la misma que la liberada en presencia del diluyente del calibrador.

2. Exactitud diagnóstica de las determinaciones de hormonas totales

La exactitud diagnóstica de las determinaciones de hormonas tiroideas totales sería igual a la de las hormonas libres si todos los pacientes tuvieran niveles idénticos de proteínas transportadoras (TBG, TTR/TBPA y albúmina) con afinidades similares para las hormonas tiroideas. Lamentablemente, es más común que se presenten alteraciones en las concentraciones de T4T y T3T debido a alteraciones en las proteínas transportadoras, que debido a una verdadera disfunción tiroidea. En la práctica clínica resulta frecuente encontrar pacientes con alteraciones en la TBG secundarias a embarazo o tratamiento con estrógenos, como así también alteraciones genéticas (141). Las concentraciones y/o las afinidades anormales de la TBG por las hormonas tiroideas pueden distorsionar la relación entre las concentraciones de hormona total y libre (142). Además, algunos sueros de pacientes contienen otras proteínas ligantes anormales, como los autoanticuerpos anti-hormonas tiroideas, que afectan la confiabilidad diagnóstica de las determinaciones de hormonas totales (143-145). Estas alteraciones en las proteínas transportadoras comprometen el uso de las determinaciones de T4T y T3T como ensayos únicos para evaluar la función tiroidea. En lugar de esto la T4T y la T3T en suero se determinan como parte de un panel de dos determinaciones que incluyen una evaluación de la concentración de la principal proteína transportadora TBG, mediante un inmunoensayo de TBG o una prueba de “captación” [Sección-3 B2(b)]. Específicamente, la relación matemática entre la concentración de hormona total y el resultado de la prueba de “captación”, se usa como “índice” de hormona libre (146). Los índices de hormonas libres (índice de T4L e índice de T3L) utilizados durante tres décadas, fueron rápidamente reemplazados por inmunoensayos que permiten estimar la hormona libre en un solo ensayo.

3. Intervalos de referencia normales para T4T y T3T séricas

Los valores de T4T presentan una cierta variabilidad entre los distintos métodos. Los rangos de referencia característicos se aproximan a 58-160 nmol/L (4,5-12,6 µg/dL). De la misma manera los valores de T3T son dependientes del método empleado con rangos de referencia aproximados a 1,2 – 2,7 nmol/L (80 –180 ng/dL).

Recomendación N° 10. Determinaciones séricas de T4 total y de T3 total

Las concentraciones séricas anormales de T4T y T3T se encuentran más frecuentemente como resultado de anomalías en las proteínas transportadoras que debido a una disfunción tiroidea.

- Los ensayos de T4 libre (T4L) se prefieren a los de T4T cuando la concentración de TBG es anormal. Sin embargo, los ensayos de T4L pueden carecer de exactitud diagnóstica cuando la afinidad de la TBG por las hormonas tiroideas está alterada o en presencia de proteínas ligantes de T4 anormales.
- Los ensayos de hormonas totales (T4T y T3T) deberían estar rápidamente disponibles para tener la posibilidad de evaluar las causas de discordancia en los ensayos de hormonas libres.

B. Métodos para estimar la concentración de Tiroxina Libre (T4L) y de Triyodotironina Libre (T3L)

La T4 circulante está unida más fuertemente a las proteínas séricas que la T3, en consecuencia, la fracción biodisponible de T4 libre (T4L) es menor que la de T3 libre (0,02% versus 0,2%, T4L versus T3L, respectivamente). Lamentablemente, las técnicas físicas que se utilizan para separar las pequeñísimas fracciones de hormona libre de las fracciones predominantes unidas a proteínas son complejas, engorrosas, y relativamente costosas para el uso de rutina en el laboratorio clínico. Los métodos que emplean separación física entre la hormona libre y la unida (es decir, diálisis de equilibrio, ultrafiltración y filtración con gel) suelen estar disponibles sólo en los laboratorios de referencia. Los laboratorios clínicos de rutina comúnmente utilizan una variedad de ensayos para hormonas libres que estiman la concentración de hormona libre en presencia de hormona unida a proteínas. Estas estimaciones de hormonas libres emplean la estrategia de realizar dos ensayos independientes para calcular el “índice” de hormona libre [ver Sección-3 B2] o diversos métodos de ensayos con ligandos (14,145,147). En realidad, a pesar de lo que sostienen los fabricantes, prácticamente la totalidad de los ensayos que estiman T4L y T3L dependen en cierto grado de las proteínas transportadoras (148,149). Esta dependencia impacta negativamente en la eficiencia diagnóstica de los métodos de hormonas libres, sujetos a diferentes interferencias que pueden causar resultados inapropiadamente anormales o una interpretación errónea de los mismos. (Tabla 1). Estas interferencias incluyen sensibilidad a proteínas transportadoras anormales, efectos *in vivo* o *in vitro* de diversos medicamentos [Sección-3 B3(c)vi], niveles elevados de ácidos grasos libres (FFA) e inhibidores endógenos o exógenos de la unión de la hormona a las proteínas transportadoras, presentes en ciertas condiciones patológicas (60).

1. Nomenclatura de los métodos que estiman T4 libre (T4L) y T3 libre (T3L)

La nomenclatura de los ensayos de hormonas libres es bastante confusa. Tampoco se ha logrado un acuerdo acerca de la validez técnica de estas mediciones ni de su utilidad clínica en condiciones asociadas con alteraciones en las proteínas transportadoras (145,147,148,150,151). Las determinaciones de hormonas libres en los laboratorios clínicos se realizan utilizando índices que requieren dos ensayos separados, ensayos de ligandos en una única determinación, o métodos de separación física que separan la hormona libre de la unida a proteínas antes de su medida directa en la fracción libre. Los ensayos de ligandos están estandarizados con soluciones que contienen concentraciones de la hormona establecidas por gravimetría, o utilizan calibradores con valores asignados por un método de separación física (por ejemplo, diálisis de equilibrio y/o ultrafiltración). Los métodos de separación física generalmente son manuales, técnicamente complejos y bastante costosos para el uso clínico de rutina. Los índices y los métodos de ligandos son los que se utilizan con más frecuencia en el laboratorio clínico, donde generalmente se realizan en autoanalizadores para inmunoensayos (17).

Recomendación N° 11. Nomenclatura para los ensayos de hormonas libres

- Los métodos para hormonas libres utilizados por la mayoría de los laboratorios clínicos (índices e inmunoensayos) no emplean separación física entre la hormona unida y la libre ni miden directamente las concentraciones de hormona libre. Estos métodos se caracterizan por un cierto grado de dependencia de las proteínas transportadoras y sería más adecuado denominarlos ensayos de “**Estimación de las hormonas libres**”, abreviándolos de la siguiente manera: ET4L y ET3L.
- En general, los ensayos de estimación de hormonas libres sobreestiman el nivel de T4L a altas concentraciones de proteínas y lo subestiman a bajas concentraciones.

Lamentablemente, un exceso confuso de términos se ha utilizado para distinguir los diferentes métodos para hormonas libres, y la literatura está llena de inconsistencias en cuanto a la nomenclatura de estos métodos. En la actualidad, no hay una distinción metodológica clara entre términos como “T7”, “índice de tiroxina efectiva”, “de un paso”, “análogo”, “de dos pasos”, “retrotitulación”, “secuencial”, “inmunoextracción” o “inmunosequestro”, “ensayo con ligandos” porque los fabricantes han modificado las técnicas originales o las han adaptado a la automatización (147). Después del lanzamiento de los

métodos originales con “análogos” de un paso en la década del 70, el término “análogo” se volvió confuso (147). La primera generación de ensayos con análogos de hormonas dependía en alto grado de las proteínas transportadoras y ha sido reemplazada por una nueva generación de ensayos de “análogos” con el anticuerpo marcado, que son más resistentes a la presencia de proteínas transportadoras anormales (147, 152). Desafortunadamente, los fabricantes rara vez revelan todos los componentes de los ensayos o el número de pasos involucrados en un procedimiento automatizado, por lo que no es posible utilizar la nomenclatura del método (de dos pasos, análogo, etc.) para predecir su eficiencia diagnóstica al evaluar pacientes con anomalías en las proteínas transportadoras (152).

2. Métodos para calcular los índices de hormona libre: índice de T4L y de T3L

Los índices permiten estimar la concentración de hormonas libres requiriendo dos determinaciones independientes (146). Una, es la determinación de hormona total (T4T o T3T), y la otra, es la evaluación de la concentración de la principal proteína transportadora de hormonas tiroideas, ya sea mediante un inmunoensayo de TBG, o mediante un ensayo de “captación” de T4 o de T3 denominado: Ensayo de Proporción de hormona tiroidea unida (THBR). Otra posibilidad es calcular los índices combinando una determinación de T4T con una estimación de la fracción de T4 libre establecida mediante diálisis isotópica. En este caso, la calidad y pureza del trazador utilizado repercuten fundamentalmente en la exactitud de los índices (149, 153, 154).

(a) Índices que utilizan la determinación de TBG

El cálculo del índice de T4L utilizando la TBG sólo mejora la eficiencia diagnóstica en comparación con la T4T cuando la anomalía de la T4T es el resultado de una concentración anormal de TBG. Además, el método del índice T4T/TBG no es completamente independiente de la TBG ni corrige las alteraciones en las proteínas transportadoras no relacionadas con la TBG, ni las originadas en las moléculas de TBG con afinidades anormales (141, 155-158). Por lo tanto, a pesar de las ventajas teóricas de medir TBG, los índices T4T/TBG se utilizan muy poco porque la capacidad de unión de la TBG puede estar alterada independientemente de los cambios en su concentración, en especial en pacientes con NTI (99). Además, la hormona unida a TBG refleja el 60 – 75% de la capacidad total de unión, por lo tanto, si se tiene en cuenta sólo la unión a TBG, no se podrán detectar las anomalías en la transtiretina y en la albúmina.

(b) Índices que utilizan la Proporción de Hormona Tiroidea Unida (THBR) o Ensayos de “Captación”

Los ensayos de “captación” se han usado para estimar la hormona tiroidea unida a proteínas desde la década del 50. Se han utilizado dos tipos de “ensayos de captación”. Los “clásicos” incorporan una cantidad mínima de T3 o de T4 marcadas radioactivamente a la muestra, y permiten que la hormona marcada se distribuya a través de las proteínas transportadoras exactamente de la misma manera que la hormona endógena (146, 154). Debido a que se utiliza sólo una cantidad mínima de T3 y T4 marcadas, el equilibrio original casi no se altera. La distribución del trazador depende del grado de saturación de las proteínas transportadoras. El agregado de un ligante o adsorbente secundario (resina de intercambio de aniones, talco, esponja de poliuretano, carbón vegetal, perla recubierta con anticuerpo, etc.) da por resultado una redistribución del trazador de T3 o de T4 en un nuevo equilibrio que ahora incluye al adsorbente. Las cuentas en el trazador secuestrado por el adsorbente dependen de la saturación de las proteínas transportadoras: cuanto mayor es la saturación de las proteínas transportadoras, mayor es la cantidad de trazador en el adsorbente. La cantidad de trazador tomada por el adsorbente es una medida indirecta de la TBG. Cuando la concentración de TBG es baja, los sitios de unión sobre la TBG están muy saturados con T4, por lo que una pequeña cantidad T3 marcada se unirá a la TBG, y una cantidad mayor será captada por el adsorbente. A la inversa, cuando la concentración de la TBG es elevada, la saturación de la TBG con T4 es baja, más trazador se unirá a los sitios desocupados sobre la TBG, y menos se unirá al adsorbente. Lamentablemente, la relación entre la THBR y la concentración de TBG no es lineal, en consecuencia, los índices generalmente no corrigen las anomalías en la T4T que surgen de concentraciones marcadamente anormales de TBG (158).

Se ha recomendado la utilización un suero normal para normalizar la respuesta de los ensayos y permitir el informe del resultado como una relación con el valor normal, es decir, una “Proporción de hormona tiroidea unida” (THBR) (154). Los ensayos “clásicos” de captación, usaron T3 como trazador porque la menor afinidad de unión de T3-TBG en relación con T4-TBG resulta en una mayor captación isotópica del adsorbente y por lo tanto en tiempos de conteo más cortos. No obstante, como la validez de utilizar ensayos de captación de T3 para corregir un valor de T4T es cuestionable, algunos ensayos no isotópicos actuales utilizan una “captación de T4”. Muchos fabricantes todavía utilizan el método “clásico” para producir ensayos de captación de T3 en los que el porcentaje de captación normal puede variar entre un 25% y un 49% (cuentas unidas/ cuentas totales). Tradicionalmente, el índice de tiroxina libre, a veces llamado “T7” deriva del producto de una prueba de captación de T3 y una determinación de TT4, frecuentemente expresada como un % de captación (cuentas unidas al adsorbente divididas por cuentas totales).

Recomendación N° 12. Ensayos de Proporción de hormona tiroidea unida (THBR) o Ensayos de “captación”

- Los ensayos de “captación” se deberían llamar ensayos de “Proporción de hormona tiroidea unida”, abreviadas THBR, e incluir la hormona que se está utilizando, es decir THBR (T4) o THBR (T3).
- Para las determinaciones de THBR se prefiere usar T4 como trazador (en lugar de T3) para reflejar mejor las anormalidades de las proteínas transportadoras de T4.
- Los valores de THBR deberían informarse como una relación con el resultado de un suero normal que tiene un valor asignado de 1,00.
- Los cálculos de THBR deberían basarse en la relación entre las cuentas (cpm) del adsorbente divididas por las cuentas totales menos las cuentas del adsorbente, más que en la relación entre las cuentas del adsorbente y las cuentas totales.
- Además del valor de la hormona total y del índice de hormona libre, debería informarse el resultado de THBR.
- Los ensayos de THBR no deberían ser usados como parámetro independiente para evaluar el estado tiroideo, sino en relación con la determinación de T4T y/o de T3T, y para producir estimaciones de hormonas libres (índices de T4L o T3L).

Los ensayos “clásicos” de captación de T3 o THBR típicamente están influenciados por la concentración endógena de T4 de la muestra. Esta limitación puede solucionarse utilizando un gran exceso de trazador de T4 no isotópicamente marcado con una afinidad por las proteínas transportadoras comparable a la de la T4. Los ensayos actuales de THBR generalmente producen valores normales en los índices de T4L y de T3L, cuando las anormalidades de la TBG son leves (por ejemplo, durante el embarazo). Sin embargo, algunos de estos ensayos pueden producir valores de índices inadecuadamente anormales cuando los pacientes tienen grandes alteraciones en las proteínas transportadoras (TBG congénitamente alta o baja, hipertiroidismo disalbuminémico familiar (FDH), autoanticuerpos a hormonas tiroideas o NTI) y en presencia de algunos medicamentos que influyen en la unión de las hormonas tiroideas a sus proteínas. [Sección-3 B3(c)vi].

(c) Índices que utilizan una determinación de la fracción de hormonas libres

Los primeros ensayos de hormonas libres desarrollados en la década del 60 fueron índices calculados a partir del producto de la fracción de hormona libre de un dializado, multiplicado por la T4T (determinada por PBI y luego por RIA) (159,160). El método del índice de la fracción libre se extendió más tarde a la determinación de la velocidad de transferencia de la hormona marcada isotópicamente a través de una membrana que separaba dos cámaras que contenían la misma muestra sin diluir. Los índices de hormonas libres calculados con fracciones isotópicas libres no son completamente independientes de la concentración de TBG y además están influenciados por la pureza radioquímica, la matriz del buffer y el factor de dilución utilizado (161,162).

3. Ensayos con ligandos para la estimación de T4L y T3L

Estos métodos emplean el procedimiento de “un paso” o de “dos pasos”. Los ensayos de dos pasos utilizan una separación física de la hormona libre de la unida a proteína antes de medir la hormona libre con un inmunoensayo sensible, o, como alternativa, usan un anticuerpo para inmunoextraer una proporción de ligando de la muestra antes de la cuantificación. Por el contrario, los ensayos con ligandos de un paso intentan cuantificar la hormona libre en presencia de las proteínas transportadoras. Los métodos de dos pasos son menos susceptibles a artefactos no específicos. Los métodos en un solo paso pueden resultar inválidos cuando la muestra y los estándares difieren en su afinidad por el trazador del ensayo (60,145,150).

(a) Ensayos con ligandos que utilizan separación física

Los métodos de T4L que separan físicamente la hormona libre de la unida a proteínas antes medir la concentración de hormona libre mediante un inmunoensayo sensible, se estandarizan utilizando soluciones que contengan T4 preparadas por gravimetría. La separación física de la hormona libre de la unida a proteína se logra con una membrana semi-permeable que usa una cámara de diálisis, una técnica de ultrafiltración o una columna de adsorción con resina Sephadex LH-20 (161-165). Se necesita un RIA de T4 extremadamente sensible para medir las concentraciones de picomoles de T4L en dializados, o en la fracción libre separada, en comparación con determinaciones de hormona total en el rango nanomolar. Aunque no existe ningún método de determinación de hormona libre oficialmente reconocido como “patrón”, generalmente se considera que los métodos que emplean separación física son los menos influenciados por las proteínas transportadoras, y por inferencia, dan por resultado los valores de hormonas libres que mejor reflejan el nivel de hormonas libres circulantes (94,166). Sin embargo, los métodos de diálisis que emplean un paso de dilución pueden subestimar la T4L en presencia de inhibidores de la unión en la muestra, y la adsorción de la T4 a los materiales de la membrana puede significar un problema (94,166). Por el contrario, esos métodos pueden sobreestimar la T4L sérica en pacientes heparinizados como resultado de la generación *in vitro* de ácidos grasos libres (FFA) [ver Sección-3 B3(c)vii] (84,97,98,100,101,167-170). Este efecto *in vitro* de la heparina es la causa primaria de valores falsamente altos de T4L en pacientes con NTI (101). Los métodos de separación física requieren demasiado esfuerzo y son muy costosos para su uso de rutina en los laboratorios clínicos y generalmente sólo están disponibles en laboratorios de referencia. Los métodos de T3L que emplean separación física sólo están disponibles en algunos laboratorios de investigación especializados (102).

(b) Ensayos de ligandos sin separación física

La mayoría de los inmunoensayos para la determinación de hormonas libres actualmente en uso, emplean un anticuerpo específico con gran afinidad por la hormona para secuestrar una pequeña cantidad de la hormona total de la muestra. Los sitios de unión en el anticuerpo que se encuentran desocupados y que generalmente son inversamente proporcionales a la concentración de hormona libre se cuantifican utilizando hormona marcada con radioactividad, fluorescencia o quimioluminiscencia. La señal luego se convierte en concentración de hormona libre utilizando calibradores con valores de hormona libre asignados por un método de separación física. La proporción real de hormona tiroidea total secuestrada varía con el diseño del método, pero excede ampliamente la concentración real de hormona libre y debería ser <1-2% para minimizar la alteración del equilibrio hormona libre-unida. El secuestro activo de hormonas por los anticuerpos anti-hormonas tiroideas del ensayo, resulta en una continua separación de la hormona de las proteínas transportadoras y en una alteración del equilibrio entre unida y libre. La clave para la validez de estos métodos es doble. Primero, es necesario usar condiciones que mantengan el equilibrio entre la hormona libre y la unida a proteínas y minimizar los efectos de dilución que debilitan la influencia de los inhibidores endógenos presentes en la muestra. En segundo lugar, es importante utilizar calibradores séricos que contengan concentraciones conocidas de hormona libre, que se comporten en el ensayo de modo idéntico a las muestras de los pacientes. Se han utilizado tres métodos generales para desarrollar inmunoensayos comparables para la determinación de T4L y T3L: (i) hormona marcada, de dos pasos; (ii) análogo, marcado, de un paso; y (iii) anticuerpo marcado.

Recomendación N° 13. Para los fabricantes que desarrollan ensayos de estimación de hormonas libres

- Los métodos sin separación física entre la hormona unida y la libre no deben extraer más del 1-2% de la hormona unida a las proteínas transportadoras, para que se preserve el equilibrio dinámico tanto como sea posible.
- Minimizar los efectos de dilución que debilitan la influencia de los inhibidores endógenos presentes en la muestra.
- Utilizar calibradores séricos que contengan concentraciones conocidas de hormona libre que se comporten en el ensayo de modo idéntico a las muestras de los pacientes.
- Realizar los ensayos a 37°C.

(i) Métodos de Hormona marcada, de dos pasos / Métodos de Retrotitulación

Los métodos de dos pasos se desarrollaron por primera vez con fines de investigación a fines de la década del 70 y luego se los adaptó para producir métodos comerciales de T4L y T3L. Durante el primer paso de incubación, estos métodos usaban un anticuerpo anti hormona de alta afinidad ($>1 \times 10^{11}$ L/mol) unido a un soporte sólido (Sephadex ultrafino, partículas o tubos recubiertos) para secuestrar una pequeña proporción de la hormona total de la muestra sérica. Después de un breve período de incubación, los constituyentes del ensayo no unidos, se eliminaban por lavado antes del segundo paso en el que se agregaba suficiente hormona marcada para unirse a todos los sitios de ligadura desocupados del anticuerpo. Después del lavado, la cantidad de hormona marcada unida al anticuerpo en fase sólida se cuantifica con relación a estándares gravimétricos o a calibradores que tienen valores de hormona libre asignados por un método de referencia. Los métodos del análogo de la hormona marcado de un paso se introdujeron también a fines de la década del 70. Estos nuevos ensayos eran menos laboriosos que las técnicas de dos pasos. Como resultado, los métodos en dos pasos perdieron popularidad a pesar de que los estudios comparativos mostraron que estaban menos afectados por la concentración de albúmina y las anomalías en las proteínas transportadoras, las cuales ejercen un impacto negativo en la eficiencia diagnóstica de los ensayos de un solo paso (147, 171-173).

(ii) Métodos de análogos marcados de la hormona de un paso

La validez fisicoquímica de los ensayos de análogos de hormonas marcados de un paso dependía del desarrollo de un análogo de la hormona con una estructura molecular que fuera totalmente no reactiva con las proteínas séricas pero que pudiese reaccionar con los sitios no ocupados del anticuerpo para la hormona. Cuando estas condiciones se cumplen, el análogo de la hormona, químicamente acoplado a una molécula de señal como un isótopo o una enzima, puede competir con la hormona libre por un número limitado de sitios de unión en el anticuerpo, en un formato clásico de inmunoensayo competitivo. Aunque conceptualmente atractivo, este método es técnicamente difícil de lograr en la práctica, a pesar de los supuestos éxitos iniciales. Los métodos de análogos de la hormona se crearon principalmente para proporcionar valores normales de T4L en estados de TBG elevada (por ejemplo, durante el embarazo). Sin embargo, se demostró que tenían una pobre exactitud diagnóstica en presencia de concentraciones anormales de albúmina, FDH, NTI, niveles altos de FFA o autoanticuerpos anti hormonas tiroideas. Durante la década del 80 se realizaron esfuerzos considerables para corregir estos problemas mediante el agregado de productos químicos patentados para bloquear la unión del análogo a la albúmina o ajustando empíricamente los valores del calibrador para corregir las desviaciones dependientes de las proteínas. No obstante, después de una década de críticas, la mayoría de los métodos del análogo de la hormona se han abandonado porque no fue posible resolver estos problemas (147).

(iii) Métodos de anticuerpo marcado

Los métodos de anticuerpo marcado también miden la hormona libre en función de la fracción de los sitios de unión del anticuerpo para la hormona-ocupados. Estos métodos competitivos utilizan inmunoabsorbentes específicos en la mezcla de reacción para evaluar los sitios del anticuerpo no ocupados. Un método relacionado consiste en el uso de complejos hormona/proteína en fase sólida sin marcar (a veces también denominados “análogos”) que no reaccionan significativamente con las proteínas séricas, para cuantificar los sitios no ocupados del anticuerpo en fase líquida. El fundamento fisicoquímico de estos métodos de anticuerpo marcado sugiere que pueden ser tan susceptibles a los mismos errores como los métodos más antiguos de análogos de hormona marcados. Sin embargo, las diferencias fisicoquímicas que surgen de la fijación del análogo al soporte sólido generan diferencias cinéticas que dan por resultado una disminución en la afinidad de este análogo por las proteínas transportadoras y una determinación más confiable de la hormona libre. En la actualidad, el método de anticuerpo marcado es el preferido por la mayoría de los autoanalizadores.

(c) Comportamiento de los ensayos de T4L y T3L en diferentes situaciones clínicas

La única razón para seleccionar ensayos de hormonas tiroideas libres (T4L o T3L) en vez de hormonas tiroideas totales (T4T o T3T) es lograr una mejor eficiencia diagnóstica en la detección de hipo-e hipertiroidismo en pacientes con anomalías en las proteínas de transporte que comprometan dicha eficiencia en las determinaciones de hormona total (60). Lamentablemente, la eficiencia diagnóstica de los métodos actuales para la determinación de hormonas libres no se puede predecir en base a las características del método (de un solo paso, de dos pasos, de anticuerpo marcado, etc.) ni tampoco por su validación técnica por medio de procedimientos como la prueba de dilución de la muestra. Tanto los índices (FT4I y FT3I) como los métodos que involucran ligandos, son en cierto grado proteína-dependientes, y pueden dar resultados no confiables cuando las proteínas transportadoras son significativamente anormales (148). Los ensayos de hormonas libres deberían realizarse a 37°C ya que a temperatura ambiente muestran valores falsamente altos cuando las muestras tienen una concentración muy baja de TBG (174, 175).

El fuerte impulso por desarrollar ensayos de hormonas libres, se ha debido a la alta frecuencia de anomalías en las proteínas transportadoras que causan discordancia entre las hormonas totales y libres. Desafortunadamente, ningún método actual de T4L es válido en todas las situaciones clínicas. Cuando la concentración de TBG es anormal, la mayoría de los métodos de T4L dan resultados más útiles que la determinación de T4T. Sin embargo, en muchas situaciones asociadas con anomalías de proteínas transportadoras aparecen artefactos pre-analíticos o analíticos: cuando la unión del trazador a la albúmina es anormal, en presencia de medicamentos que desplazan la T4 de la TBG, durante fases críticas de las enfermedades no tiroideas, y en el embarazo (ver Tabla 1). La frecuencia de estos artefactos en los ensayos de T4L sugiere que la TSH o la relación TSH / T4L es un parámetro tiroideo más confiable que la sola estimación de la T4L.

Un resultado discordante de T4L, se debería confirmar utilizando un método de otro fabricante (generalmente determinado en otro laboratorio). Adicional o alternativamente, se puede confirmar la discrepancia con la relación T4L / T4T ya que la interferencia rara vez afecta ambas determinaciones en el mismo grado y en la misma dirección.

Recomendación N° 14. Utilidad clínica de los ensayos de estimación de T3 libre sérica

La medición de T3 sérica tiene escasa especificidad o sensibilidad para el diagnóstico de hipotiroidismo ya que el aumento en la conversión de la T4 a T3 mantiene normales las concentraciones de T3 hasta que el hipotiroidismo alcanza un grado severo. Los pacientes con NTI o deprivación calórica generalmente presentan valores bajos de T3 total y libre. Las determinaciones de T3 sérica, interpretadas conjuntamente con la T4L, son útiles para el diagnóstico de presentaciones complejas o inusuales de hipertiroidismo y de ciertas condiciones clínicas raras:

- Una elevada T3 sérica a menudo es un signo temprano de recurrencia de hipertiroidismo por Graves.
- La relación T3T/T4T se puede utilizar para investigar el hipertiroidismo por Graves versus el no-Graves. Concretamente, una elevada relación T3T/T4T > 20 (ng/μg) o >0,024 (nmol/nmol) sugiere el estímulo tiroideo característico de la enfermedad de Graves.
- La T3 sérica se puede utilizar para controlar la respuesta aguda al tratamiento de la tirotoxicosis de Graves.
- Una T3 sérica alta o paradójicamente normal puede indicar hipertiroidismo en un paciente con enfermedad no tiroidea con TSH suprimida (< 0,01 mUI/L).
- Una T3 sérica alta o paradójicamente normal puede indicar hipertiroidismo inducido por amiodarona.
- Los pacientes con bocio que viven en áreas de deficiencia de yoduro deberían controlar su T3L además de la TSH para detectar tirotoxicosis por T3 provocada por autonomía focal o multifocal.
- Una T3 sérica alta se encuentra frecuentemente en el bocio congénito debido a un defecto en la organificación del yoduro (defecto de TPO), o a un defecto en la síntesis de tiroglobulina.
- Una T3 sérica alta normalmente precede a la tirotoxicosis inducida por yodo cuando los pacientes tienen bocio multinodular de larga data.
- Una T3 sérica alta se ve frecuentemente en los tumores hipofisarios secretantes de TSH.
- Una T3 sérica alta se ve frecuentemente en los síndromes de resistencia a las hormonas tiroideas que generalmente se presentan sin hipertiroidismo clínico.
- La determinación de T3 sérica es útil para controlar el cumplimiento de la terapia supresiva con L-T3 previa al centellograma con ¹³¹I en el carcinoma diferenciado de tiroides (CDT)
- La determinación de T3 sérica es útil para distinguir el hipertiroidismo leve (subclínico)(con TSH baja y T4L normal) de la toxicosis por T3, a veces causada por suplementos dietéticos que contienen T3.
- La determinación de T3 sérica es útil para detectar deficiencia de yodo (caracterizada por T4 baja y T3 alta).
- La determinación de T3 sérica puede ser útil durante el tratamiento con antitiroideos para detectar la persistencia del exceso de T3 a pesar del nivel normal o bajo de T4.
- La determinación de T3 sérica se puede usar para detectar recurrencia temprana de tirotoxicosis después de la suspensión del tratamiento con antitiroideos.
- La determinación de T3 sérica se puede usar para establecer el grado de exceso de T3 durante el tratamiento supresivo con L-T4 o después de una sobredosis intencional de T4.

(i) Embarazo

El aumento de TBG sérica y las concentraciones de albúmina bajas asociados con el embarazo provocan amplias variaciones en las determinaciones de T4L, dependiendo del método. [ver Sección-2 A3] (47,59). Los métodos que dependen de la albúmina pueden producir valores bajos de T4L hasta en un 50 por ciento de pacientes y no son adecuados para evaluar el estado tiroideo durante el embarazo, debido a la marcada desviación negativa atribuible a la progresiva disminución de la concentración de albúmina sérica en el tercer trimestre (59). Por el contrario, los métodos como la diálisis de equilibrio suelen mostrar una desviación positiva en relación con los métodos estándares, posiblemente debido a impurezas en el trazador (60). El uso de rangos de referencia específicos para el método y para cada trimestre podría mejorar la eficiencia diagnóstica de los ensayos de hormonas libres en el embarazo. Sin embargo, prácticamente ningún fabricante ha desarrollado dicha información para sus métodos.

(ii) Infantes prematuros

Es frecuente encontrar un nivel bajo de tiroxina sin aumento de TSH en recién nacidos prematuros de menos de 28 semanas de gestación (39,176). Existe cierta evidencia clínica que sugiere que el tratamiento con L-T4 puede mejorar el resultado neurológico (176). No obstante, según se describió anteriormente, es probable que las diferencias metodológicas en los ensayos de T4L comprometan la confiabilidad de la detección de hipotiroxinemia en los prematuros.

Recomendación N° 15. Efectos de las proteínas transportadoras de hormonas tiroideas anormales sobre los ensayos de T4L

Las anomalías en las proteínas transportadoras provocan artefactos pre-analíticos o analíticos en los ensayos de T4L. La función tiroidea se debería evaluar a partir de la relación TSH-T4T cuando:

- La unión del trazador del ensayo a la albúmina es anormal (por ejemplo en la FDH).
- El paciente recibe medicamentos que desplazan la T4 de la TBG, por ejemplo Fenitoína, Carbamazepina o Furosemida.
- El paciente tiene una enfermedad no tiroidea crítica o severa.

(iii) Anormalidades genéticas en las proteínas transportadoras

Las variaciones hereditarias y adquiridas en la albúmina o en la TBG con afinidades alteradas para la T4 o la T3 pueden provocar concentraciones anormales de hormona total en sujetos eutiroideos que tienen concentraciones normales de hormona libre (141). La variante de la albúmina responsable de la hipertiroxinemia disalbuminémica familiar (FDH) tiene una afinidad marcadamente aumentada por la T4, y por numerosos trazadores análogos de T4, lo que provoca estimaciones falsamente altas de T4L sérica con estos trazadores (145,177). En la FDH, los valores de la T4T y del Índice de T4L, al igual que algunos ensayos de T4L con ligandos, dan valores por encima de los normales, mientras que la T3T, T3L, TSH y T4L determinadas por otros métodos, incluida la diálisis de equilibrio, dan valores normales (177). La falla en reconocer la presencia de la variante anormal de albúmina en la FDH que puede tener una prevalencia hasta de 1:1000 en algunas poblaciones de América Latina puede llevar a una interpretación errónea de los ensayos tiroideos que deriven en la ablación de la glándula. (178).

(iv) Autoanticuerpos

Los sueros de algunos pacientes contienen autoanticuerpos anti-hormonas tiroideas que originan artefactos metodológicos en las determinaciones de hormonas totales o libres (143, 145). Estas interferencias por anticuerpos son método-dependientes. La T4 o T3 marcadas ligadas al anticuerpo endógeno se interpretan erróneamente como fracción unida si se usan métodos de adsorción, o como fracción libre si se usan métodos de doble anticuerpo, lo cual lleva a falsos valores bajos o altos de T4T o T3T séricas, respectivamente. Los análogos de T4 usados como trazador en algunos ensayos de T4L pueden fijarse a estos autoanticuerpos y producir resultados falsamente altos de T4L. Hay publicaciones que informan interferencia por anticuerpos anti-fase sólida, en los ensayos de anticuerpos marcados para hormonas libres (179).

(v) Tirotoxicosis e hipotiroidismo

La relación entre T4 total y libre y T3 en la tirotoxicosis no es lineal. En los casos de tirotoxicosis severa, los aumentos de T4T y T4L son desproporcionados. Esta falta de linealidad refleja una disminución de los niveles de TBG y una saturación de la capacidad ligante de la TBG a pesar del aumento de la unión a TTR y albúmina (180). Asimismo, las concentraciones de T3L se pueden subestimar como resultado de una unión T4-TBG elevada. En casos de hipotiroidismo severo se presenta la situación opuesta, es decir, una reducción de ocupación de todas las proteínas transportadoras (180). En esta situación, el exceso de sitios de unión desocupados puede anular la respuesta de la T4L al tratamiento sustitutivo. Esto sugiere que una dosis inicial de descarga de L-T4 es el método más rápido para restaurar terapéuticamente el nivel normal de T4L en un paciente hipotiroideo.

(vi) Fármacos que compiten con las hormonas tiroideas por la unión a las proteínas transportadoras.

Ciertos agentes terapéuticos y de diagnóstico como la Fenitoína, Carbamazepina o Furosemda pueden inhibir competitivamente la unión de las hormonas tiroideas a las proteínas transportadoras. La reducción de la disponibilidad de la proteína transportadora origina un aumento agudo de T4L y en ciertos casos un incremento en la acción hormonal que se manifiesta por un descenso en la TSH (181). El aumento en las concentraciones de T4L está influido por la dilución utilizada en el método y ocurre también en los métodos por diálisis de equilibrio (182,183). Durante la administración crónica de fármacos competidores de este tipo, hay un aumento en la depuración de la hormona. No obstante, con el tiempo el sistema restaura el equilibrio “normal” y se normalizan los niveles de T4L a expensas de una disminución en la concentración de T4T. La suspensión del fármaco en este momento causaría una caída inicial de T4L a medida que aumenta la disponibilidad de la proteína transportadora, con la renormalización de la T4L a medida que el equilibrio se reestablece mediante una liberación incrementada de la hormona desde la glándula tiroidea. El tiempo que duran y la magnitud de los efectos de estos competidores difiere según su vida media.

Una serie de medicamentos y otros factores compiten con la T4 y la T3 por la unión a la TBG y provocan un aumento agudo en la disponibilidad de T4L y T3L. Muchos de estos competidores son medicamentos prescritos que tienen una afinidad diferente por la TBG que la T4 (96, 184). La furosemda, por ejemplo, se une a la TBG pero con una afinidad aproximadamente tres veces menor que la T4, mientras que la aspirina se une con una afinidad siete veces menor que la T4 (170, 185). La competencia *in vivo* que se observa con estos agentes se relaciona con su afinidad por la TBG más que con sus niveles terapéuticos, la fracción libre o su afinidad por proteínas diferentes de la TBG, en especial la albúmina (170, 186).

Los ensayos actuales de T4L que emplean un factor de dilución pueden no detectar el aumento de T4L secundario a la presencia de competidores por la proteína transportadora. Por ejemplo, una muestra que contenga tanto T4 (fracción libre 1:4000) como un inhibidor competitivo (fracción libre 1:100) sometida a una dilución gradual, mantendrá una concentración de T4L hasta una dilución de 1:100 secundaria a la disociación progresiva de la T4 de las proteínas transportadoras. Por el contrario, la concentración del competidor libre disminuiría marcadamente sólo después de una dilución de 1:10. Por lo tanto, los ensayos para determinar T4L que empleen una dilución alta de la muestra subestimarán el efecto de desplazamiento de la hormona por los competidores. Este artefacto se puede minimizar mediante la utilización de diálisis de equilibrio simétrica y de ultrafiltración de suero sin diluir (94,165,187,188).

(vii) Artefactos inducidos por el tratamiento con heparina

Se sabe que en presencia de concentraciones normales de albúmina, los ácidos grasos no esterificados (FFA) en concentraciones > 3mmol/L aumentarán la T4L al desplazar la hormona de su unión a la TBG (84,97,98,100,101,167-170). El suero de los pacientes tratados con heparina, incluida la de bajo peso molecular, puede presentar valores de T4 libre falsamente aumentados secundarios a la actividad *in vitro* de la lipasa inducida por la heparina, que provoca un aumento de los ácidos grasos libres. Este problema se presenta con dosis de heparina tan bajas como 10 unidades y se exacerba con la conservación de la muestra. Otros factores, como el aumento en los triglicéridos, las concentraciones bajas de albúmina, o una incubación prolongada del ensayo a 37°C, pueden acentuar este problema.

(viii) Enfermedades no tiroideas graves

Hay un gran número de observaciones recolectadas durante más de dos décadas con respecto a la especificidad de diversos métodos de determinación de T4L en pacientes hospitalizados con NTI. [Sección-2 B2]. La literatura puede resultar confusa y complicada por la heterogeneidad de las poblaciones de pacientes estudiadas y la dependencia de los resultados con respecto a los métodos. Los fabricantes han modificado progresivamente sus métodos a lo largo del tiempo en un intento de mejorar la especificidad en esta y otras situaciones en las que se presentan anomalías en las proteínas transportadoras. Sin embargo, la composición exacta de los equipos de reactivos comerciales actuales sigue siendo confidencial y es difícil que los fabricantes obtengan muestras con antecedentes documentados de este tipo de pacientes

para el análisis riguroso de sus métodos. En un trabajo comparativo reciente de métodos de T4L, se observó una diferencia marcada, dependiente del método, el séptimo día posterior al trasplante de médula ósea en individuos eutiroideos que recibían tratamiento con múltiples fármacos (incluidos heparina y glucocorticoides) (101). En este estudio, las concentraciones de T4T fueron normales en la mayoría de los individuos (95%) y la TSH sérica fue $< 0,1$ mUI/L en aproximadamente en la mitad de los individuos, en relación directa con el tratamiento de glucocorticoides que recibían. Por el contrario, tanto valores altos como subnormales de T4L se informaron usando diferentes métodos. Es probable que las estimaciones supranormales de T4L obtenidas con algunos métodos en el 20 al 40% de los pacientes, reflejaron el efecto *in vitro* de la heparina intravenosa descrito anteriormente [Sección-3 B3(c)vii]. Contrariamente, los métodos del análogo, sujetos a la influencia de la unión del trazador a la albúmina, produjeron estimaciones subnormales de T4L en el 20 al 30% de los pacientes (101). Estos artefactos en las determinaciones de T4L, originan discordancia entre los resultados de T4L y TSH, aumentan el riesgo de un diagnóstico erróneo de tirototoxicosis o de hipotiroidismo secundario, y sugieren que las determinaciones de T4T pueden ser más confiables en el marco de una enfermedad crítica.

(d) Validación de los métodos de T4L

Desafortunadamente, la mayor parte de los métodos de estimación de hormonas libres reciben una evaluación inapropiada antes de que se los incorpore al uso clínico. Los fabricantes rara vez extienden la validación de sus métodos más allá del estudio de pacientes ambulatorios con hipo o hipertiroidismo, embarazadas y una categoría general denominada “pacientes hospitalizados /enfermedades no tiroideas”. Sin embargo, en la actualidad no se ha logrado un consenso acerca de los mejores criterios para la evaluación de estos métodos de estimación de T4 libre. Cabe mencionar que no es suficiente lograr la simple demostración de que un nuevo método pueda distinguir entre valores hipotiroideos, normales e hipertiroideos, ni que ofrezca la posibilidad de comparación con métodos vigentes ya que cualquier método de estimación de hormona libre satisfará estos criterios sin que necesariamente aporte información acerca de la verdadera concentración fisiológica de hormona libre.

Recomendación N° 16. Para los fabricantes: Evaluación de la exactitud diagnóstica de los ensayos de estimación de T4L

- La eficiencia diagnóstica del método se debe analizar utilizando muestras de pacientes ambulatorios con antecedentes documentados de los siguientes problemas en las proteínas transportadoras:
 - anomalías de la TBG (estrógenos elevados, exceso y deficiencia de TBG congénita)
 - Hipertiroxinemia disalbuminémica familiar (FDH)
 - Aumento en la afinidad de la transtiretina (TTR)
 - Autoanticuerpos anti-T4 y anti-T3
 - Factor reumatoideo
- Evaluar la interferencia del método con muestras de suero normal a las que se le agreguen concentraciones relevantes de inhibidores comunes, en concentraciones que provoquen el desplazamiento de la hormona de las proteínas transportadoras en suero sin diluir, efectos que se pierden después de la dilución:
 - Furosemida 30 μ M
 - Ácido disalicílico 300 μ M
 - Fenitoína 75 μ M
 - Carbamazepina 8 μ M
- Enumerar todas las interferencias conocidas con la magnitud y la dirección de los errores resultantes.
- Documentar los efectos *in vitro* de la heparina intravenosa sobre la generación de ácidos grasos no esterificados (NEFA), durante la incubación del ensayo.

Se deberían evaluar los nuevos métodos con muestras clínicas con antecedentes documentados, en especial con aquellas que pudieran representar un desafío para la validez del ensayo, o alternativamente, mediante la manipulación de los constituyentes de una muestra de suero normal para evaluar un criterio particular (148). Cualquiera sea el método que se adopte, los problemas clave se relacionan con la similitud entre las muestras y los estándares, porque todos los métodos son generalmente comparables. Otros procedimientos

incluyen probar la recuperación de L-T4 agregada, o los efectos de la dilución del suero, ya que una dilución al 100% de un suero “normal” teóricamente provocaría una reducción insignificante (menor al 2%) en la concentración de T4L (94,152) (58,189). Sin embargo, estos procedimientos, simplemente evalúan la “dependencia proteica” del método, es decir, el grado en que la T4 libre depende de la disociación de la hormona libre de la unida (148). Podría predecirse que estos procedimientos evaluarán desfavorablemente los métodos que impliquen un elevado grado de dilución de la muestra comparados con aquellos que minimicen la dilución. Sin embargo, no hay evidencia que documente si estos procedimientos reflejan verdaderamente la eficiencia diagnóstica del método cuando se los usa para evaluar muestras clínicas complicadas. En última instancia, como en cualquier método diagnóstico, la especificidad de un método de T4 libre sólo será evidente después de evaluar un espectro completo de muestras de individuos con y sin disfunción tiroidea asociada con anomalías en las proteínas transportadoras o con medicamentos que afecten la unión de las hormonas tiroideas a las proteínas plasmáticas. La detección de una interferencia inesperada se puede lograr sólo después de que los métodos se hayan usado durante un cierto tiempo, como en el caso del factor reumatoideo que puede producir estimaciones de T4L falsamente altas (112). La fluorescencia no específica debido a sustancias en sangre como ácidos orgánicos en pacientes con uremia, puede ser otra causa de interferencia (190).

El procedimiento más adecuado es prestar particular atención a las muestras que probablemente causen interferencia no específica en el resultado (98). Idealmente, en pacientes ambulatorios se deberían incluir muestras que tengan: a) anomalías de la TBG (embarazo, anticonceptivos orales, exceso y deficiencia congénitos de TGB); b) Hipertiroxinemia disalbuminémica familiar (FDH); c) autoanticuerpos anti-T4 y anti-T3; d) sustancias interferentes como el factor reumatoideo y e) el amplio espectro de drogas terapéuticas. En pacientes hospitalizados, se deberían evaluar tres categorías: a) pacientes sin disfunción tiroidea pero con T4T baja o alta debido a NTI b) pacientes con hipotiroidismo documentado asociado con NTI severas y c) pacientes con hipertiroidismo documentado asociado con NTI. Sin embargo, la obtención de muestras con antecedentes documentados de este tipo de pacientes resulta excesivamente difícil para los fabricantes. Como ningún fabricante ha probado su método en pacientes críticamente enfermos, es difícil para los médicos confiar en que un resultado de T4L anormal en esos pacientes refleje una disfunción tiroidea más que una NTI. Por lo tanto, en pacientes hospitalizados con sospecha de disfunción tiroidea, una combinación de determinaciones de TSH y de T4T puede proveer más información que un único ensayo de T4L, siempre que el valor de T4T se interprete en relación con el grado de severidad de la enfermedad. Concretamente, un valor bajo de T4T en las NTI normalmente se restringe a pacientes graves que están en unidades de cuidado intensivo. Un valor bajo de T4T en un paciente que no está críticamente enfermo debería sugerir que se considere una disfunción hipofisaria. En pacientes ambulatorios, las determinaciones de T4L suelen tener mayor exactitud diagnóstica que las de T4T. Sin embargo, cuando una T4L anormal no coincide con el cuadro clínico, o cuando haya una discordancia inexplicable en la relación TSH /T4 L, puede ser necesaria una T4 T confirmatoria. Alternativamente el laboratorio podría, enviar la muestra a otro laboratorio que use un método de T4L de otro fabricante, o a un laboratorio de referencia que pueda realizar T4L utilizando un método de separación física como la diálisis de equilibrio o la ultrafiltración.

(e) Interferencias con los ensayos tiroideos

Idealmente, un ensayo de hormonas tiroideas debería carecer de la interferencia de cualquier compuesto, fármaco o sustancia endógena (por ejemplo bilirubina) en cualquier muestra y a cualquier concentración. Los estudios disponibles de los fabricantes varían ampliamente en el número de compuestos estudiados y en las concentraciones evaluadas. Generalmente el laboratorio sólo puede detectar interferencia mediante la “comprobación de validez” de la relación entre la T4L y la TSH. Si se hace solamente un ensayo, generalmente el médico es el primero en sospechar una interferencia, cuando observa una inconsistencia entre el valor informado y el estado clínico del paciente. Los procedimientos de control clásicos de laboratorio de comprobar la identidad de la muestra y realizar diluciones, no siempre detectan interferencias. Generalmente, las interferencias en las determinaciones de T4T o de T4L generan valores inadecuadamente anormales en presencia de TSH normal (Tabla 1). Las interferencias en los inmunoensayos competitivos y no-competitivos son de tres clases: (i) problemas de reactividad cruzada, (ii) anticuerpos contra el analito endógeno e (iii) interacciones farmacológicas (191).

(i) Reactividad cruzada

Los problemas de reactividad cruzada son el resultado de la incapacidad del anticuerpo para discriminar entre el analito y una molécula estructuralmente relacionada (192). Los ensayos de hormonas tiroideas son menos susceptibles a este tipo de interferencia que la TSH, porque los anticuerpos anti-yodotironinas se seleccionan para una mejor especificidad enfrentándolos con preparados purificados. La disponibilidad de anticuerpos monoclonales, y de anticuerpos policlonales purificados por afinidad, redujo la reactividad cruzada de los ensayos actuales de T4 y T3 a menos de un 0,1 % para todos los precursores yodados y metabolitos de L-T4. No obstante, se han informado interferencias por el ácido 3-3',5-triyodotiroacético (TRIAc), en ensayos de T3L y por D-T4 en ensayos de T4L (14,135).

(ii) Autoanticuerpos endógenos

Autoanticuerpos endógenos anti-T4 y anti-T3 se han encontrado frecuentemente en el suero de pacientes con autoinmunidad tiroidea, y con enfermedades no tiroideas. A pesar de su alta prevalencia, la interferencia por este tipo de autoanticuerpos es relativamente rara y se caracteriza por valores falsamente bajos o altos, según el diseño del ensayo utilizado (193).

(iii) Interferencias por fármacos

Las interferencias por drogas pueden derivar de la presencia *in vitro* de agentes terapéuticos o de diagnóstico en la muestra en cantidad suficiente para afectar la prueba (67, 68). Los ensayos tiroideos que emplean señales fluorescentes pueden ser sensibles a la presencia en la muestra de agentes terapéuticos o de diagnóstico relacionados con el fluoróforo (190). En el caso de administración de heparina intravenosa, la activación *in vitro* de lipasas de lipoproteínas genera ácidos grasos libres *in vitro* que pueden elevar falsamente los valores de T4L [ver Sección-3 B3(c)vii] (84,97,98,100,101,167-170).

(f) Intervalos de referencia de T4L y T3L

Los métodos de separación física se utilizan para asignar valores a los calibradores empleados en la mayoría de los ensayos de estimación de T4L. Hay más similitud entre los intervalos de referencia de los diversos ensayos con ligandos que entre los métodos que emplean separación física. Los intervalos de referencia para los inmunoensayos de T4L son aproximadamente 9-23 pmol/L (0,7 –1,8 ng/dL). Por el contrario, el límite superior de T4L para los métodos que emplean separación física, como la diálisis de equilibrio, supera los 30 pmol/L (2,5 ng/dL). Los intervalos de referencia para los inmunoensayos de T3L se aproximan a 3,5-7,7 pmol/L (0,2 – 0,5 ng/dL). En la actualidad, los métodos para determinar T3L que emplean separación física sólo están disponibles como ensayos de investigación (102).

(g) Estandarización o calibración

No existen estándares ni métodos internacionales para determinaciones de hormonas libres. (139). Aunque algunos métodos de referencia han sido sugeridos para T4 T, resulta difícil adaptarlos para las hormonas libres. Cada método y cada fabricante enfocan el problema de la estandarización desde su perspectiva individual.

Los métodos de estimación de T4L que requieren dos ensayos independientes (diálisis de equilibrio con trazador y ultrafiltración, al igual que los métodos de índices) usan una determinación de hormona total y una determinación de la fracción libre. Los ensayos de hormonas totales se estandarizan con calibradores preparados gravimétricamente a partir de preparaciones hormonales altamente purificadas disponibles comercialmente. La fracción libre se determina registrando las cuentas radiactivas en el dializado o ultrafiltrado. Alternativamente, en el caso de los métodos que utilizan índices, la saturación o la capacidad ligante de las proteínas transportadoras se determina utilizando ensayos de proporción de hormonas tiroideas unidas (THBR), a veces conocidos como pruebas de “captación”. Los ensayos THBR están estandarizados contra sueros con proteínas transportadoras normales a los que se les asigna un valor de 1,00 [Sección-3 B2(b)].

La situación más complicada ocurre con los ensayos de estimación de hormonas libres con ligandos. En general, estos ensayos se comercializan con estándares que tienen valores conocidos o asignados de hormona libre determinados por un método de referencia (generalmente diálisis de equilibrio con RIA de la concentración de T4L del dializado). Los fabricantes generalmente realizan esto para establecer valores de hormonas libres para los calibradores con matriz de suero humano que contenga la hormona y la(s) proteína(s) transportadora(s) para incluirlos en el equipo. Alternativamente, en el caso de hormonas fuertemente unidas, como la tiroxina, se puede usar la Ley de acción de las Masas para calcular la concentración de hormona libre (194). La concentración de hormona total, que es una medida de la capacidad ligante total para la hormona en esa muestra sérica, y la constante de equilibrio proveen la información necesaria para calcular la concentración de hormona libre. Este procedimiento es válido para los calibradores y controles elaborados con suero humano que contiene una capacidad ligante de TBG normal. Esto le permite al fabricante producir calibradores y controles de concentraciones prefijadas.

Además, el uso de calibradores preparados según se ha descrito, permite compensar la extracción excesiva de la hormona de sus proteínas transportadoras. Concretamente, en el caso de la tiroxina y la triyodotironina, el anticuerpo del ensayo puede unirse a la hormona libre y al mismo tiempo extraer una cantidad significativa (~1-2%) de la hormona unida a proteínas. Si se realizara un ensayo directo, se produciría un aumento en la concentración de hormona libre debido a esa extracción excesiva. Sin embargo, el uso de calibradores de concentraciones conocidas de hormona libre preparados a partir de suero humano permite asociar valores específicos de señales que el sistema lee (isotópicas, enzimáticas, fluorescentes o quimioluminiscentes) a concentraciones conocidas de hormona libre. No obstante, esto sólo será válido si el porcentaje de hormona extraída del calibrador es idéntico al extraído de la muestra del paciente. Esto no sucede con frecuencia en el caso de muestras que presentan anomalías en las proteínas transportadoras (por ejemplo, TBG congénitamente alta o baja, FDH, NTI etc.).

4. Determinación de hormonas libres: el futuro

La era de los inmunoensayo para cuantificar hormonas tiroideas y esteroideas en fluidos biológicos se inició en la década del 70 y está alcanzando su etapa final. Emerge progresivamente la aplicación de espectrometría de masa avanzada para la cuantificación de hormonas en fluidos biológicos (138). No hay razones para dudar que la espectrometría de masa ofrecerá una mejor cuantificación ya que su especificidad analítica es mayor y su interferencia analítica menor que la de los inmunoensayos. Por el momento, este tipo de técnicas sólo se ha aplicado a las determinaciones de T4T (139). No obstante, para los ensayos de hormona total, se mantendrá el requisito de la liberación completa de la hormona de los complejos proteína-hormona. Para los ensayos de hormona libre, también se mantendrá el requisito de una separación física de la hormona libre de la ligada a proteínas, antes de la cuantificación. Para lograrlo, se necesitará una nueva tecnología de separación antes de que se pueda considerar cualquier método como patrón. La dilución implícita de pequeñas moléculas es una limitación de la diálisis de equilibrio que necesita ser resuelta. La ultrafiltración es una técnica con amplias posibilidades, pero los métodos actuales son demasiado poco robustos o demasiado imprácticos para tal fin. La calidad de las mediciones por espectrometría de masa de las hormonas que forman complejos con las proteínas séricas está en relación directa con los pasos de preparación de la muestra para la cuantificación. Sin embargo, el método de referencia ideal para hormonas libres sería una técnica que emplee ultrafiltración a 37°C, para evitar los efectos de la dilución, y la medición directa de la hormona libre en el ultrafiltrado por espectrometría de masa.

Recomendación N° 17. Para laboratorios que realizan ensayos de T4L y T3L

- Los médicos deberían estar informados acerca de los efectos de las drogas y de la exactitud diagnóstica de los ensayos utilizados para evaluar el estado tiroideo en los pacientes que presentan anomalías de las proteínas transportadoras y enfermedades severas.
- El laboratorio debería estar preparado para confirmar un resultado dudoso mediante una determinación de hormona total, o una nueva determinación de T4L realizada con un método de referencia que separe físicamente la hormona libre de la unida, como la diálisis de equilibrio o la ultrafiltración.
- Se debería verificar cualquier interferencia en resultados cuestionables con una nueva determinación realizada con un método de otro fabricante. (En caso de ser necesario, la muestra debería enviarse a otro laboratorio).



C. Tirotrófina u Hormona estimulante de la tiroides (TSH)

Durante más de veinticinco años los métodos para la determinación de TSH han sido capaces de detectar los aumentos de esta hormona característicos del hipotiroidismo primario. Sin embargo, los métodos modernos más sensibles, también posibilitan la detección de valores bajos de TSH típicos del hipertiroidismo. Estos nuevos métodos son ensayos inmunométricos no isotópicos (IMA), disponibles para una variedad de autoanalizadores para inmunoensayos. La mayoría de los métodos actuales está en condiciones de alcanzar una sensibilidad funcional de 0,02mUI/L o menor, necesaria para la detección de todo el rango de valores de TSH comprendidos entre el hipo y el hipertiroidismo. Esta sensibilidad permite distinguir entre una TSH francamente suprimida típica de la tirotoxicosis severa de Graves (TSH < 0,01 mUI/L) y los grados menores de supresión (TSH 0,01 – 0,1 mUI/L) que se observan en el hipertiroidismo leve y en ciertos pacientes con enfermedades no tiroideas (NTI).

En la última década, la estrategia diagnóstica para el uso de las determinaciones de TSH ha cambiado como resultado de los avances en la sensibilidad de los métodos. En la actualidad, se reconoce que la determinación de TSH es más sensible que la de T4L para la detección tanto de hipo como del hipertiroidismo. En consecuencia, algunos países promueven la determinación de TSH como estrategia primaria para el diagnóstico de la disfunción tiroidea en pacientes ambulatorios (siempre que el método de determinación tenga una sensibilidad funcional $\leq 0,02$ mUI/L). Otros países, prefieren aún la combinación de TSH + T4L, ya que la determinación de TSH como estrategia primaria no siempre detecta a los pacientes con hipotiroidismo central [Sección-3 C4(f)] ni los tumores hipofisarios secretantes de TSH [Sección-3 C4(g)] (19,195-197). Otra desventaja de la estrategia basada en la determinación de TSH es que la relación TSH-T4L no se puede utilizar como “parámetro de validación clínica” para detectar interferencias o condiciones poco habituales caracterizadas por discordancias en dicha relación (Tabla 1).

1. Especificidad

(a) Heterogeneidad de la TSH

La TSH es una molécula heterogénea con diferentes isoformas que circulan en sangre y que están presentes en los extractos hipofisarios utilizados para la estandarización de los ensayos (Medical Research Council (MRC) 80/558). En el futuro, las preparaciones de TSH humana recombinante (rhTSH) se podrían utilizar como estándares primarios para los inmunoensayos de TSH (198). Los métodos TSH IMA actuales utilizan anticuerpos monoclonales que eliminan virtualmente la reactividad cruzada con otras hormonas glucoproteicas. Estos métodos, sin embargo, pueden detectar epitopes de isoformas anormales de TSH secretadas por algunos individuos eutiroideos, así como por algunos pacientes con patologías hipofisarias. Por ejemplo, los pacientes con hipotiroidismo central provocado por disfunción hipofisaria o hipotalámica, secretan isoformas de TSH con glucosilación anormal y reducida actividad biológica. La mayoría de los métodos, paradójicamente miden estas isoformas de TSH como normales o incluso elevadas (195,197,199). Asimismo, es posible observar niveles paradójicamente normales de TSH en pacientes con hipertiroidismo debido a tumores hipofisarios, secretan isoformas de TSH con aumento de la actividad biológica (196, 200, 201).

(b) Problemas técnicos

Los problemas durante el desarrollo de la técnica, como los pasos de lavados mal realizados, pueden dar resultados falsamente elevados de TSH (202). Además, cualquier sustancia interferente en la muestra (por ejemplo, los anticuerpos heterófilos HAMA) que produzca un ruido de fondo elevado o un falso puente entre los anticuerpos de captura y de señal creará una señal alta en el soporte sólido que se interpretará como un resultado falsamente elevado [véase Sección-2C3] (203, 202).

(c) Métodos para detectar interferencia en un resultado de TSH

El método convencional de laboratorio para verificar la concentración de un analito, como la dilución, no siempre detecta un problema de interferencia. Como los métodos varían en su susceptibilidad hacia la mayoría de las sustancias interferentes, el modo más práctico de evaluarla es medir la concentración de TSH en la muestra utilizando un método de otro fabricante y comprobar si hay una discordancia significativa entre los valores. Cuando la variabilidad de las determinaciones de TSH en la misma muestra con métodos diferentes supera los valores esperados (>50% de diferencia), es posible que haya interferencia. Los controles biológicos también pueden resultar útiles para verificar un resultado inesperado. Los valores inapropiadamente bajos de TSH se pueden verificar con una prueba de estimulación de TRH (200 µg I.V), el cual se espera que eleve la TSH a más del doble (incremento ≥ 4 mUI/L) en individuos normales (204). En los casos de TSH inapropiadamente elevada, se esperaría que una prueba de supresión con hormona tiroidea (1mg L-T4 o 200 µg L-T3, por vía oral) suprima la TSH en más de un 90 % a las 48 horas en individuos normales.

Recomendación N° 18. Investigación de valores discordantes de TSH sérica en pacientes ambulatorios

Un resultado de TSH discordante en un paciente ambulatorio con estado tiroideo estable, puede deberse a un error técnico. La pérdida de especificidad puede ser el resultado de un error de laboratorio, de sustancias interferentes (por ejemplo anticuerpos heterófilos) o la presencia de una isoforma inusual de TSH (ver Recomendación N° 7 y Tabla 1). Los médicos pueden solicitar que su laboratorio realice las siguientes comprobaciones:

- Confirmar la identidad de la muestra (por ejemplo que el laboratorio verifique si se ha cambiado una muestra de posición en la corrida).
- Cuando la TSH es inesperadamente alta solicitar al laboratorio que vuelva a medir la muestra diluida, preferentemente en suero tirotóxico, para confirmar paralelismo.
- Solicitar que el laboratorio analice la muestra con un método de otro fabricante (enviarla a otro laboratorio si fuera necesario). Es posible que haya un interferente si la variabilidad entre métodos para la misma muestra es > 50%.
- Las verificaciones biológicas pueden ser útiles una vez que se hayan descartado los problemas técnicos.
 - Realizar una prueba de TRH para investigar un resultado bajo discordante de TSH, y esperar un incremento de dos veces (≥ 4 mUI/L) en la respuesta en individuos normales.
 - Realizar una prueba con supresión de hormona tiroidea para verificar un valor alto discrepante de TSH. La respuesta normal a 1mg de L-T4 o 200µg de L-T3 administrados por vía oral es una supresión de la TSH de más del 90% a las 48 horas.

2. Sensibilidad

Históricamente, la “calidad” de un método para determinar TSH se ha establecido a partir de un patrón clínico: la capacidad del ensayo para discriminar niveles eutiroideos (~ 0,4 a 4,0 mUI/L) de concentraciones extremadamente bajas (<0,01 mUI/L) típicas de la “tirotoxicosis” de Graves. La mayoría de los métodos de TSH declaran un límite de detección de 0,02 mUI/L o menos (ensayos de “tercera generación”) (202).

Recomendación N° 19. Definición de sensibilidad funcional

La sensibilidad funcional debería usarse para determinar el límite de detección más bajo del ensayo.

- La sensibilidad funcional del ensayo de TSH se define como la concentración que puede ser determinada con un coeficiente de variación (CV) interensayo del 20% determinada con el protocolo recomendado (ver Recomendación N° 20).

Recomendación N° 20. Protocolo para obtener la sensibilidad funcional de TSH y el perfil de precisión

Medir la TSH en mezclas de suero humano que cubran el rango del ensayo en por lo menos 10 corridas diferentes. El valor de la mezcla más baja debería estar un 10% por encima del límite de detección y el valor de la mezcla más alta debería estar un 90% por sobre el límite superior del ensayo.

- El fenómeno de “arrastre” se debería evaluar analizando primero la mezcla más alta seguida de la más baja.
- Utilizar el mismo modo de prueba que para las muestras de pacientes (por ejemplo, simplificado o duplicado)
- El operador debería desconocer la presencia de mezclas de sueros de prueba en la corrida.
- Las corridas se deberían distribuir en un intervalo clínicamente representativo (por ejemplo 6 a 8 semanas para TSH en pacientes ambulatorios).
- Utilizar por lo menos dos lotes diferentes de reactivos y dos calibraciones distintas del instrumento durante el período de prueba.
- Cuando se corra el mismo ensayo en dos instrumentos similares, periódicamente se deberían correr duplicados ciegos en cada instrumento para verificar la correlación.

Casi todos los fabricantes han abandonado el uso del parámetro “sensibilidad analítica” para expresar la sensibilidad de un ensayo de TSH, que se calcula a partir de la precisión intraensayo del calibrador cero, porque no refleja la sensibilidad del método en la práctica clínica (126, 127). Como alternativa se ha adoptado el parámetro “sensibilidad funcional” (202), que se calcula a partir del coeficiente de variación (CV) interensayo del 20% para el método y que se utiliza para establecer el valor mínimo que se puede informar para esa determinación. (202).

La sensibilidad funcional se debería determinar con un estricto seguimiento del protocolo recomendado que se diseña para evaluar el límite de detección de un ensayo en la práctica clínica (Recomendación N°20) y garantizar que el parámetro realmente represente el mínimo valor del ensayo que se puede informar de manera confiable. El protocolo está diseñado para tener en cuenta la variedad de factores que pueden influir en la imprecisión del método de TSH. Estos incluyen:

- Diferencias en la matriz entre el suero del paciente y el diluyente de los calibradores.
- Disminución de la precisión con el tiempo
- Variabilidad entre los diferentes lotes de reactivos provistos por el fabricante
- Diferencias entre las calibraciones de los instrumentos y los operadores técnicos
- Arrastre desde las concentraciones altas hacia las bajas (205)

El uso de la sensibilidad funcional como límite de detección es un enfoque conservador para garantizar que cualquier resultado de TSH informado no sea simplemente “ruido” del ensayo. Además, el coeficiente de variación del 20 % entre corridas se aproxima a la máxima imprecisión requerida para los ensayos usados con fines diagnósticos (Tabla 5).

Recomendación N° 21. Para laboratorios que realizan ensayos de TSH

La sensibilidad funcional es el criterio de calidad más importante que debe influir en la selección de un método para la determinación de TSH. Los factores prácticos como el instrumental, el tiempo de incubación, el costo y el soporte técnico, si bien importantes, son consideraciones secundarias. Los laboratorios deberían utilizar intervalos de calibración que optimicen la sensibilidad funcional, incluso si la re-calibración se debe realizar con mayor frecuencia que la recomendada por el fabricante:

- Seleccionar un método para TSH que tenga una sensibilidad funcional $\leq 0,02$ mUI/L.
- Establecer la sensibilidad funcional independientemente del fabricante utilizando la Recomendación N° 20.
- No hay justificación científica para realizar el ensayo con un método menos sensible y luego si es necesario, con uno más sensible. (La menor sensibilidad genera valores falsamente elevados no falsamente bajos.)

3. Intervalos de referencia de TSH

A pesar de las diferencias en los niveles de TSH relacionadas con el género, la edad y la etnicidad que reveló la encuesta NHANES III US recientemente publicada, no se considera necesario ajustar el intervalo de referencia para estos factores en la práctica clínica (18). Los niveles de TSH sérica muestran una variación diurna con respecto al pico que se produce durante la noche y el nadir, que se aproxima al 50% del valor máximo y ocurre entre las horas 10:00 y 16:00 (123, 124). Esta variación biológica no influye en la interpretación del resultado ya que la mayoría de las determinaciones de TSH se realizan en pacientes ambulatorios entre las horas 08:00 y 18:00 y los intervalos de referencia de TSH se establecen para las muestras recolectadas durante ese mismo lapso. Los intervalos de referencia de TSH se deberían establecer utilizando muestras de individuos con TPOAb negativos, ambulatorios, eutiroideos, sin antecedentes personales ni familiares de disfunción tiroidea, ni bocio visible. La variación en los intervalos de referencia para los distintos métodos refleja las diferencias en el reconocimiento del epítipo de las diferentes isoformas de TSH por los componentes del equipo de reactivos, y en el rigor aplicado a la selección de individuos normales.

Las concentraciones de TSH determinadas en sujetos eutiroideos normales se desvían con una “cola” relativamente larga hacia los valores más altos de la distribución. La distribución de los valores se vuelve más normal cuando se los transforma logarítmicamente. Para los cálculos del rango de referencia, es común la transformación logarítmica de los resultados de TSH, para calcular el intervalo de referencia del 95% (valor de la media de la población típica ~1,5 mUI/L, rango entre 0,4 y 4,0 mUI/L en poblaciones sin deficiencia de yodo) (202, 206). Sin embargo, debido a la elevada prevalencia de hipotiroidismo leve (subclínico) en la población general, es probable que el límite superior actual del rango de referencia de la población sufra un sesgo por la inclusión de personas con disfunción tiroidea oculta (18).

Recomendación N° 22. Intervalo de referencia para TSH

Los intervalos de referencia para TSH se deberían establecer a partir de los límites de confianza del 95% de los valores logarítmicamente transformados de por lo menos 120 individuos voluntarios normales eutiroideos seleccionados rigurosa y selectivamente que no presenten:

- Autoanticuerpos tiroideos detectables, TPOAb o TgAb (determinados por inmunoensayos sensibles)
- Antecedentes personales ni familiares de disfunción tiroidea
- Bocio visible ni palpable
- Medicamentos (excepto estrógenos)

(a) Límites superiores de referencia para la TSH

Durante las últimas dos décadas, el límite superior de referencia para la TSH ha disminuido constantemente de ~10 a aproximadamente ~4,0-4,5 mUI/L. Esta disminución refleja diversos factores que incluyen las mejoras en la sensibilidad y especificidad de los ensayos inmunométricos actuales basados en anticuerpos monoclonales, el reconocimiento de que los valores normales de TSH se distribuyen logarítmicamente y, en especial, las mejoras en la sensibilidad y especificidad de los ensayos de anticuerpos antitiroideos que se utilizan para la preselección de los individuos. El reciente estudio de seguimiento de la cohorte de Whickham ha encontrado que los individuos con TSH sérica >2.0 mUI/L en su primera evaluación tenían una mayor *probabilidad de* desarrollar hipotiroidismo durante los próximos 20 años, en especial si sus anticuerpos antitiroideos eran elevados (35). También se observó un aumento en la probabilidad en sujetos con anticuerpos negativos. Es probable que esos individuos tuvieran niveles bajos de anticuerpos antitiroideos que no se pudieron detectar con los métodos insensibles de aglutinación de anticuerpos microsomaes utilizados en el estudio inicial (207). Es posible también que incluso los inmunoensayos actuales sensibles de TPOAb no puedan identificar a todos los individuos con insuficiencia tiroidea oculta. Quizás en el futuro el límite superior del rango de referencia eutiroideo para la TSH sérica se reduzca a 2,5 mUI/L ya que >95% de los voluntarios normales eutiroideos sometidos a una rigurosa selección tienen valores de TSH sérica entre 0,4 y 2,5 mUI/L.

(a) Límites inferiores de referencia para TSH

Antes de la era de los ensayos inmunométricos, los métodos de determinación de TSH eran demasiado insensibles para detectar valores en el extremo inferior del rango de referencia (209). Sin embargo, los métodos actuales pueden medir TSH en el extremo inferior y situar los límites inferiores entre 0,2 y 0,4 mUI/L (202). Como la sensibilidad de los métodos ha mejorado, ha aumentado el interés por definir el verdadero límite inferior del rango normal para determinar con mayor precisión la presencia de hipertiroidismo leve (subclínico). Los estudios actuales sugieren que los valores de TSH en el rango entre 0,1 y 0,4 mUI/L pueden representar un exceso de hormona tiroidea y en los pacientes añosos podrían estar asociados con un aumento en el riesgo de fibrilación auricular y mortalidad cardiovascular (36, 37). Por lo tanto es importante excluir cuidadosamente a los individuos con bocio y cualquier enfermedad o estrés de la cohorte normal seleccionada para el estudio del rango de referencia.

4. Uso clínico de las determinaciones de TSH

(a) Búsqueda de disfunción tiroidea en pacientes ambulatorios

La mayoría de las sociedades profesionales recomienda que se utilice la TSH para determinar disfunción tiroidea en pacientes ambulatorios, siempre que el ensayo utilizado tenga una sensibilidad funcional igual o menor a 0,02 mUI/L (4, 10, 210). Determinar la sensibilidad del ensayo de TSH es fundamental para la detección confiable de valores por debajo de lo normal, ya que los ensayos menos sensibles tienden a producir resultados falsamente normales en muestras con concentraciones de TSH por debajo de lo normal (202). La relación logarítmica / lineal entre la TSH y la T4L determina que la TSH sérica sea el ensayo de elección, ya que sólo la TSH puede detectar grados leves de exceso o deficiencia de hormona tiroidea (Figura 1) [Sección 2 A1]. La prevalencia de disfunción tiroidea leve (subclínica), caracterizada por una TSH anormal asociada a una T4L en el rango normal informada en estudios de población es de ~10% y 2%, para el hipo e hipertiroidismo subclínicos, respectivamente (10, 18, 25, 211). A pesar de la sensibilidad clínica de la TSH, una estrategia diagnóstica basada en TSH tiene dos limitaciones fundamentales. En primer lugar, requiere que la función hipotalámica hipofisaria sea normal. En segundo lugar, que el estado tiroideo del paciente sea estable, es decir que al paciente no se le haya administrado un tratamiento para el hipo ni el hipertiroidismo recientemente [Sección-2 A1 y Figura 2] (19). Si alguno de estos dos criterios no se cumplen, los resultados de la TSH sérica pueden llevar a un diagnóstico confuso (Tabla 1).

Cuando se investiga la causa de una TSH anormal en presencia de T4L y T3L normales, es importante reconocer que la TSH es una hormona lábil y sujeta a influencias hipofisarias no tiroideas (glucocorticoides, somatostatina, dopamina, etc.) que pueden alterar la relación TSH/T4L (69, 70, 71, 212). Es importante confirmar toda anomalía de la TSH en una nueva muestra extraída después de ~3 semanas antes de hacer un diagnóstico de disfunción tiroidea leve (subclínica) como causa de una anomalía aislada de la TSH. Después de confirmar una TSH alta, la determinación de TPOAb es útil para establecer la presencia de autoinmunidad tiroidea como causa de hipotiroidismo leve (subclínico). Cuanto mayor es la concentración de TPOAb, más rápido es el desarrollo de disfunción tiroidea. Después de confirmar una TSH baja puede ser difícil establecer inequívocamente un diagnóstico de hipertiroidismo leve (subclínico), especialmente si el paciente es añoso y no recibe tratamiento con L-T4 (34). En presencia de bocio multinodular, es probable que la autonomía tiroidea sea la causa de hipertiroidismo leve (subclínico) (213).

No hay consenso con respecto a la edad óptima para iniciar la investigación de disfunción tiroidea. Las recomendaciones de la American Thyroid Association sugieren comenzar a los 35 años y, a partir de ese momento, cada 5 años. (10). El análisis de decisión parece reforzar la relación costo/efectividad de esta estrategia, especialmente en mujeres (215). La estrategia de utilizar TSH para investigar hipo e hipertiroidismo leves (subclínicos), seguirá debatiéndose hasta que se logre un mayor acuerdo acerca de las consecuencias clínicas y el resultado de tener una TSH crónicamente anormal. Además, se necesita llegar a un acuerdo con respecto al nivel de anomalía de TSH que indicaría la necesidad de tratamiento (216, 217).

Cada vez más evidencia sugiere que los pacientes con una anomalía persistente de TSH pueden estar expuestos a un mayor riesgo si no reciben tratamiento. Específicamente, un estudio reciente informó un aumento en el índice de mortalidad cardiovascular cuando los pacientes tenían una TSH sérica crónicamente baja (37). Además, un creciente número de informes indica que el hipotiroidismo leve en las primeras etapas del embarazo aumenta la pérdida fetal y daña el coeficiente intelectual del bebé (63-65). Estos estudios apoyan la eficacia de una evaluación temprana de la función tiroidea, especialmente en mujeres en edad fértil.

(b) Pacientes ancianos

La mayoría de los estudios apoyan la investigación de disfunción tiroidea en personas ancianas (10, 35, 214). La prevalencia tanto de TSH baja como alta (asociada con T4L normal) aumenta en los pacientes ancianos en comparación con los más jóvenes. A medida que se envejece, aumenta la prevalencia de tiroiditis de Hashimoto, asociada con elevación de TSH y TPOAb detectables (35). En los pacientes ancianos, también se produce un aumento en la incidencia de TSH baja (35). Una TSH baja puede ser transitoria, pero es un hallazgo persistente en aproximadamente el 2 % de los individuos ancianos, sin ninguna otra evidencia aparente de disfunción tiroidea (36, 214). Esto puede deberse a un cambio en el valor de ajuste con la T4L, un cambio en la bioactividad de la TSH, o un leve exceso de hormona tiroidea (218). Un estudio reciente realizado por Parle y colaboradores mostró un aumento en el índice de mortalidad cardiovascular en esos pacientes (37). Esto sugiere que la causa de un valor persistentemente bajo de TSH se debería investigar activamente (37). El bocio multinodular se debería descartar como causa en especial en zonas de deficiencia de yodo (213). Los medicamentos que ingiere el paciente, se deberían revisar cuidadosamente (incluidos los de venta libre, algunos de los cuales contienen T3). Si no hay presencia de bocio y los antecedentes de medicamentos son negativos, se recomienda volver a controlar la TSH sérica junto con TPOAb después de 4 a 6 semanas. Si la TSH aún se mantiene baja y los TPOAb son positivos, se debería considerar la posibilidad de una disfunción tiroidea autoinmune. El tratamiento ante una TSH baja se debería determinar según cada caso.

(c) Tratamiento de reemplazo con L-T4

En la actualidad existe amplia documentación que demuestra que los pacientes hipotiroideos tienen valores de T4L sérica en el tercio superior del intervalo de referencia cuando la dosis de reemplazo con L-T4 se ajusta para situar a la TSH dentro del rango del objetivo terapéutico (0,5-2,0 mUI/L) (219, 220).

La levotiroxina (L-T4), y no la tiroides disecada, es la medicación de reemplazo a largo plazo preferida para el hipotiroidismo.

Generalmente, con una dosis promedio de L-T4 equivalente a 1,6 µg/kg de peso corporal/día en los adultos se logra un estado eutiroideo. Los niños necesitan dosis más elevadas (hasta 4,0 µg/kg de peso corporal/día) y los individuos ancianos dosis menores (1,0 µg/kg de peso corporal/día) (221, 222). La dosis inicial y el período de tiempo óptimo necesario para establecer la dosis total de reemplazo se deberían personalizar en función de la edad, el peso y el estado cardíaco del paciente. Se debe aumentar la dosis de L-T4 durante el embarazo [Sección-2 A3] y en mujeres post-menopáusicas que recién comienzan el tratamiento hormonal de reemplazo (223).

Un resultado de TSH sérica entre 0,5 y 2,0 mUI/L es generalmente considerado el objetivo terapéutico para una dosis de reemplazo estándar con L-T4 para el hipotiroidismo primario.

Una concentración de T4L sérica en el tercio superior del intervalo de referencia es el objetivo terapéutico del tratamiento de reemplazo con L-T4 cuando los pacientes tienen hipotiroidismo central debido a disfunción hipofisaria o hipotalámica.

El esquema habitual para aumentar la dosis gradualmente hasta llegar a la dosis de reemplazo completa consiste en administrar la L-T4 con incrementos de 25 µg cada 6 a 8 semanas hasta alcanzar la dosis

objetivo (TSH sérica 0.5-2.0 mUI/L). Como se muestra en la Figura 2, la TSH es lenta para equilibrarse otra vez ante un nuevo nivel de tiroxina. Los pacientes con hipotiroidismo crónico grave pueden desarrollar hiperplasia tirotrófica hipofisaria que quizás simule un adenoma hipofisario, pero que se resuelve después de varios meses de tratamiento de reemplazo con L-T4 (224). Es posible que los pacientes a quienes se administra rifampicina y anticonvulsivantes que influyen en el metabolismo de la L-T4 también necesiten un aumento en la dosis para mantener la TSH dentro del rango del objetivo terapéutico.

Tanto la T4 libre como la TSH deberían utilizarse para el control de pacientes hipotiroideos con sospecha de discontinuidad o falta de cumplimiento con el tratamiento con L-T4. La asociación paradójica de T4L alta y TSH alta a menudo indica que puede haber problemas con el cumplimiento del tratamiento. Concretamente, la ingestión aguda de L-T4, que no se tomó cuando correspondía-, realizada antes de una visita clínica elevará la T4L pero no normalizará la TSH sérica debido al efecto “demora en la respuesta” (Figura 2). Se necesitan por lo menos 6 semanas antes de volver a determinar la TSH después de un cambio en la dosis de L-T4 o en la marca comercial. Se recomienda una determinación de TSH anual en los pacientes que reciben una dosis estable de L-T4. El momento del día óptimo para determinar TSH no está afectado por la hora en que se ingiere la L-T4 (133). No obstante, cuando se utiliza T4L como estrategia de evaluación, la dosis diaria debería omitirse, ya que la T4L sérica aumenta significativamente (~13%) sobre el nivel basal, durante 9 horas después de la toma de la última dosis (225).

Idealmente se debería tomar la L-T4 antes de comer, a la misma hora y con por lo menos 4 horas de separación con otros medicamentos o vitaminas. Muchos medicamentos pueden alterar la absorción o el metabolismo de la T4 (en especial colestiramina, sulfato ferroso, proteína de soja, sucralfato, antiácidos que contengan hidróxido de aluminio, anticonvulsivantes o rifampicina) (4, 226).

(d) Tratamiento de supresión con L-T4

La dosis de L-T4 destinada a suprimir los niveles de TSH sérica a valores subnormales se reserva habitualmente para los pacientes con carcinoma tiroideo bien diferenciado para los que la tirotrófina se considera un factor trófico (227). La eficacia del tratamiento supresivo con L-T4 se ha determinado a partir de estudios retrospectivos sin control que han aportado resultados conflictivos (228, 229).

Es importante personalizar el grado de supresión de la TSH considerando los factores del paciente, como: edad, cuadro clínico, incluidos los factores cardíacos y riesgo de recurrencia del carcinoma diferenciado de tiroides, contra los efectos potencialmente dañinos de un hipertiroidismo iatrogénico leve sobre el corazón y los huesos (36). Muchos médicos utilizan un valor entre 0,05-0,1 mUI/L de TSH para los pacientes de bajo riesgo y de <0,01 mUI/L para los de alto riesgo. Algunos médicos reducen la dosis de L-T4 para obtener valores normales-bajos de TSH cuando los pacientes no tienen niveles detectables de tiroglobulina (Tg) sérica ni recidiva 5 ó 10 años después de la tiroidectomía. El tratamiento de supresión para el bocio no endémico se considera generalmente ineficaz (230). Además, los pacientes con bocio nodular a menudo ya tienen la TSH suprimida como resultado de la autonomía tiroidea (213).

Recomendación N° 23. Tratamiento de reemplazo con levotiroxina (L-T4) para el hipotiroidismo primario

- La levotiroxina (L-T4), no la tiroides disecada, es el medicamento preferido para el tratamiento de reemplazo a largo plazo en el hipotiroidismo.
- Generalmente, se logra un estado eutiroideo en los adultos con una dosis promedio de L-T4 de 1,6 µg/kg de peso corporal/día. La dosis inicial y el período de tiempo para alcanzar el reemplazo completo se debería personalizar en función de la edad, el peso y el estado cardíaco del paciente. Normalmente la dosis inicial de L-T4 es de 50-100 µg diarios. La determinación de TSH sérica después de seis semanas indicará la necesidad de ajuste de dosis con aumentos de 25 a 50 µg.
- Los niños requieren dosis más elevadas de L-T4, hasta 4.0 µg/kg de peso corporal/día, debido a la rapidez de su metabolismo. Los valores de TSH y de T4L se deberían evaluar utilizando rangos de referencia específicos para cada edad y método (Tabla 3).

- Un nivel de TSH sérica entre 0,5 y 2,0 mUI/L, generalmente se considera el objetivo terapéutico óptimo para una dosis estándar de reemplazo con L-T4 para el hipotiroidismo primario.
- La TSH demora en re-equilibrarse luego de una nueva dosis de tiroxina (Recomendación N° 2). Se necesitan entre 6 a 8 semanas antes de volver a evaluar la TSH después de un cambio de dosis de L-T4 o de marca comercial.
- La discontinuidad o la falta de cumplimiento con el tratamiento de reemplazo con levotiroxina (L-T4) resultará en valores discordantes de TSH y T4L (TSH elevada / T4L elevada) debido a la persistente inestabilidad del estado tiroideo (Recomendación N° 2). Tanto la TSH como la T4L se deberían utilizar para controlar a dichos pacientes.
- Los requerimientos de tiroxina disminuyen con la edad. Los individuos mayores quizás requieran menos de 1.0 µg/kg de peso corporal/día y se los debe ajustar muy progresivamente. Se recomienda una dosis inicial de 25 µg para los pacientes con evidencia de cardiopatía isquémica seguida de aumentos de 25 µg en la dosis cada 3 a 4 semanas hasta que se alcance la dosis de reemplazo completa. Algunos médicos consideran que un valor más elevado de TSH (0,5-3,0 mUI/L) puede ser adecuado para los pacientes ancianos.
- En casos de hipotiroidismo severo una dosis inicial mayor de L-T4 es el medio más rápido para restaurar el nivel terapéutico de T4L porque el exceso de sitios de fijación sin ocupar puede bloquear la respuesta de la T4L al tratamiento.
- Los requerimientos de tiroxina aumentan durante el embarazo. El estado tiroideo se debe controlar con TSH + T4L en cada trimestre del embarazo. Se debería aumentar la dosis de L-T4 (generalmente 50 µg/día) para mantener la TSH sérica entre 0,5 y 2,0 mUI/L y una T4L sérica en el tercio superior del intervalo normal de referencia.
- Las mujeres post menopáusicas que comiencen un tratamiento de reemplazo pueden necesitar un aumento en la dosis de L-T4 para mantener la TSH sérica dentro del objetivo terapéutico.
- Se recomienda una determinación anual de TSH en los pacientes que reciben una dosis estable de L-T4. El momento óptimo para realizar la determinación de TSH no está influido por el momento del día en que se ingiere la dosis de L-T4.
- Idealmente se debería tomar la L-T4 antes de comer, a la misma hora y con por lo menos 4 horas de separación con otros medicamentos o vitaminas. La dosis nocturna debería tomarse dos horas después de la última comida.
- Es posible que los pacientes que inicien tratamiento crónico con colestiramina, sulfato ferroso, carbonato de calcio, proteína de soja, sucralfato y antiácidos que contengan hidróxido de aluminio, que influyen en la absorción de L-T4 necesiten una dosis más elevada para mantener la TSH dentro del rango del objetivo terapéutico.
- Es posible que los pacientes a quienes se administra rifampicina y anticonvulsivantes que influyen en el metabolismo de la L-T4 también necesiten un aumento en la dosis para mantener la TSH dentro del rango del objetivo terapéutico.

Recomendación N° 24. Tratamiento supresivo con levotiroxina (L-T4)

- LA TSH sérica se considera un factor de crecimiento para el carcinoma diferenciado de tiroides (CDT). La dosis habitual de L-T4 utilizada para suprimir la TSH en los pacientes con CDT es 2,1µg/kg de peso corporal/día.
- El nivel de TSH a alcanzar para el tratamiento supresivo con L-T4 para los pacientes con CDT se debería personalizar en función de la edad y del estado clínico (incluidos los factores cardíacos y el riesgo de recidiva de CDT).
- Muchos médicos utilizan un valor objetivo de 0,05-0,1 mUI/L de TSH sérica para los pacientes de bajo riesgo y de <0,01 mUI/L para los de alto riesgo.
- Algunos médicos utilizan un objetivo terapéutico dentro de un rango bajo-normal para la TSH cuando los pacientes tienen niveles no detectables de Tg sérica y no han tenido recidiva entre 5 y 10 años después de la tiroidectomía.
- Si la ingesta de yodo es insuficiente, el tratamiento de supresión con L-T4 rara vez es una estrategia de tratamiento eficaz para reducir la magnitud del bocio.
- Con el tiempo, el bocio multinodular habitualmente desarrolla una autonomía caracterizada por un nivel de TSH subnormal. La TSH sérica se debería controlar antes de iniciar un tratamiento de supresión con L-T4 en esos pacientes.

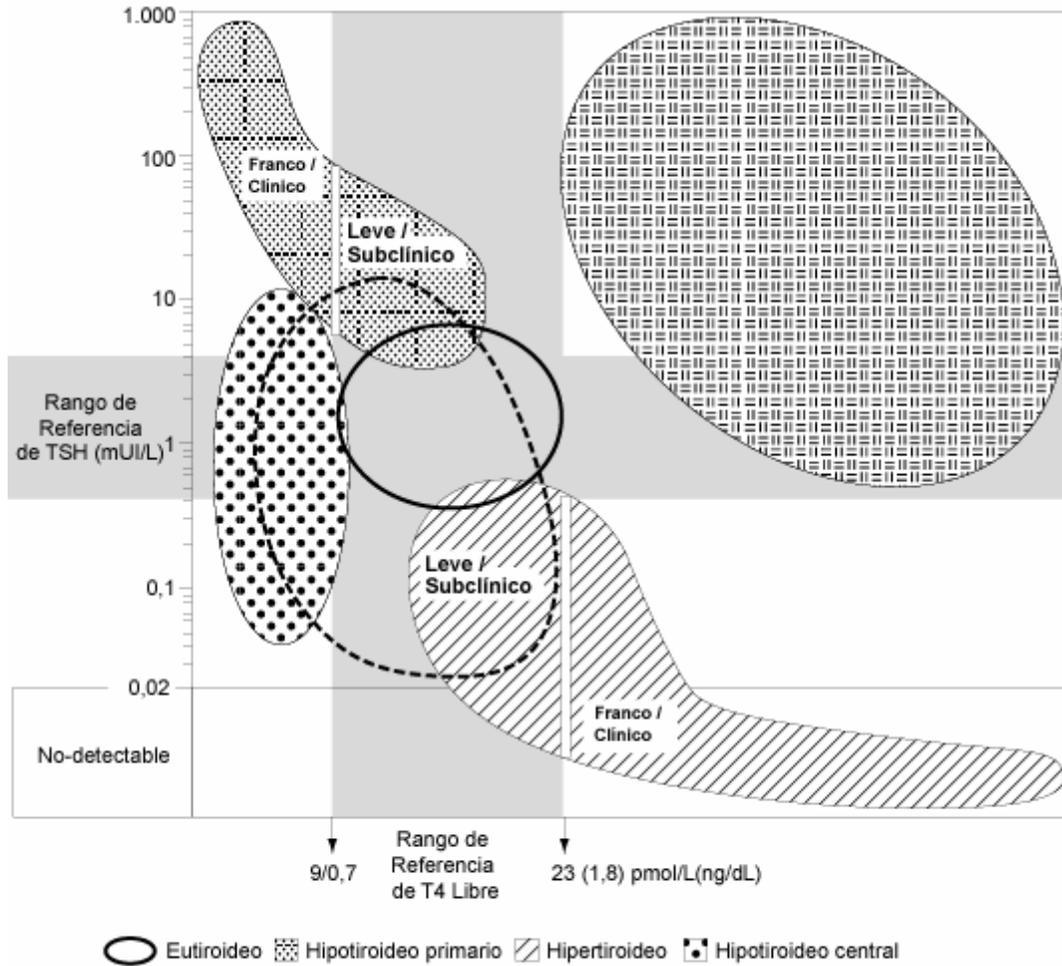


Fig. 4. Relación TSH / T4L séricas característica de diferentes condiciones clínicas

(e) Determinación de TSH sérica en pacientes hospitalizados con (NTI)

Aunque la mayoría de los pacientes hospitalizados con enfermedades no tiroideas tienen concentraciones normales de TSH sérica, es frecuente observar anomalías transitorias en la TSH en el rango entre 0,02 y 20 mUI/L en ausencia de disfunción tiroidea (20, 87, 92, 93). Se ha sugerido que el uso de un rango de referencia más amplio (0,02 –10 mUI/L) mejoraría el valor predictivo positivo de las determinaciones de TSH para la evaluación de los pacientes enfermos hospitalizados (20, 92, 93, 231). La TSH se debería utilizar junto con un método de estimación de T4L (o T4T) para evaluar a los pacientes hospitalizados con síntomas clínicos o a los pacientes con antecedentes de disfunción tiroidea (Recomendaciones 6 y 25).

A veces la causa de la anomalía de la TSH en un paciente hospitalizado es evidente, como en el caso de los que reciben tratamiento con dopamina o glucocorticoides (87, 92). En otros casos, esa anomalía es transitoria, parece causada por la NTI *per se*, y se resuelve cuando el paciente se recupera. Es común observar una supresión más leve y transitoria de TSH en el rango entre 0,02 y 0,2 mUI/L durante la fase aguda de una enfermedad, seguida de un rebote a valores ligeramente elevados durante la recuperación (103). Es importante utilizar un ensayo de TSH con una sensibilidad funcional $\leq 0,02$ mUI/L en el ambiente hospitalario para estar en condiciones de determinar con seguridad el grado de supresión de TSH. Concretamente, el grado de supresión de TSH se puede utilizar para discriminar a los pacientes hipertiroides con TSH marcadamente baja ($<0,02$ mUI/L), de los pacientes con una supresión leve y transitoria por NTI (20).

Recomendación N° 25. Determinación de TSH en pacientes hospitalizados

- TSH + T4L o T4T es la combinación de ensayos más útil para detectar disfunción tiroidea en un paciente enfermo hospitalizado.
- Es más adecuado utilizar un intervalo de referencia de TSH más amplio (0,05 a 10,0 mUI/L) en pacientes hospitalizados. Los niveles séricos de TSH pueden volverse transitoriamente subnormales en la fase aguda y volverse elevados en la fase de recuperación de una enfermedad.
- Un valor de TSH entre 0,05 y 10,0 mUI/L generalmente concuerda con un estado eutiroideo, o solamente con una anomalía tiroidea menor que se puede reevaluar después de que pase la enfermedad. (Esto solamente se aplica a los pacientes que no reciben medicamentos como dopamina que inhibe directamente la secreción hipofisaria de TSH).
- Un nivel normal-bajo de TSH en presencia de T4T y T3T bajas puede reflejar hipotiroidismo central como resultado de una enfermedad prolongada. Si esta es una condición que requiere o no tratamiento inmediato, es un tema incierto y actualmente controvertido.
- En caso de sospecha de disfunción tiroidea, se puede realizar una determinación de anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea (TPOAb) para diferenciar enfermedad tiroidea autoinmune de NTI.

El diagnóstico de hipertiroidismo en los pacientes con enfermedades no tiroideas puede ser un desafío porque los métodos actuales de T4L pueden dar valores inapropiadamente bajos y altos en pacientes eutiroideos con NTI (101, 232). Las determinaciones séricas de T4T y T3T pueden ser útiles para confirmar un diagnóstico de hipertiroidismo si se las analiza en función de la gravedad de la enfermedad (Recomendación N° 6). Una TSH suprimida por debajo de 0,02 mUI/L es menos específica para el hipertiroidismo en individuos hospitalizados en comparación con los pacientes ambulatorios. Un estudio mostró que el 14% de los pacientes hospitalizados con TSH <0,01 mUI/L eran eutiroideos. No obstante, dichos pacientes tienen una respuesta detectable de la TSH al TRH, mientras que los pacientes verdaderamente hipertiroides con NTI no la tienen (20).

No es fácil diagnosticar el hipotiroidismo leve (subclínico) durante la hospitalización, debido a la frecuencia de valores altos de TSH asociados con las NTI. Siempre que la T4L o la T4T estén dentro de los límites normales, es poco probable que una anomalía menor en la TSH (0,02-20,0 mUI/L) producida por una patología tiroidea leve (subclínica) afecte el resultado de la hospitalización, y se puede posponer la evaluación para 2 o 3 meses después del alta. Por el contrario, los pacientes hipotiroideos enfermos presentan una combinación característica de T4 baja y TSH elevada (>20 mUI/L) (92).

(f) Hipotiroidismo central

La relación logarítmica / lineal entre la TSH y la T4L determina que los pacientes con hipotiroidismo primario y una T4L por debajo de lo normal deberían tener un valor de TSH sérica > 10mUI/L (Figura 1) [Sección-2 A1]. Cuando el grado de aumento de la TSH asociado con un nivel bajo de hormona tiroidea parece inapropiadamente bajo, se debería descartar insuficiencia hipofisaria. Normalmente no se obtendrá un diagnóstico de hipotiroidismo central si se utiliza la estrategia de TSH como determinación inicial (19).

Recomendación N° 26. Tratamiento de reemplazo con levotiroxina (L-T4) para el hipotiroidismo central

- El objetivo terapéutico del tratamiento de reemplazo con L-T4 para el hipotiroidismo central debido a disfunción hipofisaria o hipotalámica es una T4L sérica en el tercio superior del intervalo de referencia.
- Cuando se utiliza la T4L como punto final terapéutico para el hipotiroidismo central, la dosis diaria de L-T4 debe suprimirse el día de la determinación de T4L. (La T4L sérica aumenta (~13 %) por sobre el nivel basal durante 9 horas después de la ingestión de L-T4).

En la mayoría de los casos, el hipotiroidismo central se caracteriza por valores paradójicamente normales o ligeramente elevados de TSH sérica (29). En un estudio realizado con pacientes con hipotiroidismo central, el 35% de ellos tenía valores de TSH por debajo de lo normal pero el 41% y el 25% tenían valores inapropiadamente normales y elevados, respectivamente (233). En la actualidad existe amplia documentación que demuestra que los niveles paradójicamente elevados de TSH observados en el hipotiroidismo central derivan de la medición de isoformas biológicamente inactivas de TSH secretadas cuando hay daño hipofisario o cuando la estimulación del TRH hipotalámico es deficiente (197). Los valores inapropiados de TSH se deben a que los anticuerpos monoclonales utilizados en los ensayos actuales de TSH no pueden distinguir entre las isoformas de TSH de diferente actividad biológica, ya que la actividad biológica de la TSH está determinada no por la estructura proteica sino por el grado de glucosilación, específicamente la sialización de la molécula. Parecería que una secreción normal de TRH es esencial para la sialización normal de la TSH y para la asociación de las subunidades de TSH para formar moléculas maduras y biológicamente activas (29, 197, 234). La actividad biológica de la TSH en el hipotiroidismo central parece guardar una relación inversa con el grado de sialización de la TSH y con el nivel de T4L en la circulación (29). Las pruebas de estimulación de TRH pueden resultar útiles para el diagnóstico específico del hipotiroidismo central (235). Las respuestas típicas de la TSH en esas condiciones están bloqueadas (aumentos menores al doble del basal/ incrementos ≤ 4.0 mUI/L) y el pico puede estar demorado (197, 204, 235, 236). Además, la respuesta de T3 a la TSH estimulada por TRH está bloqueada y se correlaciona con la actividad biológica de la TSH (197, 237, 238).

Recomendación N° 27. Utilidad clínica de los ensayos de TSH (Sensibilidad funcional $\leq 0,02$ mUI/L)

- La determinación de TSH sérica es el ensayo más sensible para la detección de hipo o hipertiroidismo primario leve (subclínico) y clínico en los pacientes ambulatorios.
- La mayoría (>95%) de los individuos sanos eutiroides tiene una concentración de TSH sérica por debajo de 2,5 mUI/L. Los pacientes ambulatorios con TSH sérica por encima de 2,5 mUI/L confirmada por una segunda determinación realizada entre 3 y 4 semanas después, pueden hallarse en las primeras etapas de disfunción tiroidea, en particular si se detectan TPOAb.
- La determinación de TSH sérica es el punto final terapéutico para el ajuste de dosis de reemplazo con L-T4 para el hipotiroidismo primario (ver Recomendación N° 23) y para controlar el tratamiento de supresión con L-T4 para el carcinoma diferenciado de tiroides (ver Recomendación N° 24).
- Las determinaciones de TSH sérica son más confiables que las de T4L en pacientes hospitalizados con enfermedades no tiroideas que no reciban dopamina. La TSH sérica se debería utilizar junto con la T4T o T4L para los pacientes hospitalizados (Recomendación N° 6 y 26).
- La TSH no se puede utilizar para diagnosticar hipotiroidismo central porque los ensayos actuales de TSH miden isoformas biológicamente inactivas de TSH.
- El hipotiroidismo central se caracteriza por un nivel inapropiadamente normal o ligeramente elevado de TSH sérica y una respuesta nula al TRH (aumentos <2 veces el basal / incrementos ≤ 4.0 mUI/L).
- Debería ser considerado un diagnóstico de hipotiroidismo central en caso de disminución de T4L y mínima elevación de la TSH sérica (<10 mUI/L).
- Las determinaciones de TSH son una importante prueba de screening pre-natal y en el primer trimestre de embarazo para detectar hipotiroidismo leve (subclínico) en la madre (ver Recomendación N° 4).
- Una TSH baja en un bocio multinodular sugiere hipertiroidismo leve (subclínico) debido a autonomía tiroidea.
- Se requiere una determinación de TSH para confirmar que un nivel de hormona tiroidea alto se debe a hipertiroidismo y no a una anomalía en las proteínas transportadoras como en la hipertiroxinemia disalbuminémica familiar (FDH).
- La TSH sérica es la determinación primaria para la detección de disfunción tiroidea inducida por amiodarona (ver Recomendación N°5).

(g) Síndromes de secreción inapropiada de TSH

Como se muestra en la Tabla 1, las anomalías de las proteínas transportadoras o los problemas técnicos de los ensayos son las causas más comunes de una relación T4L/TSH discordante. La disociación

aparentemente paradójica entre los niveles altos de hormonas tiroideas y una TSH sérica no suprimida ha llevado al uso generalizado del término “síndrome de secreción inapropiada de TSH” para describir estas patologías. Cada vez más están siendo identificadas muestras que presentan una relación TSH/T4L discordante, dada la disponibilidad y uso generalizados de ensayos de TSH sensibles, que pueden detectar en forma confiable concentraciones de TSH subnormales [Sección-3 C2]. Como se muestra en la Tabla 1, es fundamental descartar primero las causas probables de una discordancia en el índice TSH/T4L (por ejemplo, interferencia técnica o anomalías en las proteínas transportadoras). Esta confirmación se debería realizar sobre una nueva muestra determinando TSH junto con las hormonas tiroideas libres y totales, con el método de otro fabricante. Patologías menos frecuentes, como tumores hipofisarios secretantes de TSH o resistencia a las hormonas tiroideas sólo deberían considerarse después de eliminar las causas más comunes de discordancia.

Una vez confirmada la anomalía en el perfil bioquímico, se debería descartar primero la posibilidad de que un tumor hipofisario secretante de TSH sea la causa de los valores paradójicos de TSH antes de efectuar el diagnóstico de resistencia a las hormonas tiroideas. Cabe observar que es posible la coexistencia de ambas patologías (247). Los tumores hipofisarios secretantes de TSH tienen perfiles bioquímicos similares a la resistencia a las hormonas tiroideas pero se los puede distinguir de éstas mediante la determinación de subunidad alfa de TSH y diagnóstico por imágenes. Además, las pruebas de estimulación con TRH pueden ser ocasionalmente útiles para desarrollar el diagnóstico diferencial. Concretamente, una prueba de estimulación de TRH y una prueba de supresión de T3 con respuesta bloqueada son características de la mayoría de los tumores hipofisarios secretantes de TSH, mientras que en la mayoría de los casos de resistencia a las hormonas tiroideas se observa una respuesta normal (245).

(i) Tumores hipofisarios secretantes de TSH

Los tumores hipofisarios que hipersecretan TSH no son frecuentes y representan menos del 1% de los casos de secreción inapropiada de TSH (27, 28). Estos tumores a menudo se presentan como un macroadenoma con síntomas de hipertiroidismo, asociado a TSH no suprimida y evidencia mediante resonancia magnética (MRI), de masa hipofisaria (28).

Después de descartar una razón técnica para la elevación paradójica de TSH (por ejemplo anticuerpos heterófilos HAMA), el diagnóstico de tumor hipofisario secretante de TSH generalmente se realiza sobre la base de:

- Falta de respuesta de la TSH al TRH
- Una subunidad alfa de TSH alta.
- Una relación subunidad alfa/TSH aumentada
- La demostración de una masa hipofisaria mediante resonancia magnética

Recomendación N° 28. Para los fabricantes de equipos de reactivos de TSH

- Es necesario que los fabricantes que comercializan los reactivos para determinación de TSH con diversas sensibilidades interrumpen la comercialización del producto menos sensible.
- No se justifica que el precio de los ensayos de TSH se establezca en función de la sensibilidad.
- No existe justificación científica para realizar primero un ensayo de TSH menos sensible y luego pasar a otro más sensible.
- Los fabricantes deberían ayudar a que los laboratorios puedan establecer la sensibilidad funcional independientemente de ellos, suministrándoles mezclas de suero humano con TSH adecuadamente baja cuando se les solicite.
- Los fabricantes deberían indicar el uso de factores de calibración, en especial si estos factores dependen de cada país.
- Los fabricantes deberían citar la el porcentaje de recuperación de la preparación de referencia de TSH a la concentración indicada como sensibilidad funcional.
- Los folletos con los procedimientos técnicos dentro de la caja del equipo deberían:

- Documentar la sensibilidad funcional real de los métodos utilizando el protocolo de la Recomendación N° 20.
- Citar la sensibilidad funcional que se puede alcanzar a través de un rango de laboratorios clínicos utilizando el mismo equipo de reactivos.
- Mostrar el perfil de precisión interensayo típico que se espera de un laboratorio clínico.
- Recomendar el uso de sensibilidad funcional y no analítica para determinar el valor más bajo reportable. (La sensibilidad analítica insta a los laboratorios a que adopten límites de detección no reales).

(ii) Resistencia a las hormonas tiroideas

Generalmente, la resistencia a las hormonas tiroideas es provocada por una mutación en el gen del receptor de las hormonas tiroideas (TR-beta), que ocurre en 1:50.000 nacimientos vivos (239-242). Aunque la presentación clínica puede variar, los pacientes tienen un perfil bioquímico similar. La T4L y la T3L están típicamente elevadas (desde un grado mínimo hasta duplicar o triplicar el valor por sobre el límite normal superior) y se asocian con una TSH normal o ligeramente elevada que responde a la estimulación con TRH (242, 243). Sin embargo, se debería reconocer que la secreción de TSH no es inapropiada ya que se reduce la respuesta de los tejidos a la hormona tiroidea y en consecuencia se requieren niveles más altos de hormonas tiroideas para mantener el estado metabólico normal. Los pacientes con resistencia a las hormonas tiroideas suelen tener bocio como resultado de la hipersecreción crónica de una isoforma de TSH híbrida con mayor actividad biológica (199, 244). La manifestación clínica del exceso de la hormona tiroidea cubre un amplio espectro. Algunos pacientes parecen tener un metabolismo normal con valores casi normales de TSH y en ellos el defecto del receptor parece estar compensado por un aumento en los niveles de la hormona tiroidea (resistencia generalizada a las hormonas tiroideas). Otros pacientes parecen ser hipermetabólicos y tienen un defecto que afecta selectivamente a la hipófisis (resistencia hipofisaria a la hormona tiroidea).

Los rasgos distintivos de la resistencia a las hormonas tiroideas son la presencia de una TSH no suprimida junto con una respuesta adecuada al TRH a pesar del aumento en los niveles de hormonas tiroideas (242, 245). Aunque no sea frecuente, es importante que se considere el diagnóstico de resistencia a las hormonas tiroideas al encontrar un paciente con aumento en los niveles de estas hormonas asociado con un nivel paradójicamente normal o elevado de TSH (242, 246). A menudo esos pacientes han recibido un diagnóstico erróneo de hipertiroidismo y se los ha sometido a una cirugía tiroidea innecesaria o a la ablación de la glándula con radioyodo (242).

D. Autoanticuerpos Antitiroideos (TPOAb, TgAb y TRAb)

La enfermedad tiroidea autoinmune (AITD) causa daño celular y altera la función tiroidea por mecanismos humorales y celulares. Se produce daño celular cuando los linfocitos-T sensibilizados o los autoanticuerpos se fijan a las membranas celulares tiroideas provocando lisis celular y reacciones inflamatorias. Las alteraciones en la función tiroidea se producen por acción de los autoanticuerpos estimulantes o bloqueantes sobre los receptores de membrana de las células. Tres autoantígenos principales participan en la AITD: Tiroperoxidasa (TPO), Tiroglobulina (Tg) y Receptor de TSH. También se han descrito otros autoantígenos, como el co-transportador Na⁺/I⁻(NIS), pero todavía no tienen un rol diagnóstico en la enfermedad tiroidea autoinmune (248). Los anticuerpos anti-receptor de TSH (TRAb) son heterogéneos y pueden simular la acción de TSH y causar hipertiroidismo, como se observa en la enfermedad de Graves, o pueden antagonizar la acción de TSH y causar hipotiroidismo. Esta segunda posibilidad se produce en el neonato como resultado del pasaje transplacentario de los anticuerpos de la madre con AITD. Los anticuerpos anti TPO (TPOAb) parecen participar en los procesos tisulares destructivos asociados con el hipotiroidismo que se observan en la tiroiditis de Hashimoto y en la tiroiditis atrófica. La aparición de TPOAb generalmente precede al desarrollo de disfunción tiroidea. Algunos estudios sugieren que los TPOAb pueden ser citotóxicos para la tiroides (249, 250). El rol patológico de los TgAb no está aún del todo claro. En áreas suficientes de yodo, los TgAb se determinan principalmente como ensayo adjunto a la determinación de Tg sérica, porque la presencia de estos anticuerpos puede interferir con los métodos de Tg [Sección-3 E6]. En áreas deficientes de yodo, las determinaciones de TgAb pueden resultar útiles para la detección de enfermedad tiroidea autoinmune en pacientes con bocio nodular y para el control del tratamiento con yodo en el bocio endémico.

Los métodos de laboratorio que determinan los procesos autoinmunes mediados por células no están disponibles por el momento. Sin embargo, en la mayoría de los laboratorios clínicos se dispone de ensayos para evaluar la respuesta humoral, por ejemplo los anticuerpos antitiroideos. Lamentablemente, el uso diagnóstico y pronóstico de las determinaciones de anticuerpos antitiroideos está afectado por los problemas técnicos que se discutirán. Si bien los ensayos de autoanticuerpos tienen utilidad clínica en una serie de patologías, se los debe emplear selectivamente.

1. Significado Clínico de los Autoanticuerpos Antitiroideos

Los TPOAb y/o TgAb están presentes frecuentemente en el suero de pacientes con AITD (251). Sin embargo, a veces los pacientes con AITD tienen anticuerpos negativos. Los TRAb están presentes en la mayoría de los pacientes con enfermedad de Graves pasada o presente. Durante el embarazo, la presencia de TRAb es un factor de riesgo de disfunción tiroidea fetal o neonatal a causa del pasaje transplacentario de los mismos. (252, 253). La prevalencia de autoanticuerpos tiroideos aumenta cuando los pacientes tienen enfermedades autoinmunes no tiroideas, como diabetes tipo 1 y anemia perniciosa (254). El envejecimiento también se asocia con la aparición de anticuerpos antitiroideos y con un aumento en la prevalencia de AITD (255). El significado de los valores bajos de anticuerpos antitiroideos en individuos clínicamente eutiroideos no se conoce. (256). Sin embargo, estudios longitudinales sugieren que los TPOAb pueden ser un factor de riesgo de futura disfunción tiroidea incluyendo tiroiditis post parto (TPP) y complicaciones autoinmunes después del tratamiento con algunos agentes terapéuticos (50, 257, 258). Estos incluyen amiodarona para las cardiopatías, interferón-alfa para la hepatitis C crónica, y litio para los trastornos psiquiátricos (75, 259-262). Generalmente no se recomienda el uso de los anticuerpos antitiroideos para el control del tratamiento de la AITD (263), ya que este se dirige a la consecuencia (disfunción tiroidea) y no a la causa (autoinmunidad) de la enfermedad. Sin embargo, en las concentraciones de los autoanticuerpos reflejan con frecuencia una modificación en la actividad de la enfermedad.

2. Nomenclatura de los Ensayos de Anticuerpos Antitiroideos

La nomenclatura utilizada para los autoanticuerpos antitiroideos ha sido muy variada, en particular en el caso de los anticuerpos anti-receptor de TSH (LATS, TSI, TBII, TSH-R y TRAb). Los términos incluidos en esta monografía, TgAb, TPOAb y TRAb son los recomendados internacionalmente. Estos términos corresponden a las entidades moleculares (inmunoglobulinas) que reaccionan con los autoantígenos

específicos reconocidos por la prueba de laboratorio. Las diferencias entre métodos pueden sesgar la medición de estas entidades moleculares; por ejemplo: los métodos pueden detectar sólo IgG o IgG más IgM; TPOAb o anticuerpos dirigidos contra TPO y otros autoantígenos de membrana; TRAb inhibidores de la unión de TSH y/o estimulantes del receptor de TSH.

3. Especificidad de los Ensayos de Anticuerpos Antitiroideos

Ciertos problemas específicos han obstaculizado el uso de los ensayos para anticuerpos antitiroideos. Los estudios muestran que los resultados varían ampliamente dependiendo del método utilizado. Esto se debe a diferencias tanto en la sensibilidad como en la especificidad, y a la ausencia de una estandarización adecuada. En los últimos años, los estudios a nivel molecular han demostrado que los autoanticuerpos reaccionan con sus autoantígenos blanco, uniéndose a dominios o epitopes “conformacionales”. El término “conformacional” se refiere al requisito de una estructura tridimensional específica para cada epitope reconocido por los autoanticuerpos. En consecuencia, los resultados de los ensayos dependen fundamentalmente de la estructura molecular del antígeno utilizado en el mismo. Los pequeños cambios en la estructura de un determinado epitope pueden resultar en una disminución o pérdida de reconocimiento del autoantígeno por parte del anticuerpo dirigido hacia ese epitope. Últimamente, se ha demostrado la especificidad doble de los anticuerpos TGPO, que reconocen tanto Tg como TPO en el suero de pacientes con AITD (264).

Recomendación N° 29. Diferencias de sensibilidad y especificidad entre métodos para determinación de anticuerpos antitiroideos

- Conocer que los resultados de los anticuerpos anti tiroideos son dependientes del método.
- Los anticuerpos antitiroideos presentes en suero son heterogéneos (reconocen diferentes epitopes antigénicos), y diferentes métodos reconocen diferentes poblaciones de anticuerpos.
- Las diferencias entre ensayos de anticuerpos antitiroideos reflejan diferentes preparaciones de receptores (ensayos de radioreceptor) o de células (bioensayos) usadas en el ensayo.
- Las diferencias entre ensayos pueden ser el resultado de contaminación del reactivo que contiene el antígeno con otros autoantígenos.
- Las diferencias entre ensayos pueden provenir del diseño del ensayo (por ejemplo, inmunoensayo competitivo *versus* no-competitivo) así como de la señal utilizada.
- Las diferencias entre ensayos pueden ser el resultado del uso de diferentes estándares secundarios.

Se conoce desde hace mucho tiempo que los autoanticuerpos están dirigidos contra unos pocos epitopes en comparación con los anticuerpos heterólogos. Los métodos actuales presentan amplias diferencias en cuanto al reconocimiento de epitopes. Específicamente, que pueden provenir de un reconocimiento erróneo de un epitope que introduce un sesgo en la población de autoanticuerpos analizada. Esto genera intervalos de referencia muy diferentes, incluso cuando los métodos están estandarizados contra la misma preparación de referencia internacional. Cualquiera sea el autoantígeno, los anticuerpos antitiroideos claramente no son entidades moleculares únicas sino más bien mezclas de inmunoglobulinas que solamente tienen en común su capacidad de interactuar con Tg, TPO o el receptor de TSH.

Las diferencias en la sensibilidad de los métodos para autoanticuerpos pueden derivar del diseño del ensayo (por ejemplo RIA (competitivo) *versus* IMA de dos sitios (no competitivo), como del tipo de señal (por ejemplo radioisotópica *versus* quimioluminiscente). Las diferencias en especificidad pueden ocurrir como resultado de la contaminación de la preparación del autoantígeno con otros autoantígenos (por ejemplo, microsomas tiroideos *versus* TPO purificada). Además, el error en el reconocimiento de un epitope puede llevar a la subestimación de la cantidad total de autoanticuerpos circulantes presentes, y a una disminución en la sensibilidad.

Recomendación N° 30. Sensibilidad funcional de los ensayos de anticuerpos antitiroideos

La sensibilidad funcional de los ensayos de autoanticuerpos antitiroideos debería:

- Determinarse con mezclas de suero humano que contengan una concentración baja de autoanticuerpos.
- Determinarse utilizando el mismo protocolo descrito para TSH (Recomendación N° 20) pero analizando la precisión entre ensayos durante un lapso entre 6 a 12 meses que represente una adecuada frecuencia clínica de evaluación.

La sensibilidad funcional se debería determinar con mezclas de suero humano que contengan una concentración baja de autoanticuerpos. El protocolo para la sensibilidad funcional debería ser el mismo que se describió para TSH (Recomendación N° 20). La precisión inter-ensayo de los ensayos de TgAb utilizados para el seguimiento de los pacientes con CDT y TgAb positivos se debería evaluar durante un lapso más prolongado (entre 6 y 12 meses) acorde con la frecuencia con que se los solicita para el control seriado en la práctica clínica.

4. Estandarización de los Ensayos de Anticuerpos Antitiroideos

La estandarización de los ensayos de anticuerpos antitiroideos no ha alcanzado todavía un nivel óptimo. Se dispone de las Preparaciones Internacionales de Referencia MRC 65/93 para TgAb, y MRC 66/387 para TPOAb) del National Council for Biological Standards and Control en Londres, Reino Unido (www.mrc.ac.uk). Estos Estándares de Referencia se prepararon y se liofilizaron a partir de una mezcla de suero de pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune ¡hace 40 años!

Recomendación N° 31. Para la estandarización de los Ensayos de Anticuerpos Antitiroideos por los fabricantes.

- Los ensayos se deberían estandarizar contra las Preparaciones Internacionales de Referencia MRC. MRC 65/93 para TgAb, MRC 66/387 para TPOAb y MRC 90/672 para TRAb
- Se deberían elaborar nuevas Preparaciones Internacionales de Referencia para TgAb y TPOAb.
- Los estándares secundarios se deberían caracterizar completamente para evitar el desvío entre diferentes métodos.
- Cuando fuera posible se deberían utilizar preparaciones de referencia o preparaciones con antígeno recombinante.

Se sabe que los anticuerpos liofilizados tienden a degradarse con el tiempo. Esta degradación puede introducir un sesgo en la capacidad de unión de estas preparaciones de referencia hacia anticuerpos más estables, de importancia clínica desconocida. Debido a la escasez de estas preparaciones, sólo se las utiliza como estándares primarios para calibrar los métodos de ensayo. Los equipos comerciales contienen estándares secundarios que difieren para cada método. Con las calibraciones actuales, los ensayos varían según las condiciones experimentales y la preparación antigénica usada por el fabricante. Esto puede introducir un sesgo adicional en la detección de anticuerpos heterogéneos presentes en las muestras de pacientes. En el caso de los TRAb, la preparación de referencia MRC 90/672 es más reciente (1990) pero actualmente es usada por unos pocos fabricantes.

5. Determinaciones de TPOAb

La Peroxidasa tiroidea (TPO), de 110 KD es una hemoglucoproteína unida a membrana, con un gran dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular corto. La TPO participa de la síntesis de hormonas tiroideas en el polo apical de la célula folicular. Se han descrito varias isoformas relacionadas con empalmes alternativos del mRNA de TPO. Las moléculas de TPO también pueden diferir en su estructura tridimensional, grado de glucosilación y unión a grupos hemo. La mayoría de las moléculas de TPO no alcanzan la membrana apical y son degradadas intracelularmente.

Recomendación N° 32: Metodología que se prefiere para TPOAb

- Los inmunoensayos de TPOAb sensibles y específicos, que utilizan como antígeno preparaciones adecuadas de TPO humana nativa o recombinante altamente purificada deberían reemplazar a los antiguos métodos de aglutinación, insensibles y semicuantitativos, para determinar anticuerpos anti-microsomales (AMA).

(Nivel de consenso 90%)

- El significado clínico de las concentraciones bajas de TPOAb requiere más estudio.

Los anticuerpos anti TPO se describieron inicialmente como autoanticuerpos anti-microsomales (AMA) ya que se encontró que reaccionaban con preparaciones crudas de membranas de células tiroideas. Más tarde, el antígeno microsomal se identificó como TPO (265). Los antiguos métodos inmunofluorescentes para AMA así como los métodos de aglutinación pasiva con glóbulos rojos tanados, o micropartículas de gel sensibilizadas, todavía se utilizan en la actualidad, además de los nuevos inmunoensayos de TPOAb, más sensibles, tanto competitivos como no competitivos. Estos nuevos inmunoensayos para TPOAb han venido reemplazando en gran medida a los antiguos métodos de aglutinación para AMA porque son cuantitativos, más sensibles y se los puede automatizar con facilidad. Sin embargo, su variabilidad en cuanto a sensibilidad y especificidad es muy amplia. Parte de esta variabilidad proviene de las diferencias en las preparaciones de TPO utilizadas en los diversos equipos de reactivos. Cuando se extrae la TPO de tejido tiroideo humano, se puede usar como preparación de membrana cruda o puede ser purificada por diferentes métodos. La especificidad de los ensayos también puede diferir debido a la contaminación con otros antígenos tiroideos, en especial Tg y/o por variaciones en la estructura tridimensional de la TPO. El uso de TPO humana recombinante (rhTPO), elimina el riesgo de contaminación pero no soluciona el problema de las diferencias en la estructura de la TPO que dependen de la técnica utilizada para aislarla. La mayoría de los ensayos actuales para TPOAb se cuantifican en unidades internacionales usando la preparación de referencia MRC 66/387. Lamentablemente, el uso de este estándar primario no disminuye las variaciones entre métodos como resulta evidente al observar la amplia variabilidad en los límites de sensibilidad que declaran los diferentes fabricantes de reactivos (rango <0,3 a <20 kUI/L), como así también las diferencias en los intervalos de referencia.

(a) Prevalencia e Intervalos de Referencia de los TPOAb

La estimación de la prevalencia de los TPOAb depende de la sensibilidad y especificidad del método utilizado. El reciente estudio NHANES III en EE.UU de ~17,000 individuos sin enfermedad tiroidea aparente, informó niveles detectables de TPOAb en el 12% de los individuos utilizando un inmunoensayo competitivo (18). Aún no está claro si los valores bajos de TPOAb detectados en individuos sanos o en pacientes con enfermedades autoinmunes no tiroideas reflejan la fisiología normal, preceden a la enfermedad tiroidea autoinmune o son un problema de especificidad del ensayo.

Los valores de referencia para los ensayos de TPOAb son altamente variables y a menudo se establecen arbitrariamente, de modo se obtengan resultados positivos en una amplia mayoría de pacientes con AITD y negativos en la mayoría de individuos sin evidencia clínica de AITD. El límite inferior normal parece estar relacionado con factores técnicos. Específicamente, los ensayos que tienen un límite de detección bajo (<10 kUI/L) informan valores no detectables de TPOAb en individuos normales estrictamente seleccionados. Estos métodos sugieren que la presencia de TPOAb es un hallazgo patológico. Por el contrario, los ensayos de TPOAb que reportan límites de detección más altos (>10kUI/L) citan un “rango normal de referencia”. Como estos últimos, no parecen tener una mayor sensibilidad para detectar AITD, estos valores del “rango normal” pueden representar “ruido” inespecífico del ensayo y es posible que no tengan significado patológico.

El estudio de seguimiento de la cohorte de Whickham realizado durante 20 años informó que la presencia de títulos detectables de TPOAb (medidos como AMA) no sólo era un factor de riesgo para hipotiroidismo sino que la detección de AMA precedía el desarrollo de un aumento en la TSH (Figura 5) (35). Esto sugiere

que TPOAb detectables constituyen un factor de riesgo para AITD (Recomendación N° 34). Sin embargo, individuos con niveles bajos de TPOAb hubieran tenido AMA no detectables con los métodos más antiguos utilizados en este estudio (35). De hecho, los individuos AMA negativos con valores de TSH > 2 mUI/L tuvieron un aumento en el riesgo a largo plazo de hipotiroidismo, lo que sugiere que niveles bajos de TPOAb pueden ser clínicamente significativos (35). En consecuencia, todavía sigue debatiéndose si los individuos con niveles bajos de TPOAb y/o TgAb debieran considerarse normales hasta que estudios de seguimiento a largo plazo de estos individuos demuestren que no tienen un riesgo incrementado de desarrollar disfunción tiroidea.

Recientes estudios sugieren que un número significativo de individuos con TSH entre 2,6 y 4,0 mUI/ml tienen un perfil hipoecóico al ultrasonido, sugestivo de infiltración linfocítica (Figura 5) (496, 497), por lo cual el examen morfológico de la tiroides por ultrasonido es actualmente el modo más sensible de determinar de manera temprana AITD (496, 497). Sin embargo, el TPOAb es el marcador de riesgo de AITD más fácilmente accesible, aunque la especificidad y sensibilidad de los inmunoensayos actuales sean aún subóptimas para detectar enfermedad temprana en individuos con hipoecogenicidad (497).

Recomendación N° 33. Intervalos de Referencia para Ensayos de Anticuerpos Antitiroideos

Los intervalos de referencia para los ensayos de anticuerpos antitiroideos se deberían establecer a partir de 120 individuos “normales” sin antecedentes de enfermedad tiroidea: La selección de los individuos debería minimizar la inclusión de personas con predisposición a enfermedad tiroidea autoinmune. Los individuos normales deberían ser:

- Varones
- Jóvenes (< 30 años de edad)
- Tener niveles de TSH sérica entre 0,5 y 2,0 mUI/L
- Sin bocio
- Sin antecedentes personales ni familiares de enfermedad tiroidea
- Sin enfermedad autoinmune no tiroidea (por ejemplo: lupus o diabetes)

El criterio empleado para seleccionar sujetos para la cohorte normal utilizada para establecer el rango de referencia para autoanticuerpos es crítico. Dicha cohorte debería estar constituida por varones jóvenes, bioquímicamente eutiroideos (TSH 0,5 a 2,0 mUI/L) sin bocio ni antecedentes familiares de AITD. Este riguroso proceso de selección tendría mínimas probabilidades de incluir individuos con predisposición a enfermedad tiroidea autoinmune.

(b) Usos Clínicos de las Determinaciones de TPOAb

La determinación de TPOAb es el método más sensible para la detección de enfermedad tiroidea autoinmune (266). Como se muestra en la figura 5, los TPOAb habitualmente son la primera anomalía bioquímica que aparece en la evolución del desarrollo de hipotiroidismo secundario a la tiroiditis de Hashimoto. De hecho, cuando se determinan los TPOAb mediante un inmunoensayo sensible, más del 95% de los individuos con tiroiditis de Hashimoto tienen valores detectables de TPOAb. Estos métodos también detectan TPOAb en la mayoría de los pacientes con enfermedad de Graves (~85%) (254). Las pacientes con TPOAb detectados a comienzos del embarazo presentan riesgo de desarrollar tiroiditis post parto (50). Los pacientes con síndrome de Down tienen un mayor riesgo de desarrollar disfunción tiroidea debido a enfermedad tiroidea autoinmune y es importante que se sometan a una evaluación anual de TSH y TPOAb (267, 268).

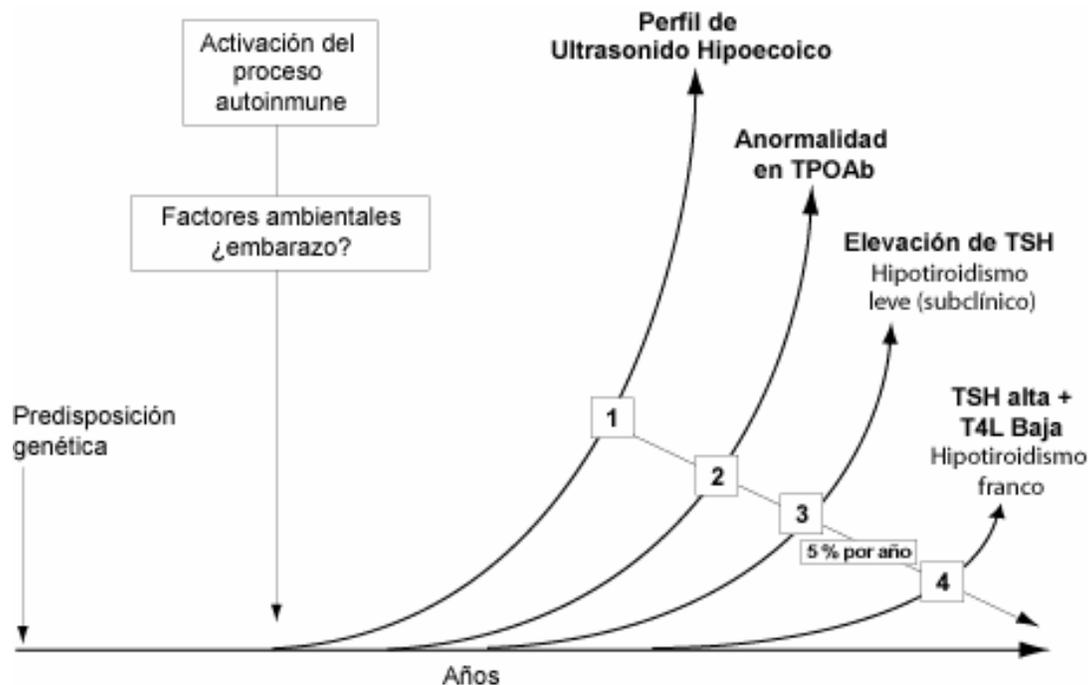


Fig. 5 Etapas del desarrollo de la disfunción tiroidea autoinmune

Informes recientes sugieren que puede existir compromiso del coeficiente intelectual en niños nacidos de madres con TSH alta o TPOAb detectables durante el embarazo (63, 65). Este hallazgo ha llevado a la recomendación de que todas las embarazadas se realicen TSH y TPOAb en el primer trimestre. [Sección-2 A3 y Recomendación N° 4]. Además, los TPOAb pueden jugar un rol en la infertilidad, ya que su presencia se ha asociado con el aumento de riesgo de aborto espontáneo y de la dificultad para concebir mediante fertilización *in vitro* (269).

Recomendación N° 34. Usos Recomendados para las determinaciones de TPOAb

- Diagnóstico de Enfermedad Tiroidea Autoinmune
- Como Factor de riesgo de Enfermedad Tiroidea Autoinmune
- Como Factor de riesgo de hipotiroidismo durante el tratamiento con Interferón alfa, Interleuquina 2 o Litio
- Como Factor de riesgo de disfunción tiroidea durante el tratamiento con amiodarona (ver Recomendación N° 5)
- Como Factor de riesgo de hipotiroidismo en pacientes con síndrome de Down
- Como Factor de riesgo de aborto espontáneo y fracaso de la fertilización *in vitro*
- Factor de riesgo de disfunción tiroidea durante el embarazo y de tiroiditis post parto

La presencia de TPOAb está sólidamente establecida como factor de riesgo para la disfunción tiroidea cuando los pacientes están en tratamiento con litio, amiodarona, interleuquina 2 o interferón alfa (75, 259, 260, 261, 270). Durante el tratamiento con interferón alfa, una enfermedad tiroidea autoinmune preexistente o TPOAb detectables, son factores predisponentes para el desarrollo de enfermedad tiroidea (262). No obstante, parece no haber aumento en la frecuencia de disfunción tiroidea en el tratamiento con interferón beta (271). La presencia de TPOAb previa al tratamiento presenta una sensibilidad del 20%, una especificidad del 95% y un valor predictivo positivo del 66,6% para el desarrollo de disfunción tiroidea (272).

6. Determinaciones de Anticuerpos Anti Tiroglobulina (TgAb)

La tiroglobulina (Tg), globulina protiroidea, es una glucoproteína soluble de alto peso molecular (660 kDA) constituida por dos subunidades idénticas. Está presente con un alto grado de heterogeneidad debido a diferencias en las modificaciones post-traslacionales (glucosilación, yodinación, sulfatación, etc.). Durante el proceso de síntesis y liberación de la hormona tiroidea, se produce polimerización y degradación de la Tg. En consecuencia, la estructura inmunológica de la Tg es extremadamente compleja. Las características de las preparaciones de Tg pueden variar ampliamente en función del tejido tiroideo humano inicial y del proceso de purificación utilizado. Esta es la primera clave para explicar el motivo por el cual los ensayos de TgAb, al igual que los de Tg [Sección-3 E2] sean tan difíciles de estandarizar.

(a) Metodología para TgAb

Al igual que con los métodos de TPOAb, el diseño de los ensayos de TgAb ha evolucionado desde los ensayos por inmunofluorescencia de secciones de tejido tiroideo, a los métodos de aglutinación pasiva de eritrocitos tanados, y en la actualidad a los inmunoensayos competitivos y no competitivos. Esta evolución técnica ha mejorado tanto la sensibilidad como la especificidad de las determinaciones de TgAb. No obstante, debido a que los métodos más antiguos y los más nuevos todavía se utilizan simultáneamente en los laboratorios clínicos, la sensibilidad y especificidad de los métodos disponibles puede variar considerablemente en función del laboratorio en donde se realicen. Los ensayos están calibrados contra preparaciones purificadas o crudas de TgAb que se obtienen de una mezcla de sueros de pacientes o de preparaciones de inmunoglobulinas de donantes de sangre. Esta diversidad de estándares secundarios a menudo, pero no siempre, se calibra contra el estándar primario (MRC 65/93). Sin embargo, la estandarización con MRC 65/93 no garantiza que los diferentes métodos guarden similitud cuantitativa ni cualitativa. Otras razones para las diferencias entre los métodos pueden estar relacionadas con la heterogeneidad de los TgAb en sí mismos. Esta heterogeneidad es restringida en pacientes con AITD comparada con otras enfermedades tiroideas como el carcinoma diferenciado (CDT) en que aparece como menos restringida (273). Este hecho refleja diferencias en la expresión de los diferentes autoanticuerpos que normalmente pueden estar presentes en niveles muy bajos en individuos sanos (274). La variabilidad inter-método en los TgAb también puede reflejar diferencias cualitativas en la afinidad y en la especificidad de epitopes de estos anticuerpos en suero de pacientes con diferentes patologías tiroideas e inmunológicas subyacentes. Otra razón para las diferencias inter-métodos es que algunos diseños de ensayos son susceptibles a interferencias por altos niveles de antígeno circulante (Tg), como ocurre generalmente en la enfermedad de Graves y en el CDT metastásico. (275).

Recomendación N° 35. Para los Fabricantes que desarrollan Métodos para TgAb

- La especificidad de epitopes de los métodos para TgAb debería ser amplia y no restringida, ya que puede ser más amplia para los pacientes con TgAb positivos con CDT en comparación con los pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune.

(b) Prevalencia e Intervalos de Referencia de los TgAb

Al igual que con los anticuerpos anti TPO, la prevalencia y los valores de corte para la normalidad de los anticuerpos anti tiroglobulina depende de la sensibilidad y especificidad del método de ensayo (276). El estudio NHANES III mostró una prevalencia de TgAb del ~10% para la población en general, determinada con un inmunoensayo competitivo (18). La prevalencia de los TgAb en pacientes con CDT parece ser dos veces mayor que para la población normal (~20 versus 10%, respectivamente) (276). Al igual que con los TPOAb, aún no se ha esclarecido la importancia clínica de los niveles bajos de TgAb, que no serían detectables mediante los antiguos métodos de aglutinación. Se ha sugerido que los niveles bajos pueden representar anticuerpos “naturales” en individuos normales o una respuesta de anticuerpos “rescatadores” frente a la liberación de antígeno posterior a una cirugía tiroidea o al tratamiento con yodo radioactivo. Otra alternativa, es que los niveles bajos representen AITD silenciosa subyacente (256). Diferentes métodos de TgAb informan diferentes líneas de corte de positividad, igual que para TPOAb [Sección 3D5(a)].

Específicamente, algunos métodos informan que individuos normales deberían tener valores por debajo del límite de detección del ensayo, mientras que otros informan un “rango normal”. Cuando se usan las determinaciones de TgAb junto con la Tg sérica, la importancia de los valores bajos de TgAb se relaciona menos con la fisiopatología que con el potencial de interferir con el método de Tg sérica.

Recomendación N° 36. Determinación de TgAb en patologías no-neoplásicas

- En áreas suficientes en yodo, en general no es necesario ni costo-efectivo solicitar ambas determinaciones, TPOAb y TgAb, porque los pacientes con TPOAb negativos y TgAb detectables rara vez presentan disfunción tiroidea.
- En las áreas con deficiencia de yodo, las determinaciones de TgAb séricos pueden ser útiles para la detección de enfermedad tiroidea autoinmune cuando los pacientes tienen bocio nodular.
- Para control del tratamiento con yodo en casos de bocio endémico.

(c) Sensibilidad y Precisión de las Determinaciones de TgAb

Las determinaciones cuantitativas de TgAb por un método sensible constituyen un ensayo complementario esencial para la determinación de Tg sérica. Los métodos cualitativos de aglutinación no son lo suficientemente sensibles para detectar concentraciones bajas de TgAb que pueden interferir con las mediciones de Tg sérica (276). Al igual que con los ensayos de TPOAb [Sección-3 D5(a)], la amplia variabilidad en los valores absolutos informados por los diferentes inmunoensayos de TgAb excluye el uso de ensayos realizados con equipos de diferentes fabricantes para el control seriado de pacientes con CDT. Existen dos clases de inmunoensayos para la determinación de TgAb. Una clase se caracteriza por sus bajos límites de detección (<10 kUI/L) y un valor normal de referencia no detectable. Estos métodos sugieren que la presencia de TgAb es un hallazgo patológico. La otra clase de ensayos reporta límites de detección más elevados (>10kUI/L) y citan un “rango normal de referencia” para los TgAb. Estos valores detectables del “rango normal” probablemente representen “ruido” no específico del ensayo provocado por la insensibilidad del mismo o por problemas de especificidad ya que estos valores bajos del “rango normal” no muestran evidencia de interferencia con las determinaciones de Tg sérica [Sección-3 E6].

Recomendación N° 37. Determinación de TgAb en el Carcinoma diferenciado de tiroides (CDT)

La concentración de TgAb debería determinarse en los sueros de TODOS los pacientes antes del análisis de Tg ya que los niveles bajos de TgAb pueden interferir con las determinaciones de Tg sérica produciendo valores ya sea falsamente bajos o no detectables, o falsamente elevados según el método utilizado.

- Los TgAb se deberían medir en cada muestra sérica enviada al laboratorio para evaluación de Tg.
- Las determinaciones seriadas de TgAb se deberían realizar en todos los pacientes con resultados positivos de TgAb con CDT utilizando un método del mismo fabricante, porque los valores seriados de TgAb tienen significado pronóstico para el control de la respuesta al tratamiento del CDT.
- Se deberían utilizar inmunoensayos y no métodos de aglutinación para determinar TgAb ya que los niveles bajos de TgAb no detectados por aglutinación pueden interferir con las determinaciones de Tg realizadas por la mayoría de los métodos, y las determinaciones seriadas deben ser cuantitativas y no cualitativas.
- Los ensayos de recuperación de Tg sérica no detectan en forma confiable la presencia de TgAb y no se debería recomendar su uso. (Recomendación N° 46).
- Antes de cambiar el método de determinación de TgAb, el laboratorio debería informar al médico solicitante, y los pacientes deberían volver a tener establecidos sus niveles basales con el método nuevo. Valores absolutos obtenidos con diferentes métodos no pueden ser usados para el control seriado de pacientes con CDT y TgAb positivos.

(d) Usos Clínicos de las Determinaciones de TgAb

Todavía se debate sobre la utilidad clínica de las determinaciones de TgAb para evaluar la presencia de autoinmunidad tiroidea. El estudio NHANES III en EE.UU. informó que el 3 % de los individuos sin factores

de riesgo de enfermedad tiroidea tenían TgAb detectables sin presencia asociada de TPOAb (18). Debido a que esta cohorte no presentaba un aumento asociado de TSH, las determinaciones de TgAb no parecieran ser ensayos diagnósticos útiles para AITD en áreas suficientes en yodo (256, 279). En áreas con deficiencia de yodo, sin embargo, se cree que la determinación de TgAb es útil para detectar AITD, en especial para pacientes con bocio nodular. Las determinaciones de TgAb también son útiles para el control del tratamiento con yodo para el bocio endémico, ya que las moléculas yodadas de Tg son más inmunogénicas.

Los ensayos de TgAb se solicitan fundamentalmente junto con las determinaciones de Tg sérica. La utilidad clínica de los TgAb en los pacientes con CDT es doble. En primer lugar, la búsqueda de TgAb, por métodos sensibles y específicos en estos pacientes con cáncer es necesaria porque incluso bajas concentraciones de anticuerpos pueden interferir con las mediciones de Tg realizadas por la mayoría de los métodos [ver Sección-3 E6] (275, 276). En segundo lugar, las determinaciones de TgAb en sí pueden servir como marcadores tumorales sustitutos para los pacientes TgAb positivos en los que no se pueda confiar en la determinación de Tg (276). Específicamente, los pacientes TgAb positivos considerados libres de enfermedad típicamente se convierten en TgAb negativos entre 1 y 4 años (276, 277, 278). Por el contrario, los pacientes con enfermedad persistente después del tratamiento mantienen concentraciones detectables de TgAb. De hecho, un aumento en la concentración de TgAb es a menudo el primer indicio de recidiva en esos pacientes (276).

7. Autoanticuerpos anti-Receptor de TSH (TRAb)

El receptor de TSH integra la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana unidos a las proteínas G. El gen del receptor de TSH (peso molecular 60kb) ubicado en el brazo largo del cromosoma 14q31 ha sido clonado y secuenciado (272). Los exones 1 a 9 codifican para el dominio extracelular del receptor (397 aminoácidos) y el exón 10 codifica para la región transmembrana (206 aminoácidos). La activación de las proteínas G por el complejo hormona receptor resulta en la estimulación de la producción de AMPc por la adenilato ciclasa y en el recambio de fosfato de inositol por las fosfolipasas (280). La mutagénesis sitio-dirigida ha demostrado que la estructura tridimensional del receptor es importante para la interacción con la TSH y/o los TRAb. Existen tres tipos generales de TRAb determinados por bioensayos o ensayos de radioreceptor (Tabla 6). Los ensayos de radioreceptor, o ensayos de Inmunoglobulinas inhibidoras de la unión de TSH (TBII) no miden actividad biológica directamente sino que determinan si la muestra contiene inmunoglobulinas que puedan bloquear la unión de TSH a una preparación *in vitro* del receptor. Los anticuerpos estimulantes de TSH (TSAb) parecen fijarse a la porción N terminal del dominio extracelular y mimetizar las acciones de TSH induciendo la transducción de la señal post receptor y la estimulación celular. En contraste, la región C terminal es más importante para los anticuerpos bloqueantes del receptor de TSH (TBAb o TSBAb) que impiden la estimulación por TSAb o TSH, provocando hipotiroidismo (281). Con respecto a esto, las inmunoglobulinas estimulantes del crecimiento tiroideo (TGI), están menos caracterizadas.

Se ha demostrado que la falta de correlación entre las concentraciones de TRAb y el estado clínico de los pacientes se debe principalmente a la heterogeneidad de los TRAb circulantes. El hecho de que esta heterogeneidad pueda coexistir dentro de un mismo paciente y cambiar con el tiempo, es una de las razones por las que ha sido difícil desarrollar métodos diagnósticos eficientes para los TRAb (282, 283). De hecho, el cuadro clínico de los pacientes con enfermedad de Graves que presentan tanto TSAb como TBAb/TSBAb depende de la concentración relativa y de la afinidad del anticuerpo predominante. El pasaje de TRAb estimulantes a TRAb bloqueantes podría explicar la remisión espontánea de la enfermedad de Graves durante el embarazo al igual que la inducción de hipotiroidismo transitorio por yodo radiactivo (281, 284). Es importante observar que los bioensayos que utilizan preparaciones celulares para medir los efectos biológicos de los TRAb (estimulación o inhibición de la actividad de TSH o del crecimiento celular) pueden detectar cambios funcionales en la heterogeneidad de los TRAb. Por el contrario, el ensayo de radioreceptor, o de inmunoglobulinas inhibidoras de la unión de TSH (TBII), utilizados por la mayoría de los laboratorios clínicos, simplemente miden la capacidad del suero o de una preparación de IgG de bloquear la unión de TSH al receptor, y no miden la respuesta biológica (Tabla 6). Esta diferencia fundamental en el diseño del ensayo explica por qué los bioensayos y los ensayos de radioreceptor normalmente presentan una correlación débil ($r = 0,31-0,65$) (283, 285).

(a) Metodología para TRAb

En 1956 se publicó el primer trabajo referente a la existencia de un estimulador tiroideo diferente de la TSH cuya vida media era más larga (Estimulante tiroideo de acción prolongada o LATS), utilizando un bioensayo in vivo (286). El LATS se identificó más tarde como una inmunoglobulina. Al igual que la TSH, los TRAb estimulan tanto el AMPc como las vías del fosfato de inositol de la célula folicular tiroidea y, en consecuencia, estimulan y bloquean la síntesis de la hormona tiroidea y el crecimiento de la glándula (283). Los tipos de métodos desarrollados para determinar TRAb se clasifican en relación con su actividad funcional, según se muestra en la Tabla 6. Los estudios en ratones y líneas celulares FRTL-5 al igual que en humanos, muestran que una elevada concentración de gonadotropina coriónica humana (hCG) también es un agonista débil de los TRAb y puede estimular el cAMP, el transporte de yodo y el crecimiento celular (56). Las elevaciones marcadas de hCG secundarias a coriocarcinoma pueden en casos raros causar un falso resultado positivo de TRAb Sin embargo, el aumento de la hCG habitualmente observado en el embarazo normal o en pacientes con mola hidatiforme tratados no es lo suficientemente alto como para provocar un falso resultado positivo.

(b) Bioensayos (TSAb, TBAb/TSBAb y TGI)

La mayoría de los ensayos actuales se basan en la activación por el receptor de TSH de la producción del segundo mensajero (AMPc) a partir de una línea celular (FRTL-5/ CHO TSH-R) expuesta a una muestra de suero que contiene los anticuerpos o a una preparación de IgG (287-289). El reciente clonado del receptor de TSH ha beneficiado los bioensayos facilitando el desarrollo de líneas celulares transfectadas del receptor de TSH (290, 291). Aunque estos bioensayos están disponibles en muchos laboratorios comerciales en los Estados Unidos y Asia, están menos disponibles en Europa por las regulaciones que afectan el uso de organismos genéticamente alterados, y no lo están aún en Latinoamérica. Lamentablemente, la correlación entre los resultados de los TRAb y el cuadro clínico es aún deficiente. Por ejemplo, la sensibilidad diagnóstica de los bioensayos para TRAbs en la enfermedad de Graves presenta un rango entre 62,5 y 81% (283). Es posible que los nuevos métodos que emplean moléculas quiméricas puedan detectar los *locus* de los epitopes de los TRAb y los sitios de unión de la TSH, y en consecuencia mejorar la correlación entre la respuesta del ensayo y el resultado clínico (281, 284, 292-294).

Tabla 6. Métodos para Anticuerpos del Receptor de TSH (TRAb)

<i>Anticuerpo</i>	<i>Función</i>	<i>Método directo</i>
TSAb	Estimula la producción de AMPc, la captación de yoduro, y la síntesis de tiroglobulina	bioensayo celular (FRTL-5/ CHO TSH-R) % de estimulación de síntesis de AMPc inducida por TSH comparada con una mezcla de suero normal
TBAb/TSBAb	Inhibe la producción de AMPc inducida por TSH, la captación de yoduro y la síntesis de la tiroglobulina	bioensayo celular (igual que anterior) % de inhibición de síntesis de AMPc inducida por TSH comparada con una mezcla de suero normal
TGI	Estimula el crecimiento de la célula tiroidea	células FRTL-5, captación de timidina H3/ ensayo de detención mitótica
TBII	Inhibe la unión de I ¹²⁵ TSH al receptor	Ensayo de radioreceptor con TSH-R soluble porcino o TSH-R recombinante humano

TSAb: anticuerpos estimulantes del receptor de TSH
TBAb/TSBAb: anticuerpos bloqueantes del receptor de TSH
TGI: Inmunoglobulinas estimulantes del crecimiento tiroideo
TSH-R: receptor de TSH
TBII: Inmunoglobulinas inhibidoras de tirotrófina

(c) Ensayos de Radioreceptor (TBII)

Los ensayos de inmunoglobulinas inhibidoras de la unión de TSH al receptor (TBII) se encuentran comercialmente disponibles y se los utiliza en muchos laboratorios. Estos métodos cuantifican la inhibición de la unión de TSH marcada con ^{125}I a receptores porcinos solubilizados o, más recientemente, a receptores de TSH humana recombinante (295-297). Este tipo de método no distingue entre TRAb estimulantes y bloqueantes. La actividad de TBII es cuantificada a partir de un suero TRAb positivo calibrado contra un estándar de referencia sérico. El calibrador más frecuentemente utilizado ha sido el suero de referencia MRC, LATS-B. También se dispone del estándar de la OMS (MRC 90/672). La heterogeneidad de los TRAb en el suero de pacientes y el origen del receptor utilizado (porcino versus humano recombinante) son causas probables de la amplia variabilidad observada entre los métodos de TBII, a pesar del uso del mismo estándar (283, 298). Aunque en la actualidad los métodos TBII basados en el receptor de la TSH humana recombinante pueden tener una mayor sensibilidad diagnóstica para la enfermedad de Graves, no parecen ofrecer mayor especificidad ni sensibilidad para predecir la respuesta al tratamiento con medicamentos antitiroideos (297, 299).

Recomendación N° 38. Ensayos para anticuerpos Antireceptor de TSH (TRAb)

Ensayos de TRAbs en el laboratorio clínico:

- Ensayos de Radioreceptor o de Inhibición de la unión de TSH (TBII) que no miden actividad estimulante directamente sino que detectan inmunoglobulinas en el suero que bloquean la unión de TSH marcada a una preparación *in vitro* del receptor de TSH. Estos ensayos son los que se utilizan con mayor frecuencia para determinar TRAb en los laboratorios clínicos.
- Bioensayos del receptor de TSH (TSAb) que utilizan células (células FRTL-5, o más recientemente CHO transfectadas con el receptor de TSH humana) para la detección de inmunoglobulinas estimulantes de tiroides (TSAb) que estimulan la producción de cAMP o la captación de yodo. Estos ensayos no están disponibles de manera rutinaria en todos los países.
- En general, la correlación entre los resultados de los TSAb y los TBII (60-75%) es pobre. Los ensayos TSAb declaran dar resultados positivos entre el 80 y el 100% de los pacientes hipertiroideos por Graves no tratados, mientras los ensayos TBII lo son entre el 70 y el 90%. Ninguno de los dos ensayos tiene una alta especificidad ni sensibilidad para predecir remisión.
- Se sabe que tanto la producción normal de hCG, como la producción anormal en el coriocarcinoma interactúan con el receptor de TSH lo que podría resultar en falsos valores positivos. Esto se podría observar en casos poco frecuentes de coriocarcinoma pero no en embarazos normales o en la mola hidatiforme tratada, en la que el nivel de hCG no es lo suficientemente alto para causar un falso resultado positivo.

(d) Intervalos de Referencia de los TRAb

A pesar de la adopción de una nueva preparación internacional de referencia MRC 90/672, los valores de TRAb todavía dependen del método, y los intervalos de referencia dependen de la población “normal” seleccionada para determinar el nivel de corte para un resultado positivo. Este corte se define en general como dos desviaciones estándar por encima de la media de los individuos normales.

8. Usos Clínicos de las Determinaciones de TRAb

El uso clínico de las determinaciones de TRAb para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tiroidea autoinmune sigue siendo controvertido y difiere mucho de un país a otro. El diagnóstico diferencial de hipertiroidismo se puede resolver en la mayoría de los pacientes sin recurrir a los TRAb. De todos modos, la presencia de TRAb puede establecer una diferencia entre la enfermedad de Graves y la tirotoxicosis ficticia y otras manifestaciones de hipertiroidismo como la tiroiditis subaguda o post parto y el bocio nodular tóxico.

También se ha sugerido que las determinaciones de TRAb son útiles para predecir la evolución de la enfermedad de Graves. A menudo se observa una disminución en el nivel de TRAb en pacientes

hipertiroides en remisión clínica luego del tratamiento con fármacos antitiroideos (ATD). Después de la suspensión de los mismos el aumento de TRAb correlaciona bastante bien con la recidiva rápida, pero esta situación involucra a muy pocos pacientes. Por el contrario, un número significativo de pacientes con niveles no detectables o bajos de TRAb va a recidivar. Un metanálisis de la relación entre los niveles de TRAb y el riesgo de recidiva ha demostrado que un 25% de pacientes son mal categorizados a partir de los ensayos de TRAb (263). Esto sugiere que después del tratamiento con ATD, se necesita un seguimiento de los pacientes independientemente del valor de los TRAb al momento de la suspensión del fármaco, y para este propósito la determinación de TRAb no resulta costo-efectiva. (263).

Hay acuerdo general en que las determinaciones de TRAb pueden ser usadas para predecir disfunción fetal y/o neonatal en embarazadas con antecedentes de AITD (8, 252). Valores altos de TRAb en la madre durante el tercer trimestre de embarazo sugieren riesgo de disfunción tiroidea en el bebé (8, 282). Entre el 2 y el 10% de embarazadas con TRAb muy elevados dan a luz recién nacidos con hipertiroidismo (8). El riesgo de hipertiroidismo neonatal es insignificante luego del tratamiento satisfactorio con antitiroideos, pero puede desarrollarse después del tratamiento con radioyodo si los niveles de TRAb permanecen elevados (8). Las embarazadas eutiroides (con o sin tratamiento con L-T4) que han recibido tratamiento previo con yodo radioactivo para la enfermedad de Graves deberían realizarse determinaciones de TRAb a comienzos del embarazo, cuando un valor alto es un factor de riesgo significativo para el hipertiroidismo fetal, y también durante el tercer trimestre para evaluar el riesgo de hipertiroidismo neonatal (8). Las embarazadas que reciben ATD para la enfermedad de Graves, deberían realizarse determinación de TRAb en el tercer trimestre. Valores altos TRAb en estas pacientes deberían instar a una evaluación clínica y bioquímica exhaustiva de hipertiroidismo en el neonato, al momento del nacimiento (sangre del cordón) y entre los 4 y 7 días, después que los efectos del pasaje transplacentario de los ATD hayan desaparecido (300). Cabe destacar que los ensayos de radioreceptor TBII frecuentemente se usan con este propósito, ya que detectan tanto anticuerpos estimulantes (TSAb), como en casos poco frecuentes, anticuerpos bloqueantes (TBAb/TSBAb) que provocan hipotiroidismo transitorio en 1:180.000 recién nacidos (301). También se sugiere realizar la determinación de ambos anticuerpos estimulantes y bloqueantes porque la expresión de disfunción tiroidea puede ser diferente en la madre y en el infante (253).

Recomendación 39. Usos clínicos de las determinaciones de TRAb

- Para investigar la etiología del hipertiroidismo cuando el diagnóstico no es clínicamente evidente.
- La disminución en la concentración de TRAb durante el tratamiento con drogas antitiroideas a largo plazo sugiere remisión. No obstante, las determinaciones de TRAb pueden dar resultados confusos en el 25% de estos pacientes.
- Las determinaciones de TRAb son útiles para diagnosticar enfermedad de Graves y para relacionar los valores de TRAb con un algoritmo de tratamiento.
- Para evaluar pacientes con sospecha de “oftalmopatía eutiroides de Graves”. No obstante, no se debe descartar la patología en caso de TRAb no detectables.
- Aunque los ensayos de TSAb presentan ventajas teóricas, algunos sostienen que los TBII que detectan tanto anticuerpos estimulantes (TSAb) como los casos poco frecuentes de anticuerpos bloqueantes (TBAb/TSBAb), son igualmente útiles.
- Para mujeres embarazadas con antecedentes o enfermedad de Graves actual. Nota: Las embarazadas eutiroides después de la administración de drogas antitiroideas (ATD) para la enfermedad de Graves tienen un riesgo insignificante de hipertiroidismo fetal o neonatal.
- Los TRAb en las embarazadas eutiroides (con o sin tratamiento con L-T4) que han recibido tratamiento previo con yodo radioactivo para la enfermedad de Graves se deberían determinar a comienzos del embarazo, cuando un aumento en el valor es un factor de riesgo para el hipertiroidismo fetal (2-10%) y durante el tercer trimestre para evaluar riesgo de hipertiroidismo neonatal.
- Se debería realizar una determinación de TRAb en el tercer trimestre a las embarazadas que son tratadas con ATD por enfermedad de Graves para mantener el estado eutiroides durante el embarazo. Un valor alto de TBII debería instar a una evaluación clínica y bioquímica de hipertiroidismo en el neonato, tanto al nacimiento (sangre del cordón) como entre los 4 y 7 días, después de que los efectos del pasaje transplacentario de los ATD hayan desaparecido.

- La evaluación del riesgo de disfunción tiroidea fetal o neonatal requiere la detección de TRAb bloqueantes o estimulantes cuando las madres no tienen la tiroides intacta luego de un tratamiento previo para el hipertiroidismo de Graves.
- Para identificar neonatos con hipotiroidismo transitorio debido a anticuerpos bloqueantes del receptor de TSH.

Recomendación N° 40. Mejoras necesarias en los ensayos de anticuerpos antitiroideos

- Los ensayos de anticuerpos antitiroideos actuales deberían someterse a estudios comparativos de sus comportamientos analíticos y clínicos.
- Un estudio comparativo de las preparaciones antigénicas que se usan en la actualidad, facilitaría la identificación de el o los métodos para anticuerpos antitiroideos más convenientes para su utilización clínica.
- Se deberían establecer las características de las preparaciones antigénicas utilizadas en el ensayo para todos los métodos de autoanticuerpos tiroideos.
- Debería poder disponerse de las preparaciones de referencia de antígenos.

Todavía se desconoce el papel de los TRAb en la oftalmopatía asociada a tiroides (TAO) (302). Esta patología parece ser exacerbada por el tratamiento con yodo radioactivo (303). Además, los niveles de TRAb y de otros anticuerpos antitiroideos aumentan significativamente después de este tipo de tratamiento (304-306). Esto sugiere que las determinaciones de TRAb previas al tratamiento con radioyodo podrían ser útiles para predecir el riesgo de TAO aunque aún ningún estudio prospectivo ha documentado esta observación.

9. Tendencias Futuras

Es importante realizar un estudio comparativo bien estructurado de los ensayos de autoanticuerpos tiroideos comercialmente disponibles. Esto aportaría evidencia irrefutable de que existen diferencias en el desempeño de los métodos de ensayos actuales (296). Además ayudaría a persuadir a los profesionales de los laboratorios clínicos de que eviten el uso de ensayos con deficiencias en el comportamiento clínico, e instaría a los fabricantes a mejorar sus productos o a retirarlos del mercado.

Recomendación N° 41. Para los Fabricantes que desarrollan ensayos de anticuerpos antitiroideos

- Los métodos absolutos o “estándares de referencia” son un objetivo para el futuro.
- El folleto dentro de la caja del equipo de reactivos debería documentar el método utilizado para obtener el antígeno, el diseño del ensayo, y todas las condiciones experimentales que afecten las interacciones antígeno-anticuerpo.
- La especificidad de los estándares secundarios debería seleccionarse de acuerdo a las interacciones entre los autoanticuerpos en el suero del paciente y su antígeno específico.
- Se debería controlar los efectos “gancho” de los TPOAb y de los TgAb IMA utilizando ~20 muestras con concentraciones de anticuerpos >1.000 kUI/L y ~20 muestras con valores superiores a 10.000 kUI/L.
- Se deberían controlar los efectos de altas concentraciones de antígeno (Tg) en los métodos de TgAb agregando a varios sueros con concentraciones bajas de TgAb, otros con niveles de Tg >10,000 µg/L (ng/ml) y >100,000 µg/L (ng/ml).

E. Tiroglobulina (Tg)

La tiroglobulina (Tg), proteína precursora de la síntesis de las hormonas tiroideas se puede detectar en el suero de la mayoría de los individuos normales si se utiliza un método sensible. El nivel de Tg sérica está influido por tres factores principales: (i) la masa de tejido tiroideo diferenciado presente; (ii) cualquier inflamación o lesión de la glándula tiroidea que provoque liberación de Tg; y (iii) el grado de estimulación del receptor de TSH (por TSH, hCG o TRAb). Una concentración elevada de Tg sérica es un indicador no específico de disfunción tiroidea. La mayoría de los pacientes con Tg sérica elevada presentan alteraciones tiroideas benignas. La Tg sérica se utiliza como marcador tumoral en los pacientes con diagnóstico de cáncer diferenciado de tiroides (CDT). Aproximadamente dos tercios de estos pacientes presentan un nivel pre-quirúrgico elevado de Tg sérica que confirma la capacidad del tumor de secretar Tg y valida su uso como marcador tumoral post-quirúrgico (307). Por el contrario, cuando la concentración pre-quirúrgica de Tg sérica no supera los valores normales, no existe evidencia de que el tumor secrete Tg, y un valor post-quirúrgico indetectable es menos tranquilizador. En esos pacientes una concentración post-quirúrgica detectable de Tg sérica podría reflejar la presencia de una importante masa tumoral. De hecho, en general, los cambios post-quirúrgicos representan cambios en la masa tumoral, siempre que se mantenga un nivel constante de TSH mediante terapia con L-T4.

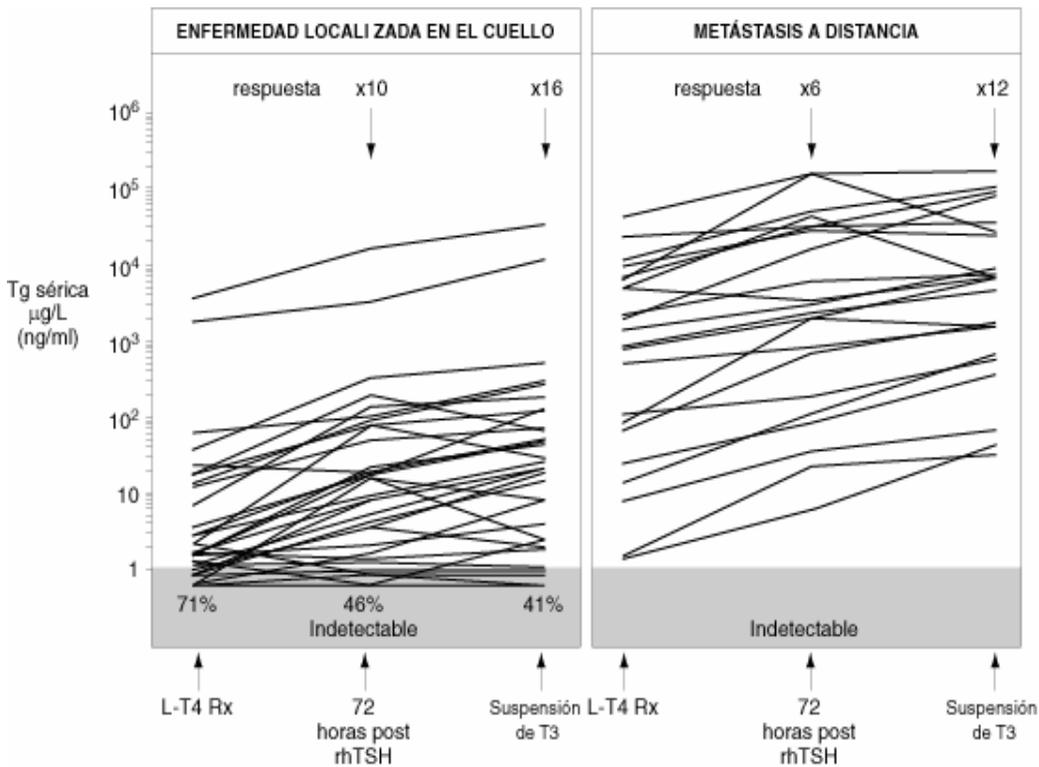


Fig 6. Respuestas de Tg sérica a la administración de rhTSH o a la suspensión de T3. Datos de la ref. 308.

La Tg sérica medida durante el estímulo de TSH (TSH endógena o TSH recombinante humana, rhTSH), es más sensible para la detección del CDT residual o metastásico que una determinación de Tg basal realizada durante el tratamiento con L-T4 (Figura 6) (308). La magnitud del aumento de la Tg sérica en respuesta a la TSH es un indicador de la sensibilidad del tumor a la TSH. Los tumores bien diferenciados típicamente muestran una respuesta estimulada a TSH elevada equivalente a ~10 veces el valor basal de Tg (309). Los tumores escasamente diferenciados que no concentran yoduro pueden presentar una respuesta disminuida al estímulo con TSH (310).

1. Estado Actual de los Métodos de Determinación de Tg

Generalmente, la tiroglobulina se mide en suero, pero también es posible realizar las determinaciones en líquido de quistes tiroideos y/o en material obtenido por punción con aguja fina de masas cervicales no tiroideas (311). La determinación de Tg sérica es técnicamente difícil. En la actualidad, los ensayos inmunométricos (IMA), están superando en popularidad a los métodos por radioinmunoensayo (RIA). La tendencia se debe a que los métodos IMA ofrecen la ventaja práctica de un menor tiempo de incubación, un rango dinámico más amplio y una mayor estabilidad del anticuerpo marcado, y en consecuencia una menor susceptibilidad al daño por marcación que los RIA (312). Hoy los laboratorios pueden escoger entre una serie de métodos IMA tanto isotópicos (inmunoradiométricos, IRMA) como no isotópicos (fundamentalmente quimioluminiscencia, ICMA). No obstante, los métodos IMA suelen ser más susceptibles a interferencias por autoanticuerpos antitiroglobulina (TgAb), que provocan una subestimación de los niveles de Tg sérica. En consecuencia, algunos laboratorios han escogido los métodos RIA para determinarla en pacientes TgAb positivos y restringir el uso de los métodos IMA a los pacientes TgAb negativos. Sin embargo, ningún método puede alegar estar totalmente libre de la interferencia por TgAb, la cual puede provocar resultados inapropiados de Tg. Además de los problemas con la interferencia de TgAb, los actuales métodos IMA tienen diferencias en la estandarización y en la especificidad, deficiencias en la sensibilidad, precisión interensayo por debajo del nivel óptimo, y potencial predisposición a sufrir efecto “hook” (gancho) a concentraciones elevadas (312).

(a) Estandarización

Las concentraciones de Tg sérica determinadas por métodos RIA o IMA presentan marcadas diferencias (312, 313). Un reciente esfuerzo en colaboración patrocinado por la Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities ha desarrollado una nueva Preparación de Referencia Internacional para Tg, CRM-457 (298,314). Este material se puede solicitar al Dr. Christos Profilis, BCR, Rue de la Loi 200, B 1049 Bruselas, Bélgica.

Recomendación N° 42. Para los fabricantes que desarrollan métodos para la determinación de Tg

- Sería ideal que el diluyente utilizado para los estándares fuese suero humano libre de Tg y TgAb. Se deberían seleccionar matrices no séricas para producir una señal (cuentas radioactivas, unidades relativas de luz, etc.) que sean idénticas al suero humano libre de Tg y TgAb para evitar desvíos (bias) relacionados con las matrices.

El desvío entre los diferentes métodos de determinación de Tg puede provenir de las diferencias entre las matrices libres de Tg utilizadas para la dilución de los estándares y el suero de pacientes, o diferencias en el reconocimiento de los epitopes por parte de los distintos anticuerpos de Tg usados por los diversos fabricantes. Sería ideal que el diluyente utilizado para los estándares fuese suero humano libre de Tg y TgAb o, como alternativa, una matriz no sérica que hubiera sido seleccionada para producir una señal (cuentas radiactivas, unidades relativas de luz, etc.) que fuese idéntica a la del suero humano libre de Tg y TgAb. Es fundamental que se informe a los médicos antes de que el laboratorio cambie su método para Tg para que puedan realizar una nueva determinación de valores basales en los pacientes con CDT.

La adopción generalizada del estándar CRM-457 se proyectó para reducir, aunque no eliminar la significativa variabilidad inter-método que existe entre los inmunoensayos de Tg de los distintos fabricantes. Se esperaba que la estandarización internacional facilitara un mayor acuerdo entre los diversos estudios publicados y mejorara el uso clínico del seguimiento seriado con Tg en los pacientes con CDT, que a veces tienen determinaciones realizadas en distintos laboratorios. Lamentablemente, el uso del estándar CRM-457 no ha eliminado los problemas de variabilidad entre métodos como se esperaba. En la actualidad, los niveles de Tg sérica determinados por métodos que utilizan la estandarización CRM-457 pueden presentar diferencias de más de cuatro veces en sus resultados (Figura 7). Estas diferencias inter-métodos son mayores que la máxima imprecisión aceptada durante el seguimiento de los pacientes individuales (Tabla 5) y excluye el intercambio de diferentes métodos de Tg para el seguimiento a largo plazo de los pacientes con cáncer de tiroides.

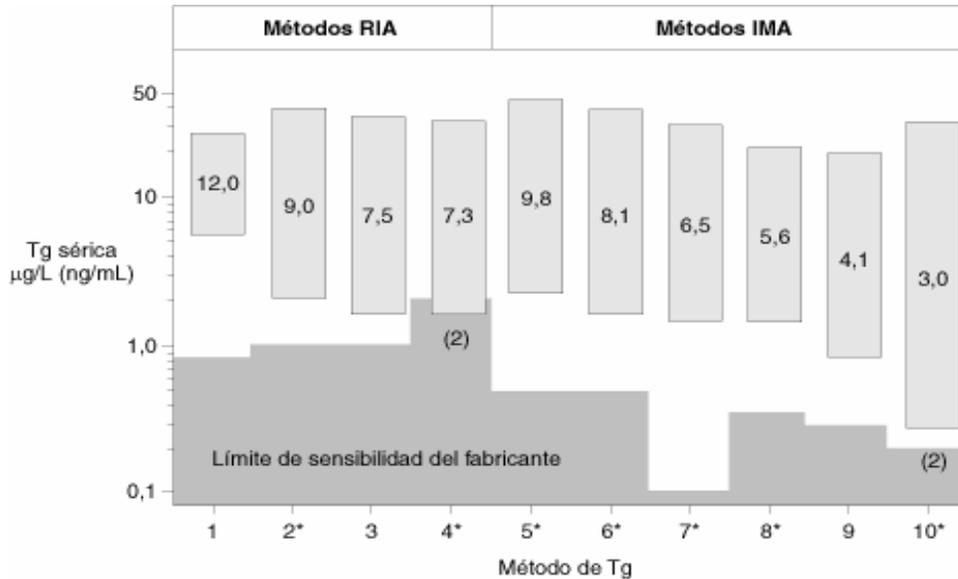


Fig 7. Valores de la media \pm 2 DS para la medición de 20 sueros normales TgAb-negativos mediante 10 métodos diferentes de Tg. Método N°1= Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, EE.UU.; Método N°2=University of Southern California RIA, Los Angeles, CA, EE.UU.; RIA N°3= Kronus RIA, Boise ID, EE.UU.; Método N°4= Endocrine Sciences RIA, Calabasas, CA, EE.UU.; Método N°5=Nichols Institute Diagnostics ICMA, San Juan Capistrano, CA, EE.UU.; Método N°6= Endocrine Sciences ICMA, Calabasas, CA, EE.UU.; Método N°7=Sanofi Pasteur IRMA, Marnes-La-Coquette, Francia; Método N°8=Kronus OptiQuant IRMA, Boise ID, EE.UU.; Método N°9=Brahms DynoTest TgS IRMA, Berlín, Alemania; Método N°10=Diagnostic Products Immulite ICMA, Los Angeles, CA, EE.UU.. El asterisco señala los ensayos que declaran estandarización CRM-457.

Recomendación N° 43. Para los laboratorios que consideran cambiar su método de determinación de Tg

Seleccionar un método para Tg en función de las características de su comportamiento analítico y no de su costo o conveniencia. Antes de cambiar el método para Tg el laboratorio debería consultar a los médicos que utilizan su método y comparar los resultados entre el método antiguo y el nuevo propuesto utilizando muestras de pacientes TgAb negativos y positivos.

- Pacientes TgAb negativos:* Si el desvío entre los resultados del método antiguo y el nuevo es $> 10\%$, se debería informar a los médicos y brindarles tiempo suficiente para volver a determinar los valores basales de los pacientes en estado crítico.
- Pacientes TgAb positivos:* El laboratorio debería advertir a los médicos acerca de la probable dirección de la interferencia en presencia de TgAb.
- Si se informan los valores de Tg sérica para las muestras TgAb positivas, se debería incluir una advertencia en cada informe de laboratorio:

PARA LOS MÉTODOS IMA:

Los métodos IMA pueden dar valores de Tg sérica inadecuadamente bajos o indetectables en presencia de TgAb. Los resultados indetectables de Tg sérica no se pueden utilizar como indicadores de ausencia de tumor en un paciente TgAb positivo. Un valor detectable de Tg indica presencia de Tg, pero las concentraciones pueden ser subestimadas.

PARA LOS MÉTODOS RIA:

Los métodos RIA (aunque menos susceptibles a la interferencia) también pueden dar resultados inapropiados de Tg sérica en presencia de TgAb (dependiendo del método).

(b) Sensibilidad

Algunos métodos de Tg carecen de sensibilidad para detectar el límite inferior de referencia eutiroideo que, dependiendo del ensayo, se sitúa aproximadamente en 1-3 µg/L (ng/mL). Los métodos que no están en condiciones de detectar Tg en todos los sueros normales son insensibles para la búsqueda de recidivas en los pacientes con CDT. Al igual que para TSH, la sensibilidad funcional del ensayo de Tg se determina con el 20% del CV inter-ensayo. El protocolo utilizado para determinar la sensibilidad funcional del ensayo de Tg es el mismo que se describió para TSH (Recomendación N° 20) con las tres cláusulas descriptas en la Recomendación N° 44.

(c) Precisión

La precisión intra- e inter-ensayo, expresada como porcentaje del coeficiente de variación (%CV) es un parámetro importante para la validación del comportamiento analítico de un ensayo de Tg. La precisión se debería determinar utilizando mezclas de sueros TgAb negativos con tres niveles diferentes de Tg (ver Recomendación N° 44).

La precisión intra-ensayo en los inmunoensayos es mejor que la inter-ensayo, como cabría de esperar. Esto se debe a que las mediciones realizadas dentro de una misma corrida no están sujetas a la variabilidad introducida por el uso de lotes diferentes de reactivos ni por distintas calibraciones de los instrumentos. La precisión intra-ensayo puede ser el parámetro más significativo cuando se evalúa la respuesta de Tg sérica al estímulo con rhTSH (308). En esta prueba, se extrae una muestra basal y una muestra estimulada con rhTSH con 3 a 5 días de intervalo entre sí, y generalmente se determina la Tg de ambas muestras en la misma corrida (Figura 6) (308, 309). En contraste, cuando se utiliza la determinación de Tg para el control seriado, cuanto más prolongado es el intervalo entre corridas mayor la variabilidad y peor la precisión inter-ensayo. Las matrices no humanas utilizadas para determinar la precisión en la zona baja pueden producir una sensibilidad funcional irreal en comparación con las mediciones realizadas con suero humano libre de TgAb como matriz. Es importante que se establezca la sensibilidad funcional y la precisión inter-ensayo con determinaciones distribuidas durante un período entre 6 y 12 meses, ya que éste es el intervalo clínico característico utilizado para el control de los pacientes con CDT.

La máxima imprecisión de las determinaciones de Tg sérica sugerida para el seguimiento de pacientes debe ser < 5% (Tabla 5). Es poco probable que los ensayos actuales de Tg puedan mantener una precisión tan estricta a lo largo del intervalo clínicamente relevante entre 6 y 12 meses típicamente utilizado para el control de los pacientes con CDT. Este problema con la precisión se puede superar repitiendo la determinación en muestras previas almacenadas del paciente en la misma corrida que la muestra actual (9).

Recomendación N° 44. Sensibilidad funcional y precisión inter ensayo para los ensayos de Tg

La sensibilidad funcional y la precisión inter-ensayo se deberían establecer utilizando el mismo protocolo que para TSH (Recomendación N°20) con tres consideraciones importantes:

- Utilización de mezclas de suero humano que no contengan TgAb, determinados por un inmunoensayo sensible.
- Se recomiendan valores óptimos para mezclas de valores bajos, medios y altos:
 - Mezcla de valor bajo (utilizada para determinar la sensibilidad funcional) debería tener un valor de Tg sérica que sea entre 30 y 50 % más elevado que el valor esperado de sensibilidad funcional (SF). [Si SF = 1,0 µg/L (ng/ml) el valor de la mezcla baja debiera ser 1,3 a 1,5 µg/L (ng/ml)]
 - Mezcla de valor medio = ~10 µg/L (ng/ml) es decir, cercano al rango medio normal.
 - Mezcla de valor alto = ~90% del límite superior que informa el fabricante.
- El período utilizado para evaluar la precisión inter-ensayo debiera ser por lo menos de 6 meses. Este lapso es más representativo del intervalo clínico utilizado para el control de los pacientes con CDT que el intervalo entre 6 y 8 semanas sugerido para TSH en la Recomendación N° 20.

(d) Efecto “hook” a valores elevados

Los métodos IMA se ven afectados por el efecto hook a valores elevados. Los valores falsamente bajos debido a este “efecto gancho” son particularmente problemáticos en los ensayos de marcadores tumorales como la Tg, en donde es frecuente encontrar valores muy elevados cuando los pacientes presentan metástasis avanzada (307, 310, 315). Se produce efecto hook cuando un exceso de antígeno satura la capacidad de unión del anticuerpo de captura. Esto provoca una señal inadecuadamente baja que se traduce en un resultado bajo o paradójicamente normal para un paciente con una concentración excesivamente elevada de Tg sérica (>1000 µg/L (ng/mL) (312). Los fabricantes de métodos IMA intentan solucionar el problema del efecto hook mediante uno de estos dos procedimientos:

- Diseños de ensayo de dos pasos. Se realiza una primera incubación de la muestra sérica con el anticuerpo de captura antes de que los constituyentes no ligados se eliminen por lavado y se introduzca el anticuerpo marcado, seguido de una segunda incubación.
- Se realizan dos determinaciones (generalmente sin diluir y con dilución 1/10) para cada muestra.

Existe sospecha de efecto “hook” cuando el tubo con la dilución presenta un resultado más alto que la muestra sin diluir. Se realizan más diluciones hasta que el resultado en el tubo con la dilución disminuya y las concentraciones de Tg séricas de dos diluciones consecutivas concuerden.

Recomendación N° 45. Detección de efecto “hook”

- Se recomienda un diseño de ensayo en dos pasos para minimizar los problemas hook. Los ensayos “en un paso” que son más propensos al efecto hook deberían medir cada muestra en dos concentraciones (sin diluir y 1:10) para ver si hay discrepancias entre ambos resultados.
- Se debería validar el efecto hook en todos los métodos (de dos pasos o de un paso) antes de su comercialización.
- Para verificar el efecto hook, efectuar diluciones 1/10 seriadas de ~ 20 muestras TgAb negativas con concentraciones de Tg sérica superiores a 10.000 µg/L (ng/ml) y ~ 20 muestras TgAb negativas con concentraciones de Tg sérica superiores a 100.000 µg/L (ng/ml) hasta que se demuestre linealidad.

(e) Interferencia por Autoanticuerpos Anti Tiroglobulina (TgAb)

Los autoanticuerpos anti tiroglobulina (TgAb) se detectan con mayor frecuencia en los pacientes con CDT que en la población general (~20 versus ~10 %, respectivamente) (276). Las determinaciones seriadas de los TgAb séricos pueden ser indicadores pronósticos independientes de la eficacia del tratamiento o de la recidiva del CDT en los pacientes TgAb positivos (276-278, 316). Cualquier TgAb presente en la muestra tiene el potencial de interferir con un método de Tg (317, 318). Debido a que los TgAb son heterogéneos, ni la medición de la concentración de estos anticuerpos ni un ensayo de recuperación con Tg exógena permiten predecir si los TgAb causarán interferencia (276, 317, 318). Probablemente el signo característico más confiable de la interferencia por TgAb sea la presencia de discordancia entre los RIA y los IMA. La Tg determinada por RIA se caracteriza por valores más elevados que la Tg determinada mediante IMA si la muestra contiene TgAb que provoquen interferencia (276, 309). En la actualidad se ha logrado consenso acerca de que los ensayos de recuperación de Tg no son un método confiable para la detección de TgAb y se los debería eliminar (276, 318). Los primeros estudios que informaron recuperaciones bajas en ausencia de TgAb en algunos sueros tenían el problema de la insensibilidad de los métodos iniciales para medir TgAb. Cuando se utilizan inmunoensayos cuantitativos con sensibilidad adecuada, los TgAb deberían detectarse siempre cuando la recuperación es baja.

Los métodos inmunométricos no competitivos (IMA) parecen ser más susceptibles a la interferencia producida por TgAb que los RIA, lo que se evidencia por el hallazgo de valores indetectables de Tg en individuos con enfermedad de Graves (319, 318). Aparentemente, en algunos casos los IMA no pueden cuantificar la Tg acomplejada con los TgAb y esta omisión puede provocar subestimación de la concentración de Tg total. Por el contrario los métodos RIA parecen capaces de cuantificar las fracciones de Tg de la muestra tanto libre como ligada a TgAb y característicamente producen valores más altos que los métodos IMA en presencia de TgAb (276, 309). Existe gran variabilidad en la sensibilidad y especificidad de los diferentes ensayos de TgAb [Sección-3 D6(b)]. Es esencial que la medición de TgAb sea realizada por el laboratorio que determinará la Tg porque ese laboratorio es responsable de seleccionar el método de TgAb más apropiado para detectar interferencia por TgAb en el método para Tg que utilice.

Cuando se determina Tg en suero que contiene TgAb con métodos RIA e IMA, con frecuencia se observa una discordancia RIA: IMA equivalente a [Tg RIA ≥ 2 $\mu\text{g/L}$ (ng/mL): Tg IMA = indetectable]. Esta discordancia parece caracterizar la interferencia por TgAb en una o ambas clases de métodos. Como el umbral actual para una respuesta de Tg positiva estimulada por rhTSH equivale a 2 $\mu\text{g/L}$ (ng/mL), el grado de discordancia tiene el potencial de influir en la toma de decisiones clínicas (308). Algunos profesionales creen que las mediciones con RIA producen resultados de Tg sérica con mayor validez clínica para los pacientes TgAb positivos que las mediciones con IMA, según se infiere por las correlaciones con el estado clínico y el paralelismo con determinaciones seriadas de TgAb (276, 320). No obstante, cabe destacar que ningún método RIA es inmune a la interferencia por TgAb en todos los sueros TgAb positivos y que la influencia de estos anticuerpos en los diferentes métodos RIA es bastante variable y se relaciona con los componentes del ensayo y las condiciones de incubación. Específicamente, la calidad del trazador I¹²⁵ de la Tg, junto con la especificidad del anticuerpo policlonal para Tg determinan la predisposición del método a la interferencia por TgAb (275, 321, 322).

Recomendación N° 46. Interferencia por TGAb y ensayos de recuperación

- Los ensayos de recuperación no son confiables para la detección de TgAb y se los debería eliminar. Estudios previos que informaron recuperaciones bajas en ausencia de TgAb estaban influenciados por la baja sensibilidad de los métodos iniciales para medir TgAb. Cuando se utilizan inmunoensayos ultrasensibles, siempre es posible detectar TgAb cuando la recuperación es baja.
- La discordancia entre las mediciones de Tg realizadas con IMA y RIA en una muestra TgAb positiva sugiere interferencia por TgAb (si los valores habitualmente concuerdan en las muestras TgAb negativas).
- Los laboratorios no deberían informar valores indetectables de Tg sérica por método IMA en pacientes TgAb positivos.

Aunque no existe garantía de que ningún método actual de Tg esté libre de interferencia por TgAb, la subestimación que se produce con la metodología IMA es la dirección de interferencia más grave, ya que este error tiene el potencial de enmascarar la enfermedad metastásica. En consecuencia, los laboratorios no deberían informar valores indetectables de Tg sérica para pacientes TgAb positivos.

Recomendación N° 47. Para los fabricantes y los laboratorios

El folleto con el procedimiento técnico incluido en la caja de reactivos para Tg debería informar sobre las características reales de comportamiento analítico del método (es decir, un comportamiento reproducible en una serie de laboratorios clínicos).

- Se deberían estandarizar los ensayos contra la preparación de referencia CRM-457. Los ensayos que no estén estandarizados contra el CRM-457 deberían proveer un factor de corrección.
- El valor medio de Tg y los límites de 2 DS del rango de referencia para los individuos normales eutiroideos TgAb negativos (establecidos utilizando la Recomendación N°48) se deberían citar en todas las publicaciones para permitir la comparación de los valores absolutos.
- Los ensayos que no pueden detectar Tg en todos los sueros normales presentan una sensibilidad subóptima para el control de los pacientes con CDT.

- Se debería verificar el desvío de la matriz utilizada para la dilución de los estándares (Recomendación N° 42).
- La sensibilidad funcional y la precisión intra- e inter-ensayo se deberían establecer utilizando los protocolos descritos en la Recomendación N° 44.
- La interferencia por TgAb se debería evaluar comprobando las discordancias RIA: IMA en los sueros TgAb positivos [en valores de TgAb de 100 a >1000 kUI/L (UI/ml)].
- Se deberían usar inmunoensayos de sensibilidad adecuada de TgAb, y no ensayos de recuperación con Tg exógena para detectar interferencia por TgAb (ver Recomendación N° 46).
- Los valores de Tg sérica para muestras TgAb positivas no se deberían informar si el método da valores inapropiadamente indetectables en pacientes con CDT con enfermedad documentada.

2. Determinación de ARN mensajero (ARNm) para Tg

Se ha utilizado la amplificación de ARNm específico de tejido con la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) para detectar células cancerígenas circulantes en sangre periférica de los pacientes con melanoma, cáncer de próstata y de mama (326-328). La disponibilidad de cebadores (primers) específicos de Tg permitió la aplicación de esta técnica a la detección de transcritos de ARNm Tg en sangre. El uso de RT-PCR para detectar recidiva de cáncer tiroideo se informó por primera vez en 1996 (329). A partir de entonces, se ha aplicado la técnica a material de punción de metástasis de ganglios cervicales y se ha visto que es más sensible que la determinación de Tg en el aspirado (330).

Todavía tiene que establecerse el valor clínico de la determinación de ARNm Tg en sangre periférica. Antes de que se pueda utilizar este método para la toma de decisiones terapéuticas en el CDT, es necesario resolver ciertas cuestiones sobre la sensibilidad y especificidad tisular del ARNm Tg en sangre periférica (323-325).

Varios grupos han desarrollado métodos cuantitativos de RT-PCR para la detección de transcritos de ARNm Tg en sangre (323-325, 331-333). Estos estudios generalmente encuentran ARNm Tg detectable en todos los individuos normales pero presentan una correlación pobre con la Tg sérica determinada por inmunoensayo (331, 332). También hay diferencias en la correlación entre ARNm Tg y masa tumoral. Algunos estudios han informado que la cantidad de ARNm Tg se correlaciona con la presencia o ausencia de metástasis mientras que otros no informan dicha correlación (324, 331, 333). Es probable que estas discrepancias reflejen diferencias (a) en la sensibilidad y en la especificidad de los primers de Tg y los sistemas RT-PCR, (b) en la sensibilidad de las técnicas de imágenes y de los inmunoensayos de Tg utilizados y (c) en el nivel de TSH del paciente. Los problemas de especificidad (resultados falsos positivos) constituyen una conocida limitación de la metodología RT-PCR (328, 334). Se necesitan estudios adicionales para determinar si los niveles detectables de ARNm Tg informados para los pacientes atiróticos sin metástasis conocida reflejan enfermedad clínicamente oculta, artefactos del ensayo o transcripción ilegítima.

Es necesario demostrar la correlación entre los resultados de los ensayos de ARNm Tg y la recidiva clínica, en especial en pacientes ARNm Tg positivos con valores indetectables de Tg sérica antes de que se generalice la adopción del ensayo de ARNm Tg en la práctica clínica. Como este método es más costoso que la determinación de Tg sérica, es probable que si se demuestra que las mediciones de ARNm Tg son útiles para la clínica, se reserven para los pacientes de alto riesgo o TgAb positivos en quienes las determinaciones de Tg sérica no son diagnósticamente confiables.

3. Valores de Referencia de Tg Sérica

(a) Individuos Eutiroideos Normales

Las concentraciones de Tg sérica presentan una distribución normal logarítmica en los individuos eutiroideos. Los valores suelen ser ligeramente más elevados en las mujeres, pero no es necesario establecer rangos de referencia en relación con el género (335). El hábito de fumar es un factor asociado con bocio y valores elevados de Tg sérica (336). Los rangos de referencia de Tg varían según la zona geográfica, ya que reflejan la disponibilidad e ingesta de

yoduro (337, 338). La selección de individuos para la cohorte normal para determinar el rango de referencia de Tg debería respetar los siguientes criterios de exclusión:

- Bocio
- Consumo de cigarrillos
- Antecedentes personales o familiares de enfermedad tiroidea
- Presencia de autoanticuerpos tiroideos (TgAb o TPOAb)
- TSH sérica < 0.5 mUI/L o >2.0 mUI/L
- Embarazo

(b) Valores de Tg sérica después de la cirugía tiroidea

Como se indica en la Recomendación N° 48, el intervalo de referencia para Tg citado en los informes de laboratorio no corresponde para los pacientes que han sido sometidos a cirugía tiroidea. Durante las primeras semanas después de la cirugía, la Tg sérica estará determinada por la extensión de la intervención, el grado de liberación de Tg debida al daño quirúrgico, y, lo más importante, si el paciente está o no bajo tratamiento con hormona tiroidea. De hecho, la concentración de TSH sérica es un modulador tan potente del nivel de Tg sérica que siempre es necesario conocer el nivel de TSH del paciente antes de establecer el significado de cualquier determinación de Tg sérica.

En las primeras semanas posteriores a la tiroidectomía, se produce una típica disminución de las concentraciones de Tg con una vida media aproximada entre 2 y 4 días, cuando la administración de hormona tiroidea evita el aumento de la TSH (340, 341). En este contexto, la relación entre los valores pre- y post-quirúrgicos (entre 6 y 8 semanas) de Tg puede aportar información que podría influir en el esquema de tratamiento. Durante el seguimiento a largo plazo, las concentraciones de Tg sérica medidas con y sin tratamiento de L-T4 (con TSH suprimida o desenfrenada, respectivamente) proporcionan diferente información. La curva de los valores de Tg sérica (con tratamiento con L-T4) es un indicador más específico de un cambio en la masa tumoral que cualquier valor aislado de Tg sérica (122). La concentración de Tg sérica durante el tratamiento con L-T4 es un indicador más estable de masa tumoral que la Tg sérica determinada cuando la TSH está elevada (suspensión de L-T4 o administración de rhTSH) anterior a un rastreo corporal con yodo radioactivo (RAI). Esto se debe a que la magnitud del aumento de Tg sérica estimulada por TSH está influida por el grado y la cronicidad de la elevación de TSH que puede variar de un rastreo a otro. Sin embargo, según lo muestra la Figura 6, como la TSH normalmente estimula más de 10 veces la Tg sérica, las determinaciones de Tg sérica estimuladas por TSH son más sensibles para detectar enfermedad restringida al cuello, que los niveles de Tg sérica determinados durante la supresión de TSH (308, 309). La magnitud de la respuesta de la Tg sérica estimulada por TSH es un indicador de la sensibilidad del tumor a la TSH. Los tumores metastásicos poco diferenciados que son rastreo corporal con yodo radioactivo negativos presentan respuestas disminuidas de Tg estimulada por TSH (310).

Recomendación N° 48. Intervalos de referencia para Tg sérica

- Los rangos de referencia para Tg se deberían determinarse localmente porque las concentraciones de Tg sérica están influenciadas por la ingesta de yoduro:
Países con ingesta adecuada de yoduro: El intervalo de referencia para Tg sérica para la población eutiroides TgAb negativa según los estándares CRM-457 se aproxima a los 3 a 40 µg/L (ng/ml).
Países con yododeficiencia: Es posible que se registre un aumento en la media de Tg de la población y del límite superior del rango de referencia relacionado con el grado de carencia de yodo.
- Los laboratorios deberían validar su intervalo de referencia para Tg independientemente de los fabricantes.
- Se deberían establecer rangos de referencia a partir de los valores logarítmicamente transformados de 120 individuos normales, no fumadores, eutiroides (TSH 0,5 a 2,0 mUI/L) menores de 40 años sin antecedentes personales ni familiares de enfermedad tiroidea y sin evidencia de TgAb o TPOAb.
- Es engañoso citar el rango de referencia normal eutiroides al informar valores de Tg sérica para los pacientes con CTD tiroidectomizados. Los valores de referencia deberían relacionarse con los límites de referencia eutiroides para el método, la masa tiroidea y el nivel de TSH.

Como ejemplo, los rangos de referencia a continuación serían apropiados para un método de Tg con un rango de referencia eutiroideo de 3-40 µg/L (ng/ml):

Tg µg/L (ng/mL)	Condición
3 – 40	Glándula tiroides normal (TSH 0,4-4,0 mUI/L)
1.5 – 20	Glándula tiroides normal (TSH <0.1 mUI/L)
< 10	Lobectomía tiroidea (TSH < 0,1 mUI/L)
< 2	Tiroidectomía casi total (TSH < 0,1 mUI/L)

4. Usos Clínicos de las Determinaciones de Tg Sérica

La concentración de Tg sérica refleja la masa tiroidea, el daño tiroideo y el estímulo del receptor de TSH (122). En consecuencia, un aumento en la Tg sérica es un hallazgo inespecífico no asociado virtualmente con ninguna patología tiroidea.

(a) Patologías no Neoplásicas

Se produce un aumento de la Tg sérica cuando los pacientes tienen bocio y en la mayoría de las patologías hipertiroideas. La concentración baja de Tg sérica puede ser un parámetro útil para la confirmación del diagnóstico de tirotoxicosis facticia o para la investigación de la etiología de hipotiroidismo congénito (342, 343).

Recomendación N° 49. Determinación de Tg sérica para patologías no neoplásicas

Concentraciones anormalmente altas de Tg resultan de anormalidades en la masa tiroidea, excesiva estimulación tiroidea, daño físico a la tiroides secundario a cirugía, PAAF o tiroiditis. Las determinaciones de Tg sérica son útiles para:

- Diagnosticar tirotoxicosis facticia caracterizada por Tg sérica baja.
- Investigar la etiología del hipotiroidismo congénito detectado en el screening neonatal.
- Evaluar la actividad de la tiroiditis inflamatoria, por ejemplo: tiroiditis subaguda o inducida por amiodarona.

La concentración de Tg a veces también es útil para confirmar la historia pasada de tiroiditis, en la cual la concentración de Tg es habitualmente el último parámetro bioquímico que se normaliza (hasta los 2 años) (344). Estudios recientes sugieren la determinación de Tg sérica como un parámetro para reflejar el estado de yodosuficiencia en una población determinada (337, 338).

(b) Carcinoma Diferenciado de Tiroides (CDT)

En el contexto del CDT, la concentración de Tg sérica refleja masa tiroidea (tumor o remanente normal), lesión tiroidea (cirugía o PAAF) y estimulación del receptor de TSH (endógena o con rhTSH) (122). Debido a que la TSH es el principal regulador de la concentración de Tg sérica, es difícil interpretar los valores de Tg sin conocer el nivel de TSH del paciente. Aunque no hay un “rango normal de referencia para Tg” para los pacientes con CDT tratados, la relación normal entre la masa tiroidea y la Tg sérica provee un punto de referencia importante. Concretamente, un gramo de tejido tiroideo normal libera ~1 µg/L (ng/mL) de Tg en la circulación cuando la TSH sérica es normal y ~0,5 µg/L (ng/mL) cuando se la suprime por debajo de 0,1 mUI/L.

Recomendación N° 50. Determinación de Tg sérica para el carcinoma diferenciado de tiroides (CDT)

Pacientes TgAb negativos:

- Los valores séricos pre-quirúrgicos (extracción antes o más de 2 semanas después de la PAAF) son útiles para la determinación de la capacidad secretante de Tg del tumor.
- La disminución aguda post-quirúrgica de Tg sérica refleja la extensión de la cirugía con una vida media de la Tg entre 3 y 4 días. (Si se administra hormona tiroidea para evitar el aumento de TSH).
- No existe “rango normal” para un paciente tiroidectomizado. Los pacientes completamente atireóticos no deben presentar Tg detectable en suero, incluso si la TSH está elevada.
- Parámetro útil de referencia: un gramo de tejido tiroideo normal libera ~1 µg/L (ng/mL) de Tg en suero cuando la TSH es normal y ~0,5 µg/L (ng/mL) cuando la TSH está suprimida a < 0,1 mUI/L.
- Cuando la Tg sérica es detectable durante el tratamiento con L-T4 (TSH estable) se pueden seguir los cambios en la masa tumoral con determinaciones seriadas de Tg sérica sin interrupción de la hormona tiroidea ni rhTSH.
- Cuando la Tg sérica es indetectable bajo tratamiento con L-T4 (y ausencia de TgAb) la Tg sérica estimulada por TSH es más sensible para la detección de enfermedad localizada en el cuello.
- Habitualmente se produce un aumento de >5 veces en la Tg sérica con respecto a los valores bajo supresión con LT4 luego del estímulo con TSH (endógena o rhTSH). Estudios comparativos muestran que las respuestas de la Tg estimulada con rhTSH son aproximadamente la mitad que las observadas con TSH endógena siguiendo a la suspensión de la hormona tiroidea.

Pacientes TgAb positivos:

- Habitualmente presentan respuestas disminuidas o ausentes de Tg sérica estimulada con TSH.
- Las determinaciones seriadas de TgAb (por inmunoensayos) son valiosas como marcadores tumorales sustitutos.

(i) Tg Sérica pre-Quirúrgica

Algunos tumores tiroideos carecen de capacidad para secretar tiroglobulina. En 2/3 de los pacientes con CDT se observa un aumento en el valor pre-quirúrgico de Tg sérica, lo que indica que sus tumores tienen la capacidad de secretar Tg, y por lo tanto el seguimiento post-quirúrgico con Tg puede ser de utilidad clínica en ellos. (307). Esta información es fundamental para la interpretación de los resultados post-quirúrgicos de la Tg sérica. Si el nivel pre-quirúrgico está dentro de los límites normales, un valor post-quirúrgico indetectable de Tg sérica es menos tranquilizador porque el tumor pudo ser originariamente no secretor de Tg. La sensibilidad del control post-quirúrgico con Tg sérica para la detección de recidiva será mayor cuando el tumor sea relativamente pequeño (<2 cm de diámetro) y el valor pre-quirúrgico de Tg sea elevado. (Nota: las muestras pre-quirúrgicas se deberían extraer antes de la PAAF, o después de 2 semanas de la misma).

(ii) Determinación de Tg Sérica entre 1 y 2 meses después de la Cirugía Tiroidea

Después de la cirugía tiroidea, las concentraciones de Tg sérica disminuyen rápidamente con una vida media entre ~2 y 4 días (340). La Tg liberada por daño durante la manipulación quirúrgica se debería resolver en gran parte dentro de los primeros dos meses posteriores a la cirugía. Durante este lapso la TSH tendrá una influencia dominante en el nivel de Tg sérica. Si se inicia el tratamiento con hormona tiroidea inmediatamente después de la cirugía para evitar el aumento de TSH, la concentración de Tg sérica declinará a un valor que refleje el tamaño del remanente tiroideo normal más cualquier residuo o metástasis tumoral. Como el remanente tiroideo después de una tiroidectomía casi total habitualmente se aproxima a 2 gramos de tejido, se espera una concentración de Tg sérica equivalente a < 2 µg/L (ng/mL) cuando la cirugía ha sido exitosa y el nivel de TSH se mantiene por debajo de 0,1 mUI/L.

(iii) Determinación de Tg Sérica durante el Seguimiento a Largo Plazo bajo tratamiento con L-T4.

Cuando el nivel de TSH es estable durante el tratamiento con L-T4, cualquier cambio en el nivel de Tg sérica reflejará un cambio en la masa tumoral. La recidiva clínica en tumores considerados “secretores deficientes de Tg” (valor pre-quirúrgico de Tg en el rango normal) se puede asociar con valores post-quirúrgicos bajos o indetectables de Tg sérica. Por el contrario, la recidiva de tumores considerados “buenos secretores de Tg” (valores pre-quirúrgicos elevados de Tg) se asocia normalmente con un aumento progresivo en Tg sérica (122). El perfil de las determinaciones seriadas de Tg sérica, establecido cuando el paciente tiene TSH estable, es más útil clínicamente que un valor aislado de Tg. Sin embargo, es posible interpretar el significado de un valor aislado de Tg conociendo el rango de referencia del ensayo de Tg, la extensión de la cirugía tiroidea y la concentración de TSH (en un estado estable), según lo muestra la Figura 8.

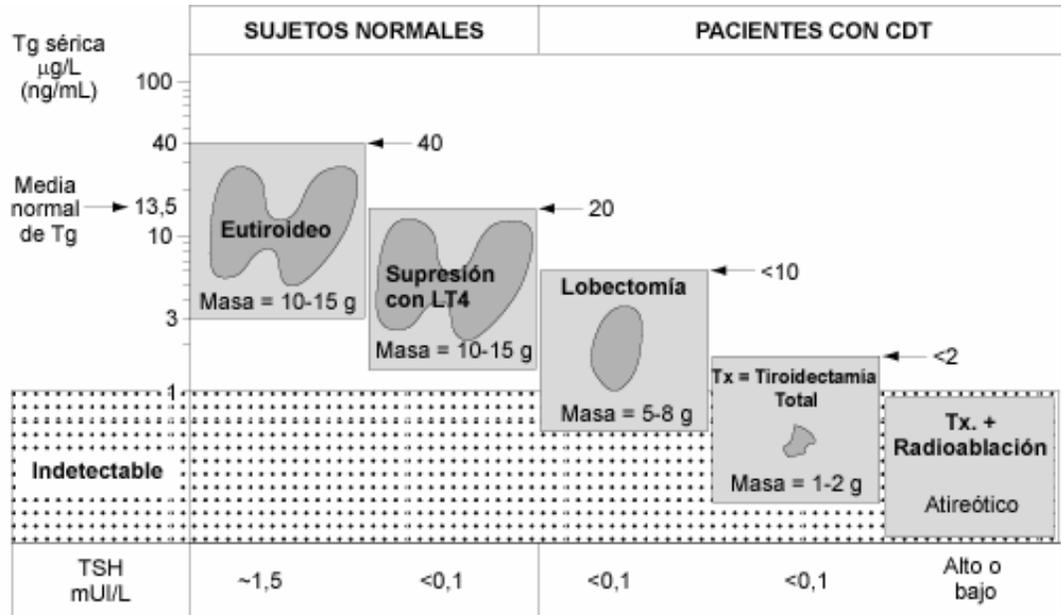


Fig 8. Valores esperados de Tg sérica relativos a la masa tiroidea y al valor de TSH. (Para los métodos con un rango de referencia diferente al que se muestra en la Figura 8 ajustar los valores absolutos aplicando un factor de corrección basado en el valor normal medio del método, por ejemplo, para los métodos con un valor normal medio de 6,2 µg/L (ng/mL) corregir los valores que se muestran en un 50%).

Condiciones asumidas

- Sin lesión tiroidea reciente (cirugía o PAAF)
- Usando la Recomendación N° 48, la media normal de Tg = 13,5, rango 3-40 (2DS) µg/L (ng/mL)
- Masa de tejido tiroideo normal = 10-15 gramos
- Un gramo de tejido tiroideo normal produce ~1µg/L (ng/mL) Tg en suero si la TSH es normal
- Un gramo de tejido tiroideo normal produce ~0,5µg/L (ng/mL) Tg si la TSH es < 0.1 mUI/L

(iv) Respuesta de Tg Sérica al Estímulo con TSH

La magnitud de la respuesta de la Tg sérica a la TSH endógena (suspensión de la hormona tiroidea) o a la administración de rhTSH es un indicador de la sensibilidad del tumor a la TSH (308, 309). Habitualmente, el estímulo con TSH de los remanentes tiroideos normales o de un tumor bien diferenciado produce un aumento >3 veces de Tg sérica por sobre el nivel basal (con TSH suprimida) en los pacientes TgAb negativos (Figura 6). La respuesta de la Tg sérica a un aumento en la TSH endógena es habitualmente dos veces mayor que con rhTSH (308, 345). Además, los tumores pobremente diferenciados, presentan una respuesta disminuida (< 3 veces) de la Tg sérica al estímulo con TSH (310). Cabe observar que los

pacientes TgAb positivos habitualmente presentan una respuesta disminuida o ausente de la Tg al estímulo con rhTSH determinada por la mayoría de los ensayos, incluso cuando la concentración basal de Tg es detectable.

F. Calcitonina y proto-oncogen RET

El carcinoma medular de tiroides (CMT) se produce por una transformación maligna de las células C parafoliculares tiroideas y representa aproximadamente entre el 5 y el 8% de todos los casos de cáncer de tiroides. Aproximadamente el 75% es de presentación esporádica, en tanto el 25% restante es hereditario (9, 11, 347). Según un estudio de patología nodular la prevalencia de CMT es de 0,57% (348). El comportamiento y el manejo del CMT medular difiere del que se observa en el carcinoma de tiroides bien diferenciado de origen folicular (346). Las formas hereditarias de CMT se presentan asociadas a síndromes poliglandulares denominados neoplasias endócrinas múltiples (NEM) tipos 2A y 2B que son, heredados de manera autosómica dominante, con penetrancia asociada a la edad, y expresión variable. Existe la denominada variante familiar del CMT (CMTF), que se caracteriza por la aparición de CMT sin endocrinopatía asociada. En 1993 se describieron mutaciones responsables de estos trastornos en el proto-oncogen *RET* (349, 350), que se localiza en el cromosoma 10 sub-banda 10q11.2. Las expresiones fenotípicas de la NEM hereditaria se resumen en la Tabla 7.

1. Detección de CMT mediante la Determinación de Calcitonina Sérica (CT)

(a) Biosíntesis de Calcitonina

El gen *CALC-1* que codifica para la CT humana se ubica en el extremo del brazo corto del cromosoma 11 (11p15.3-15.5). Si bien las células C parafoliculares tiroideas son la fuente principal de CT circulante, muchas otras categorías de células neuroendócrinas, normalmente contienen y segregan CT. La calcitonina madura es un polipéptido de 32 aminoácidos (aa) con un puente disulfuro y una amida prolínica carboxiterminal que juega un rol funcional importante. Como se muestra en la Figura 9, la CT madura es el resultado de una modificación postraduccional de un precursor de más de 141 aa (preprocalcitonina) dentro de las células C parafoliculares. La preprocalcitonina primero sufre el clivaje de su péptido señal para formar procalcitonina (proCT), una prohormona que consiste en 116 residuos de aa. En el extremo aminoterminal de proCT hay un péptido de 57 aa, denominado aminoprocalcitonina (aminoproCT o PAS-57), y en el extremo carboxiterminal, un péptido de 21 aa conocido como péptido-1 carboxiterminal de calcitonina (CCP-1 o Katalcalcina). Los 33 aa de la porción central de la molécula de proCT constituyen la molécula de CT inmadura. La CT madura activa de 32 aminoácidos (que incluye una prolina amidada en su extremo carboxiterminal) se produce a partir de CT inmadura por acción de la enzima monoxidasa amidante de peptidilglicina (PAM).

(b) Métodos de Determinación de CT

Hasta 1988, los métodos de ensayo para la determinación de CT se basaban principalmente en el radioinmunoensayo y utilizaban anticuerpos policlonales que reconocían tanto el monómero de CT madura como otras formas circulantes (precursores y productos de degradación). Estos primeros ensayos carecían de especificidad y sensibilidad. Desde 1988, las mejoras con las nuevas técnicas inmunométricas basadas en el uso de anticuerpos monoclonales (uno capaz de identificar la región N-terminal y el otro, la región C-terminal) han permitido desarrollar ensayos más específicos y sensibles para la CT madura monomérica de 32 aa. Actualmente los ensayos inmunométricos de dos sitios detectan CT en plasma en ayunas en el 83% y 46% de hombres y mujeres sanos, respectivamente (351-353). Los valores de CT pueden diferir según el método utilizado, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Es importante que los médicos conozcan que las diferencias entre métodos existen y pueden afectar la interpretación y el uso adecuado de la CT en el diagnóstico y el manejo del CMT.

(c) Valores Basales de Calcitonina

En 1968 se estableció que los valores basales de calcitonina eran un marcador útil para el diagnóstico de CMT (354). En la actualidad los IMA de dos sitios, específicos para CT madura, típicamente informan niveles de CT por debajo de 10 ng/L (pg/ml) para los controles normales sanos y para el 90% de los pacientes con otra disfunción tiroidea que no sea CMT. (348, 355-357).

Tabla 7. Fenotipos de Neoplasia Endócrina Múltiple (NEM)

FENOTIPO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	
NEM2A (60%)	Carcinoma medular de tiroides (CMT),	100%
	Feocromocitoma	8-60%
	Hiperparatiroidismo	5-20%
	Dorsalgia	<5%
NEM2B (5%)	Carcinoma medular de tiroides (CMT)	100%
	Feocromocitoma	50%
	Aspecto Marfanoide	100%
	Neuromas de mucosa y ganglioneuromatosis intestinal	100%
Carcinoma medular de tiroides variante familiar (CMTF) (35%)	Carcinoma medular de tiroides (CMT)	100%

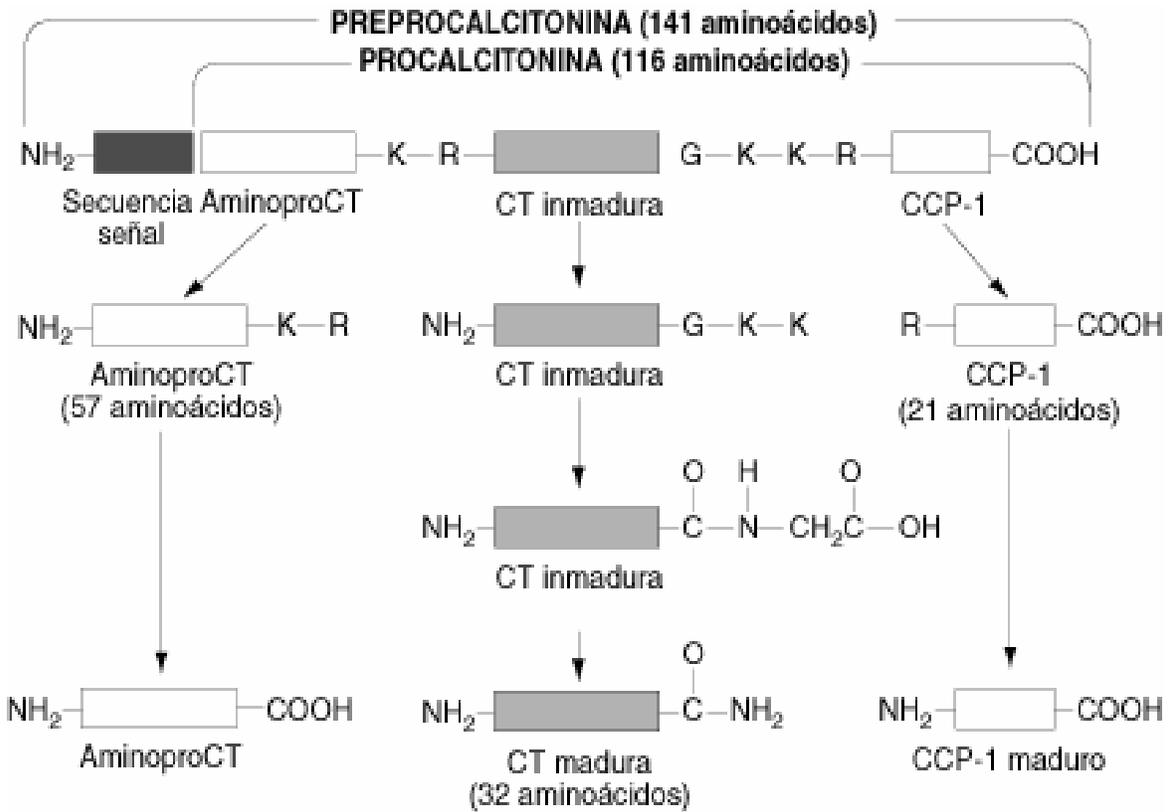


Fig. 9. Maduración Postraduccional de Calcitonina

Recomendación N° 51. Ensayos para CT

- La CT madura (de 32 aminoácidos) es el principal marcador tumoral en el CMT.
- Las determinaciones de CT aplicadas al diagnóstico y seguimiento del CMT deberían realizarse mediante ensayos inmunométricos de dos sitios, específicos para el monómero maduro de CT de 32 aminoácidos.
- Actualmente, los valores basales de CT inferiores a 10 pg/ml (ng/L) son considerados como normales.
- A medida que se disponga de nuevos ensayos más sensibles, dicho umbral debería redefinirse.

Los pacientes con formas micro o macro de CMT (variantes esporádicas o familiares) poseen valores elevados de CT que correlacionan con la masa tumoral (358). La hiperplasia de células C (HCC) es el hallazgo histológico más temprano, previo al desarrollo de un microcarcinoma, en los pacientes con NEM2. La HCC se presenta pronto luego del nacimiento, y en esta etapa de la enfermedad la CT basal puede ser normal. Por lo tanto un resultado basal normal de CT no descarta patología de células C en las etapas más tempranas.

(d) Pruebas de Estimulación de Calcitonina para el Diagnóstico de CMT

Para detectar de manera temprana las anomalías en las células C, se han usado pruebas de estimulación con secretagogos conocidos de la CT como el calcio y un análogo de la gastrina (pentagastrina, Pg y cuando la Pg no está disponible, el omeprazol) ya sea en forma separada o combinada, que provocan un aumento en la CT en todos los estadios del CMT (359-364). Una ventaja de estas pruebas es que pueden detectar hiperplasia de células C antes de confirmarse el CMT. En los países, en los que la utilización de técnicas de genética molecular es accesible, la cirugía para los portadores se basa exclusivamente en la prueba genética, y las pruebas de estimulación se usan raramente. Lo mismo sucede en países en donde la pentagastrina es difícil de obtener. Las pruebas de estimulación se usan habitualmente:

- Para confirmar el diagnóstico de CMT antes de la cirugía cuando los niveles basales de CT están sólo moderadamente elevados (menos de 100 pg/ml).
- Para detectar enfermedad de células C en portadores *RET* positivos.
- Para el control prequirúrgico de niños *RET* positivos.
- Para el control postoperatorio de recurrencia de tumores.
- Cuando la prueba genética no está fácilmente disponible.

Recomendación N° 52. Utilidad Clínica de la Determinación de CT para Diagnóstico de CMT

- Los ensayos de CT son método-dependientes lo cual puede tener un impacto en la interpretación de los resultados de CT.
- En pacientes con enfermedades tiroideas autoinmunes (tiroiditis de Hashimoto o enfermedad de Graves) pueden observarse valores elevados de CT.
- El primer hallazgo histológico previo al desarrollo de un microcarcinoma es la hiperplasia de células C (HCC), la cual puede no estar acompañada de una CT elevada en los primeros estadios de un CMT.
- Un aumento en los valores basales de CT por encima de 10 pg/ml (ng/L) sugiere un CMT en la etapa de microcarcinoma.
- Generalmente existe una correlación positiva entre valores de CT y masa tumoral.

(i) Prueba de Estimulación con Pentagastrina

La prueba de estimulación con Pg se ha utilizado ampliamente en el diagnóstico de CMT pero en muchos países no es muy accesible (359, 365). La misma consiste en una infusión endovenosa de Pg (0,5µg/kg/peso corporal) efectuada durante unos 5 segundos. Esta administración “lenta” de Pg reduce los efectos secundarios transitorios (náuseas, vómitos, compresión subesternal, rubor, y hormigueo en las extremidades) y mejora la tolerancia del paciente a la prueba. Se toman muestras basales, y 1, 2, 5, y a veces 10 minutos después de iniciada la infusión.

La Tabla 8 muestra los resultados y la interpretación de los valores de CT estimulada con Pg. El pico de estimulación normalmente es inferior a 10 ng/L (pg/ml) en el 80% de adultos voluntarios sanos, e inferior a 30 ng/L (pg/ml) en el 95% de la población general. Los varones normales tienen valores más altos que las mujeres. Una prueba positiva [pico de CT superior a 100 ng/L (pg/ml)] sugiere CMT. En los pacientes que tienen la mutación familiar responsable de la NEM2, un pico entre 30 y 100 ng/L (pg/ml) es típicamente revelador de una HCC o de un microcarcinoma. Aunque se ha observado que un pico de CT inferior a 100 ng/L (pg/ml) puede darse en adultos con otras enfermedades tiroideas que no sean CMT (ver la Tabla 9), nunca se han observado tales resultados en niños menores de 12 años que no sean portadores de mutación *RET* (366). La ausencia de CT elevada en individuos jóvenes con mutación del *RET* no excluye la posibilidad de que el CMT se desarrolle posteriormente.

Tabla 8. Interpretación de la Prueba de Pentagastrina

CT ng/L (pg/mL)	Interpretación
Pico de calcitonina (CT) <10	Normal (80% de los adultos)
Pico de CT >30 <50	5% de los adultos normales
Pico de CT >50 <100	Posible CMT u otras patologías tiroideas
Pico de CT >100	Probable CMT
Valor de CT basal o posterior a la pentagastrina >10 pg/ml	Patología de células C o tejido residual en pacientes con NEM 2 y CMT postoperatorio

No se ha establecido la mejor edad para realizar la prueba de Pg en niños portadores de la mutación del *RET* para NEM2 ya que esta varía con el tipo de mutación y el tipo de NEM2 presentes en sus familias (367, 368). Por lo tanto, los portadores de la mutación con valores basales normales de CT deberían someterse a pruebas genéticas o de estimulación lo más pronto posible después del nacimiento para NEM2B, y a los 2 años de edad para NEM2A. Sin embargo, debería destacarse que normalmente se observan valores altos de CT en neonatos, seguidos de un descenso asociado a la edad, desde el nacimiento hasta el año, y aún no se dispone de datos sobre pruebas de estimulación para este grupo de edad (369). Esta prueba debería repetirse una vez al año como mínimo, hasta que de positiva, momento en el cual debería realizarse una tiroidectomía total. Pero dado el pronóstico del CMT, la baja tolerancia a la prueba con Pg, y las repercusiones psicológicas para la familia, algunos médicos prefieren no seguir este procedimiento y optan (como se prefiere actualmente) por realizar una tiroidectomía a todos los portadores de la mutación del *RET* entre los 4 y 5 años de edad.

(ii) Prueba de Estimulación con Calcio

Esta prueba consiste en administrar por vía endovenosa, durante 30 segundos, 2,5 mg/kg de gluconato de calcio. Se toman muestras para CT basal, y a 1, 2 y 5 minutos después de la inyección. Se sospecha hiperplasia de células C si la CT es mayor a 100 ng/L. En esta prueba no se han observado efectos adversos importantes, a excepción de una moderada y transitoria sensación de calor generalizado. Se ha informado que la prueba de estimulación con calcio es menos sensible que la de Pg para el diagnóstico de CMT (370-372). Además, esta prueba no ha sido evaluada usando un ensayo inmunométrico específico para el monómero maduro de CT y, por lo tanto, debe ser reevaluada con los ensayos actuales. Se ha demostrado que la prueba de estimulación con Calcio combinado con Pg potencia la sensibilidad de la prueba con Pg sola (359), resultando así en el ensayo más sensible para medir la existencia de tejido de células C.

(e) CT Basal y Post Estimulación en el Seguimiento de Pacientes después de la cirugía

Luego de la tiroidectomía, la CT sérica es el marcador tumoral aceptado para la detección de tejido tiroideo residual o de metástasis. Un valor de CT detectable, basal o post estimulación, indica la presencia de tejido tumoral (373, 374).

Recomendación N° 53. Seguimiento Postoperatorio del CMT

- ❑ La CT y el CEA deberían determinarse inmediatamente antes y 6 meses después de la cirugía del CMT. En algunos pacientes los niveles de CT disminuyen lentamente. La primera determinación de CT postoperatoria no debería realizarse antes de las 2 semanas.
- ❑ La presencia de tejido residual o la recurrencia del CMT sólo pueden descartarse si ambos niveles de CT, basal y post estímulo son indetectables.

Teniendo en cuenta las variaciones en la velocidad de desaparición de la CT sérica, la primera muestra control postoperatoria no debería tomarse, antes de las 2 semanas después de la cirugía (375). *Cabe destacar que el* antígeno carcinoembrionario (CEA) que se determina junto con la CT para detectar recurrencia, parece ser un marcador útil de desdiferenciación en el CMT y es indicativo de pobre pronóstico en el seguimiento.

(f) Niveles Elevados de Calcitonina en otras patologías además de CMT

Como se muestra en la Tabla 9, se han observado niveles elevados de calcitonina en otras patologías, además del CMT y de los tumores neuroendócrinos. En enfermedades tiroideas autoinmunes (tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves) se suele observar una mayor liberación de CT (376-378). Entre las enfermedades no tiroideas con elevado nivel de CT se incluyen insuficiencia renal severa, hipercalcemia e hipergastrinemia, enfermedades inflamatorias agudas de pulmón y otras formas locales o generales de sepsis (enfermedad de Biermer, trastornos iatrogénicos, etc.) (379-381).

Como en algunos casos los niveles elevados de CT fueron detectados por RIA policlonal, estos informes requieren confirmación con los ensayos actuales basados en anticuerpos monoclonales que son más específicos para CT madura. Estudios que utilizaron un antisuero específico contra ProCT, CT y CCP-1, junto con HPLC y filtración con gel, demostraron que los pacientes con un elevado nivel de CT asociado a enfermedad no tiroidea mostraban un notable aumento en sus niveles séricos de ProCT intacta y, en menor grado, de la forma no escindida, CT-CCP-1. Por lo general, dichos pacientes presentan niveles normales o ligeramente elevados de CT madura. Usando antisuero específico de epitopes y técnicas de aislamiento se ha podido demostrar que otros tumores que no son CMT pueden segregar grandes cantidades de CT madura y diversos precursores (382). Esto puede observarse en varios tumores neuroendócrinos, especialmente en el cáncer de pulmón de células pequeñas y en el carcinoide bronquial. Sin embargo, en estos pacientes, se observa sólo un ligero incremento, o ninguno, en los niveles de CT, después de la prueba de estimulación con Pg. (383). La hiperplasia de células C se presenta en la tiroiditis linfocítica y en algunos pacientes con cáncer diferenciado de tiroides (384-386). Esta HCC puede ser responsable de valores ligeramente elevados de CT madura y de la respuesta aumentada de CT con la prueba de estimulación combinada o con de PG solamente.

Tabla 9. Enfermedades que no son CMT con Niveles Elevados de Calcitonina

Tumores neuroendócrinos	Carcinoma pulmonar a células pequeñas, carcinoide bronquial e intestinal y todos los tumores neuroendócrinos
Hiperplasia benigna de células C (HCC)	Enfermedades tiroideas autoinmunes Cáncer diferenciado de tiroides
Otras enfermedades	Enfermedad renal Hipergastrinemia Hipercalcemia

2. Detección de Cáncer Medular de Tiroides mediante la Determinación de mutaciones en el Proto-oncogen *RET*

Hasta 1987 el único método disponible para detectar sujetos de riesgo de CMT era realizar repetidas determinaciones de CT estimulada en el grupo familiar de los pacientes afectados. La subsiguiente identificación del locus 10q11.2 responsable de la NEM2 en el cromosoma 10 hizo posible la detección de sujetos portadores a

través del screening genético (378). Se ha establecido que diversos tipos de mutaciones en el cromosoma 10 pueden activar el Proto-oncogen *RET* responsable de la NEM2 (349, 350). Esto permite realizar un estudio sistemático del problema antes de que aparezcan los primeros signos biológicos. Actualmente, en muchos países desarrollados, los estudios genéticos constituyen la primera estrategia diagnóstica. Sin embargo, para una predicción efectiva de la enfermedad, es necesario que los resultados positivos del screening genético se complementen con un exhaustivo estudio de los miembros sanos y enfermos de la familia.

El *RET* es un gen de 21 exones que codifica para un receptor de membrana del tipo tirosina quinasa. Este receptor se caracteriza por una región cadherina simil en el dominio extracelular, una región rica en cisteína inmediatamente externa a la membrana y un dominio intracelular de tirosina quinasa. Como se muestra en la Figura 10, las mutaciones descriptas hasta ahora en la NEM2 se hallan en los exones 8, 10, 11, 13, 14, 15 y 16 (368, 387-391).

(a) Screening Genético para el Diagnóstico de NEM2

La NEM2 es una enfermedad familiar autosómica dominante, causada por la activación de mutaciones en el proto-oncogen *RET* (349). Aproximadamente un 75% de todos los CMT son de origen esporádico y único. El 44% de dichos tumores presenta una mutación somática en el codón 918 (392). Se les debe realizar screening a todos los miembros colaterales de la familia, ancestros y descendientes del caso índice, así como a todos los descendientes de los miembros afectados El screening se basa en la identificación de la mutación genómica del proto-oncogen *RET* usando análisis de secuencia de DNA genómico del caso índice y en la búsqueda sistemática de esta mutación en todos los miembros de la familia potencialmente afectados (Figura 11) (393, 394).

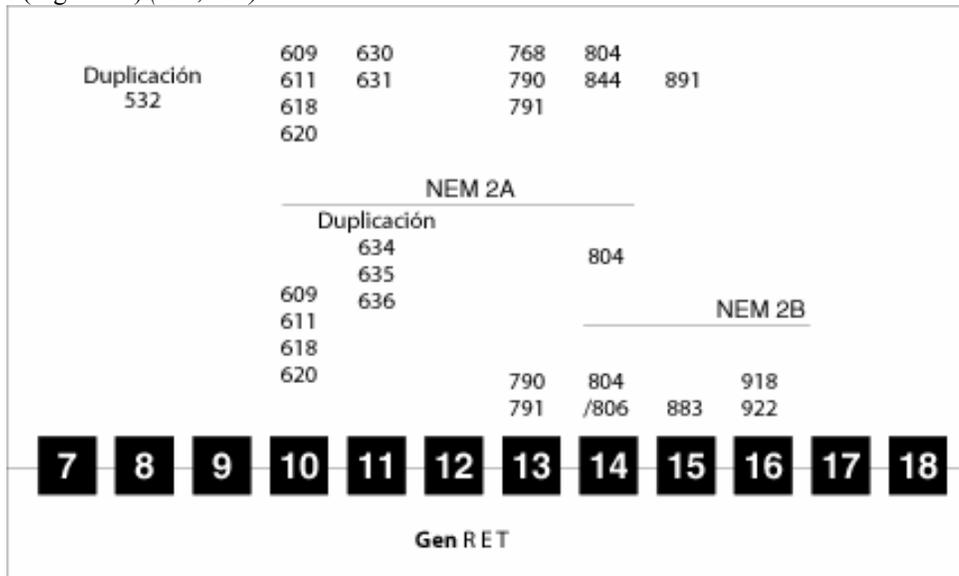


Fig. 10. Mutaciones más frecuentes del proto-oncogen *RET*

Hasta ahora, cinco mutaciones de gen *RET* están presentes en el 97% de los casos de NEM2 (Figura 10). Las mutaciones responsables de la variedad NEM2A afectan principalmente al dominio extracelular rico en cisteína, resultando que cada una de estas mutaciones transforma una cisteína en otro aminoácido. Las principales mutaciones encontradas se ubican en los codones 609, 611, 618 y 620 del exón 10 y en el codón 634 del exón 11(368, 378). El carcinoma medular de tiroides familiar (CMTF) está generalmente asociado a mutaciones en los codones descriptos del exón 10, así como en los codones 768 y 804 de los exones 13 y 14 (368). La mayoría (87%) de las mutaciones en el codón 634 del exón 11 están asociadas a las manifestaciones en múltiples órganos de NEM2A (CMT, feocromocitoma e hiperparatiroidismo) (9, 378).

Los tumores asociados a NEM2B son causados por mutaciones en el dominio intracelular de tirosina quinasa 2 (TK2). La mayoría (97%) de los casos de NEM 2B involucran al codón 918 en el exón 16, que provoca el cambio de una metionina por treonina, la cual se presenta con frecuencia en forma de nuevas mutaciones (“de novo”) de la línea germinal (395). El menor porcentaje (5%) de mutaciones de MEN2B

afecta al codón 883 del exón 15 ó 922 del exón 16 (378, 394). Una correlación entre fenotipo y genotipo sugiere que en pacientes afectados por CMTF con mutaciones del *RET* que no afectan a las cisteínas, la enfermedad de células C aparece más tardíamente que en aquellos pacientes que padecen las mutaciones del *RET* clásicas del exón 10 (368, 396).

Recomendación N° 54. Riesgo Genético de Carcinoma Medular de Tiroides

- En NEM2, el porcentaje de miembros de la familia potencialmente afectados por la enfermedad es del 50%.
- Casi todos los pacientes portadores de mutaciones del *RET* desarrollarán CMT. (Nota: las mutaciones inactivantes del gen *RET* también causan la enfermedad de Hirschsprung.)
- Se encontró que el 5-10% de los CMT presenta mutaciones del *RET* de la línea germinal. Por lo tanto, el análisis del *RET* se justifica en todos los pacientes con CMT aparentemente esporádico.

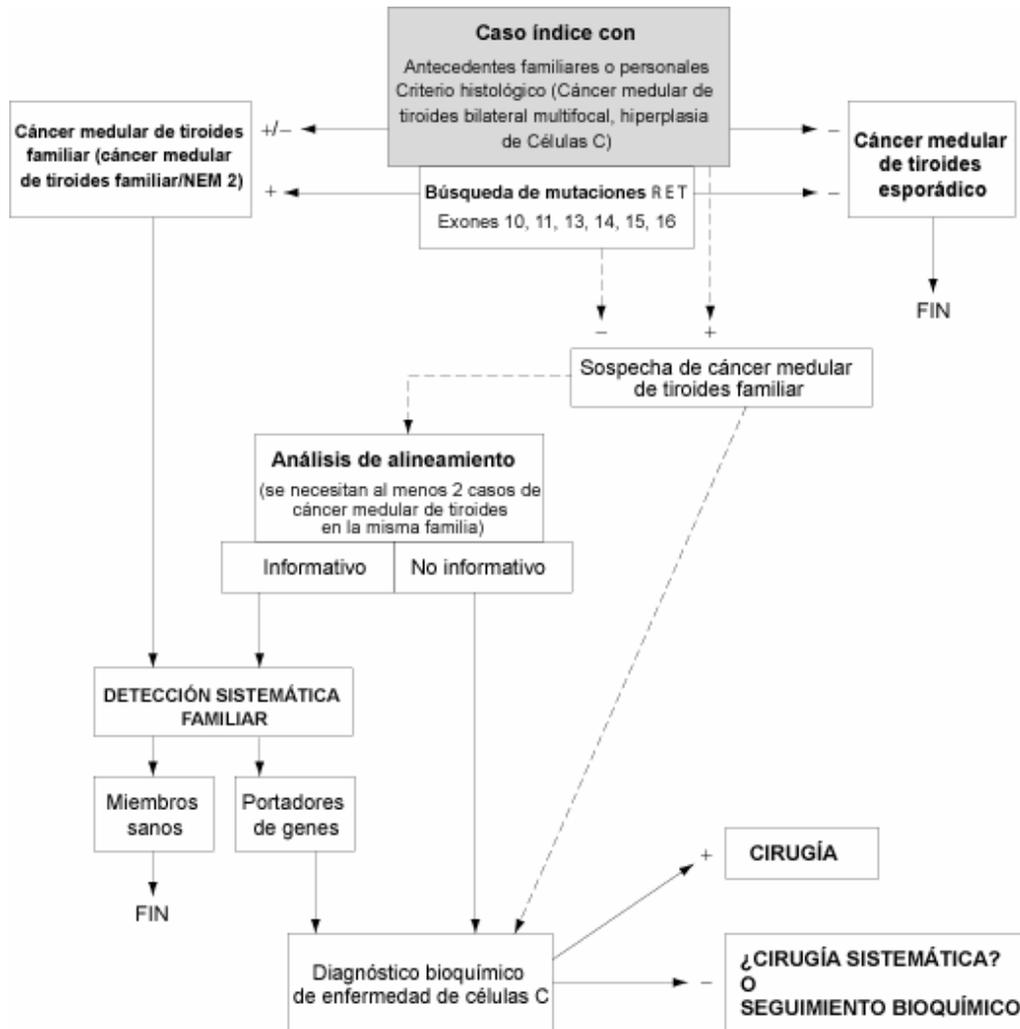


Figura 11. Algoritmo para el Diagnóstico y Tratamiento del CMT

Una vez identificada una mutación en una familia, se puede tener la certeza de que los miembros de dicha familia y sus descendientes que no presentan esa mutación se encuentran libres de la patología. Por el contrario, los sujetos portadores de la mutación padecen la patología y requerirán tratamiento quirúrgico para manejar o prevenir el desarrollo de la enfermedad (Figura 11). Si se identifica una mutación no genómica en el caso índice, como sucede en menos del 3% de las NEM2A y en el 5% de los CMTF, se puede predecir el nivel de riesgo para los miembros de la familia mediante el análisis de ligadura. Si la genealogía familiar no permite efectuar predicciones de este tipo, la enfermedad deberá detectarse repitiendo estudios clínicos y pruebas biológicas específicas a intervalos apropiados.

G. Determinación de yodo urinario

Para una producción normal de hormonas tiroideas y para mantener un estado eutiroideo se necesita una ingesta adecuada de yodo a través de la dieta. Por lo tanto la determinación de la ingesta de yodo proveniente de los alimentos o de medicamentos tiene relevancia clínica. En el laboratorio clínico, las determinaciones de yodo se utilizan fundamentalmente para estudios epidemiológicos o para investigación (3). Hasta la fecha, el interés principal del análisis de yodo es evaluar la ingesta en una población determinada (3, 397, 398). Este es un tema de importancia considerable, ya que se estima que la carencia de yodo y sus consecuencias patológicas (IDD) afecta a unos 2.200 millones de personas en todo el mundo. Incluso en países desarrollados como Estados Unidos y Australia, se ha demostrado una reducción en la ingesta de yodo alimentario, mientras que gran parte de Europa se ubica en el límite de los valores aceptables desde hace mucho tiempo (398, 399). La mayoría de los países de Latinoamérica han reexaminado su estado de yodosuficiencia en los últimos 15 años y han implementado programas para el control de IDD, observándose grandes progresos gracias a la campaña agresiva para el uso de la sal de mesa yodada, aunque aún persisten áreas de deficiencia y exceso (499).

Dado que la mayor parte del yodo ingerido se excreta a través de la orina, la determinación de la excreción urinaria de yodo (IU), brinda una aproximación precisa de su ingesta (399). En la mayoría de los casos la determinación IU brinda escasa información útil sobre el estado nutricional de yodo en un individuo a largo plazo, ya que los resultados obtenidos reflejan simplemente la ingesta reciente. Sin embargo, determinar la excreción urinaria de yodo en una cohorte representativa de individuos de una población específica provee un índice útil del nivel de yodo endémico de esa región. (399, 400). Además de estimar la concentración de IU, también se puede determinar yodo en la leche, los productos alimenticios y el agua potable (401, 402). La determinación de yodo en tejido tiroideo o mamario se ha realizado como parte de algunos estudios de investigación clínica (403). Como las concentraciones séricas bajas de yodo inorgánico (~ 1pg/dL) están asociadas a yodo hormonal relativamente abundante, la medida de yodo inorgánico plasmático (PII) se ha restringido a estudios de investigación en el embarazo (404).

1. Excreción urinaria de yodo (IU)

El nivel de IU de una población puede brindar una estimación relativamente exacta del estado de ingesta alimentaria de yodo de esa población (399, 400). La mejor manera de determinar la ingesta de yodo es en orina de 24 horas, pero es poco práctico para estudios epidemiológicos. Las diferencias en la yoduria de una micción a otra, cuando se realiza la determinación en muestras de orina aisladas, pueden compensarse expresando los resultados corregidos por creatinina urinaria, es decir, como μg de yodo excretado/gramo de creatinina (405). Los ciclos diurnos y estacionales de las excreciones de yodo y creatinina son diferentes. Por consiguiente, la relación yodo / creatinina puede variar según el momento del día o la época del año. Además, no existe un sustituto ideal de la muestra de orina de 24 horas, que es más difícil de obtener. Sin embargo, la estimación de la ingesta de yodo mediante el IU es muy importante en los países en desarrollo en donde el índice yodo/creatinina está por debajo del nivel satisfactorio y en donde existe una tasa de excreción de creatinina menor debido a la desnutrición en grados variables (406). También se ha demostrado que la excreción urinaria de yodo puede ser variable, aún en individuos sanos y con una alimentación equilibrada. Por estas razones y para evitar errores introducidos con los diferentes ensayos de creatinina, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado que para estudios epidemiológicos, la excreción de IU se exprese como μg de yodo por unidad de volumen (pg/dL o $\mu\text{g/L}$) de orina. Las diferencias en los valores inherentes a las variaciones de la yoduria de una micción a otra pueden compensarse, en parte incluyendo un gran número de sujetos (~50) en cada estudio de población. Informes recientes sugieren que el uso de la relación (IU/Cr) ajustadas por edad y sexo en una muestra matinal en ayunas se asemeja a la IU de 24 horas si el estado nutricional, en líneas generales, es adecuado (400, 407). Si bien las variaciones estacionales pueden no ser tan importantes en los climas más cálidos, sí afectan los resultados en el Norte de Europa en donde la leche de vaca constituye la mayor fuente de yodo alimentario. En estas últimas poblaciones, la alimentación bajo techo del ganado con suplementos ricos en minerales se traduce en una mayor excreción de IU en la población durante los meses de invierno. Más recientemente se ha sugerido que el IU tiene una variación diurna, con valores que alcanzan un nadir a la mañana temprano u

8-12 horas luego de la última comida, sugiriendo que las muestras deberían ser recolectadas en esos horarios (408).

2. Yodo alimentario

En muchos países se logra una ingesta adecuada de yodo mediante la yodación de la sal pero la disponibilidad de sal yodada sólo es obligatoria en algunos países desarrollados, y optativa en muchos otros. También se observa una disminución en el consumo de yodo en algunos países industrializados (399). Dicha disminución puede responder a dietas vegetarianas, especialmente en áreas en las que se cultivan frutas y hortalizas en suelos deficientes de yodo (409).

3. Unidades de medida del IU

Para estudios epidemiológicos, la excreción de yodo se expresa normalmente como µg de yodo excretado. Conversión a unidades del Sistema Internacional (SI):

- 1,0 µg/dL = 0,07874 µmol/L
- 1,0 pmol/L = 12,7 pg/dL.

4. Aplicaciones de la determinación de yodo

(a) Estudios epidemiológicos

La principal aplicación de las mediciones de yodo es en estudios epidemiológicos. El consumo diario de yodo recomendado es: 90 µg/día en niños, 150 µg/día en adultos y 200 µg/día en embarazadas o madres que amamantan. En la Tabla 10 se muestran los valores sugeridos para el IU como índices de la severidad de la deficiencia de yodo (398).

Tabla 10. Excreción urinaria y deficiencia de yodo

*Deficiencia de yodo	Ninguna	Leve	Moderada	Severa
IU (µg/L) <20	>100	50-99	20-49	<20
Prevalencia de bocio	<5%	5,0-19,9%	2~29,9%	>30%

*Boletín Informativo *IDD, Agosto de 1999 15: 33-48

(b) Embarazo y neonatos

Afortunadamente, la incidencia de deficiencias de yodo severas causantes de cretinismo endémico se ha reducido como resultado de los programas de suplementos de yodo en la dieta. Sin embargo, la deficiencia de yodo persiste en grandes áreas del mundo. La situación en la que la deficiencia de yodo puede tener consecuencias más serias es en la mujer embarazada, en que puede comprometer el estado tiroideo del feto y del recién nacido (2, 410). Los informes sobre las variaciones en la excreción de IU durante el embarazo no son coincidentes. Algunos estudios muestran una reducción o ningún cambio, mientras que otros informan un incremento (47, 411-413). Estas diferencias pueden reflejar variaciones en el aporte del yodo alimentario (414). No obstante, la utilización de yodo urinario para estimar el aporte de yodo durante el embarazo puede inducir a error ya que este estado incrementa la tasa de excreción de yodo, lo que ocasiona un incremento relativo de su concentración urinaria, dando una falsa impresión de ingesta adecuada (415). Se ha demostrado, que la ingesta insuficiente de yodo alimentario durante el embarazo, influye sobre la función tiroidea, con aumento del volumen tiroideo y de la Tg sérica y disminución relativa de la T4L (47). La administración de yodo a mujeres embarazadas aumenta su excreción en la orina, revirtiendo los cambios tiroideos observados en la deficiencia de yodo. La importancia de evitar cualquier compromiso en la función tiroidea durante el embarazo fue enfatizada recientemente por un estudio que indica que aún los niños de madres levemente hipotiroideas pueden presentar defectos en su desarrollo neuropsicológico (64, 65). Este hallazgo es consistente con informes anteriores que muestran una disminución del yodo

inorgánico plasmático (PII) durante el embarazo. Los primeros métodos para medir PII se basaban en administrar a las pacientes una dosis trazadora de yodo-131, y medir de la actividad específica del radioisótopo en suero y en orina (405). Otros métodos dependían de la relación yodo / cretinina en suero y en orina (405, 416). Un estudio reciente que emplea digestión con perclorato y la fórmula $PII = \text{Yodo sérico total} - \text{Yodo unido a proteínas}$, demostró que, al menos en las áreas suficientes en yodo, no existía una tendencia a la disminución del PII durante el embarazo (404).

(c) Ingesta excesiva de yodo

Como se sabe, en individuos susceptibles, el consumo excesivo de yodo puede conducir a la inhibición de la síntesis de hormonas tiroideas (efecto Wolff Chaikhoff) y ser de origen iatrogénico (417, 418). Un exceso de consumo de yodo por parte de individuos con deficiencia previa y autonomía tiroidea puede ocasionar hipertiroidismo (efecto Jod Basedow) (398, 420). La implementación de programas de ingesta de yodo en la población puede influir en la forma en que se presenta la enfermedad tiroidea. Ello se observa especialmente en el hipertiroidismo, en el que el bocio multinodular tóxico es más prevalente cuando la ingesta de yodo es baja, y la enfermedad de Graves lo es cuando la ingesta de yodo es alta. Sin embargo, se ha demostrado que un programa de ingesta de yodo controlada, si se mantiene durante un tiempo, causa un incremento transitorio de hipertiroidismo durante el primer año, y luego una reducción tanto en el bocio multinodular tóxico como en la enfermedad de Graves (421). Las diferencias en la presentación de la enfermedad pueden, también alterar el perfil epidemiológico del cáncer de tiroides, con un incremento relativo del carcinoma papilar de tiroides junto con un mejor pronóstico al incrementarse el suplemento de yodo (422).

El temor de posibles efectos colaterales por exceso de yodo ha impedido la implementación de programas de profilaxis y aún la posibilidad de administrarlo luego de la liberación accidental de yodo radiactivo. Sin embargo, hay acuerdo general, en que los beneficios de la administración de yodo superan ampliamente los riesgos de una excesiva exposición (398). De este modo, el interés en medir el IU para evaluar el aporte excesivo puede superar al que se tiene para evaluar la deficiencia de yodo. El exceso de yodo puede originarse en el consumo de medicamentos que lo contengan en grandes proporciones, tales como el antiarrítmico comúnmente prescrito, amiodarona, o algunos antisépticos (Recomendación N° 5) (75, 418, 419, 421, 423). Las consecuencias tiroideas del tratamiento con amiodarona pueden depender del nivel subyacente de yodo alimentario del área donde reside el paciente. El hipotiroidismo es más frecuente en áreas con alta ingesta de yodo, tales como los EE.UU., y el hipertiroidismo es más frecuente, donde la ingesta es baja como en algunas regiones de Europa (424).

La ingesta excesiva también está implicada en la mayor prevalencia de tiroiditis autoinmune y en el incremento de anticuerpos anti tiroglobulina positivos luego de la profilaxis yodada. Esto puede deberse al aumento de la antigenicidad de las formas de tiroglobulina con alto contenido de yodo (425, 426). Habitualmente, la evaluación del exceso de yodo se realiza en orina de 24 horas. Es necesario conocer que el yodo orgánico presente en el material de contraste radiológico puede ser captado por la grasa corporal, y una liberación lenta del yodo proveniente de esos depósitos de grasa se ha asociado con una excreción alta de IU que puede persistir por varios meses luego de la administración de este material de contraste (427).

5. Metodología para la determinación de yodo

Tradicionalmente, los métodos que determinan el contenido de yodo en las muestras biológicas se han basado en la transformación de compuestos yodados orgánicos en yodo inorgánico y en la remoción de los interferentes potenciales (Ej: tiocianato) que pueden perturbar la determinación colorimétrica del yodo inorgánico (428). El procedimiento incluye un paso de digestión preliminar seguido de la valoración colorimétrica del yodo a través de su acción catalítica en la reacción de Sandell-Kolthoff (SK). En esta reacción, los Ce^{4+} (iones céricos) se reducen a Ce^{3+} (iones cerosos) en presencia de As^{3+} (iones arseniosos) que luego se oxidan hasta convertirse en As^{5+} (iones arsénicos), produciendo un cambio de color de amarillo a incoloro. Luego de un breve período de incubación, este cambio puede determinarse colorimétricamente. Como esta reacción es tiempo-dependiente, algunos informes sugieren detenerla con el

agregado de sulfato de amonio ferroso y realizar las lecturas colorimétricas más tarde. Con otras modificaciones de la reacción de SK se puede producir un ensayo cinético alterando la relación de los iones Ce/As, procedimiento que puede aumentar la sensibilidad del ensayo (429). Ya ha sido mencionada la necesidad de remoción de sustancias interferentes, tales como tiocianato en la reacción de SK. Un estudio comparativo entre 6 métodos de análisis del yodo, atribuyó muchas de las interferencias en la reacción de SK a procedimientos de digestión inadecuados (428). Esencialmente se usan dos métodos de mineralización de la muestra, el de cenizas secas y el de cenizas húmedas.

(a) Método de cenizas secas

La técnica de cenizas secas se introdujo en 1944, y luego fue modificada. Consiste en un secado preliminar de las muestras en un horno a 100°C, seguido de la incineración del residuo seco en presencia de álcali fuerte (KOH/K₂CO₃) durante unas tres horas a 600°C. La ceniza se reconstituye posteriormente en agua destilada y el contenido de yodo se determina por colorimetría como se describió anteriormente. El procedimiento es lento y costoso, y requiere tubos de ensayo pyrex de paredes gruesas para resistir las altas temperaturas y un horno de mufla, preferentemente equipado con un microprocesador para controlar la temperatura. Sin embargo, brinda excelentes resultados no sólo para las muestras de orina sino que también es adecuado para determinar el contenido de yodo de los productos alimentarios y de las muestras de tejidos que requieren digestión completa. Para evitar pérdidas de yodo es importante controlar estrictamente la temperatura en caso de que ésta supere los 600°C o se prolongue el tiempo de incineración (429, 430). También es importante que los estándares de yodo se sometan a la incineración, ya que se sabe que el OHK agregado reduce la sensibilidad del ensayo basado en la reacción de SK. Estos métodos se desarrollaron para la determinación del yodo unido a proteínas (PBI) que se usaba para determinar las hormonas tiroideas antes la disponibilidad de los radioinmunoensayos específicos para T4 y T3. Como las muestras se incineran juntas en el horno de mufla, el procedimiento de cenizas secas es particularmente susceptible a la contaminación cruzada por alguna de las muestras que tenga alto contenido de yodo. Para evitar esta posibilidad se ha sugerido efectuar una selección preliminar para detectar tales muestras. El problema de contaminación cruzada afecta fundamentalmente al procedimiento de cenizas secas pero puede afectar potencialmente a todos los métodos de cuantificación de yodo. Por lo tanto es conveniente que el área donde se efectúa la determinación de yodo esté aislada y se mantenga lo más lejos posible de otras actividades del laboratorio, particularmente aquellas que puedan involucrar el uso de reactivos que contengan yodo. Las técnicas de manipulación y la volatilización de grandes volúmenes de orina para estudios epidemiológicos, también hace que sea recomendable contar con un laboratorio o espacio aislado para tal fin.

(b) Cenizas húmedas

Si bien controvertido, el método de digestión más usado es el de cenizas húmedas propuesto en 1951. El método ha sido automatizado y consiste en digerir las muestras de orina con ácido perclórico. El procedimiento automático, aunque actualmente generalizado, se basa en una digestión ácida y requiere un módulo de diálisis, que es susceptible a interferencias significativas por sustancias tales como el tiocianato (428). Se han desarrollado diversas variantes del método de cenizas húmedas, con el propósito de simplificar el procedimiento y optimizarlo para estudios epidemiológicos, además de reducir los costos de procesamiento de las muestras. Han sido descriptos varios procedimientos alternativos que arrojan resultados similares a los de los métodos convencionales (431). En uno de dichos métodos, los autores indican que un solo técnico puede realizar 150 determinaciones diarias con un costo inferior a US \$0,50 por determinación (431). Más recientemente, se han descripto métodos aún más sencillos que usan ya sea la digestión ácida o la irradiación UV de las muestras. La desventaja de la técnica de cenizas húmedas es que el ácido perclórico y el clorato de potasio son potencialmente explosivos y su uso requiere una costosa campana especial para gases. Por ello se ha propuesto un método de digestión de orina menos riesgoso que emplea persulfato de amonio como agente oxidante. Sin embargo el uso de este agente no resultó muy eficaz para mineralizar compuestos yodados tales como T3, T4, amiodarona, etc. Ha sido descripta otra modificación que integra los procesos de digestión y de reacción en una tecnología de microplaca (433). También se desarrolló un equipo comercial que permite una determinación cuantitativa más rápida de la yoduria después de la purificación con carbón. (Urojod, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Este método parece simple de realizar y puede utilizarse para estudios epidemiológicos u ocasionalmente para evaluar la ingesta excesiva de yodo (434).

(c) Sensibilidad y especificidad de los métodos para determinar yodo

Los ensayos que utilizan la reacción de SK tienen sensibilidades entre 10 y 40 µg/L, más que adecuadas para determinar la excreción urinaria de yodo. Mayor sensibilidad se logra usando el ensayo cinético (0,01 µg/L) (429), mientras que la obtenida mediante la espectrometría de masa plasmática acoplada por inducción (ICP-MS) está en el orden de los 2µg/L (413, 434). Siempre que la digestión inicial sea completa, el método de SK es muy específico para el yodo. No obstante una digestión incompleta puede facilitar la interferencia de sustancias tales como medicamentos que contienen yodo, tiocianato, ácido ascórbico o metales pesados como Hg o Ag (429). En manos expertas, la reacción de SK tiene una excelente precisión intra- e inter-ensayo alcanzando de rutina un CV < 5%, con la condición de que la digestión esté adecuadamente controlada a fin de que la recuperación del estándar de yodo sea de 90 a 100% (429, 430, 432).

(d) Ensayos sin incineración

Además de los métodos basados en digestión alcalina y ácida, otros métodos publicados para la determinación de yodo incluyen el uso de bromo en condiciones ácidas como agente de digestión, o el uso de radiación ultravioleta (430,435). Los electrodos selectivos para yodo y la espectrometría de masa se han utilizado para determinar el contenido en diversos líquidos, incluyendo orina (436, 437). En este caso la actividad medida se aproxima a la concentración de yodo. La desventaja de este método es que los electrodos se recubren de material y deben limpiarse con frecuencia, observándose interferencia de otros iones como los sulfitos. Por consiguiente, esta técnica no es ideal para determinaciones en orina pero puede emplearse para medir el yodo en otros líquidos y en extractos de alimentos. Si bien no es adecuada para determinar la excreción de IU de manera rutinaria, esta técnica puede aplicarse a la evaluación de sobrecarga de yodo en pacientes tratados con amiodarona u otros compuestos ricos en yodo (437). Como el electrodo responde al yodo pero no a compuestos yodados, puede ser un método eficaz para determinar específicamente yodo en presencia de otros compuestos yodados. Otras técnicas totalmente inadecuadas para uso clínico de rutina incluyen el análisis de activación nuclear o la HPLC. Un método muy empleado es el uso de ICP-MS (432, 438). Este método es bastante consistente con las técnicas de digestión convencionales que usan la reacción de SK. Sin embargo, el equipo requerido es costoso y no muy accesible. El análisis de dilución isotópica se ha aplicado al análisis tanto de orina como de agua potable (402). Las determinaciones *in vivo de yodo intratiroideo*, han sido posibles usando fluorescencia de rayos X, método que puede resultar de interés en la evaluación de pacientes con hipertiroidismo inducido por amiodarona (419).

Recomendación N° 55. Determinación de yodo urinario

- El autoanalizador Technicon ya no está disponible comercialmente, lo que obliga a desarrollar métodos manuales a los laboratorios que se inician en la determinación de yodo.
- La espectrometría de masa es una técnica simple y reproducible que puede recomendarse si ya se dispone del equipo necesario.
- Se han descrito muchos métodos simplificados de digestión que incorporan la reacción de SK en la colorimetría.
- El ácido perclórico y el clorato de potasio empleados en el método de cenizas húmedas son potencialmente explosivos y requieren el uso de una campana especial para gases de costo relativamente elevado. Un sistema menos peligroso es el que usa persulfato de amonio.
- Aun así, es posible que la determinación de yodo en muestras que no sean de orina (por ej., en tejidos o alimentos) requiera las técnicas convencionales de cenizas secas o húmedas.
- El CV inter-e intra-ensayo debería ser < 10% y la recuperación del yodo agregado debería estar entre 90 y 100%.
- En países industrializados, los laboratorios clínicos tienen la demanda de realizar determinaciones de yodo en orina para investigar el exceso de yodo. El método de elección es uno de los métodos simplificados expuestos anteriormente o un equipo comercial semicuantitativo.
- Para facilitar la uniformidad de las unidades de concentración del yodo urinario la IU debería expresarse en µg yoduro/L de orina (µg/L).

6. Resumen

Es poco probable que en un futuro inmediato la determinación de yodo en tejidos y líquidos biológicos juegue un rol clave en los laboratorios bioquímicos clínicos de rutina. Sin embargo, teniendo en cuenta la gran cantidad de personas con IDD a nivel mundial (2,2 billones de afectados) y de informes recientes sobre la disminución (en Estados Unidos y en Australia) o la insuficiencia (en Europa) en la ingesta de yodo, la determinación de IU como parte de estudios epidemiológicos continuará siendo de considerable interés. Indudablemente los laboratorios de referencia seguirán empleando las técnicas de cenizas secas y cenizas húmedas, en función de su disponibilidad de equipamiento. Las recomendaciones recientes de que los laboratorios “tengan diversos métodos disponibles para permitir a los usuarios seleccionar el que mejor se adapte a sus necesidades específicas” parecerían prudentes para los centros especializados en la determinación de yodo.



H. Punción aspirativa con aguja fina (PAAF) y citología de tiroides

La prevalencia de nódulos tiroideos palpables en adultos se incrementa con la edad (4-7% de la población de Estados Unidos en promedio) y es más frecuente en mujeres (439-441). En los adultos el 95% de estos nódulos son benignos, mientras que en los pacientes menores de 21 años en quienes la patología nodular no es frecuente (0,22-1,8%), hay mayor incidencia de cáncer (33% vs 5%, niños vs adultos, respectivamente) (442-445). Entre los métodos que se emplean actualmente para evaluar los nódulos tiroideos se incluyen: punción aspirativa con aguja fina (PAAF), centellografía tiroidea y ecografía. La práctica sugiere que la PAAF es más útil desde el punto de vista diagnóstico con relación a costo-beneficio que las otras opciones diagnósticas (446); sin embargo, un estudio reciente llevado a cabo en Estados Unidos revela que en 1996 sólo se recurrió a esta técnica como procedimiento inicial en un 53% de casos con nódulos tiroideos. A pesar de la presunción de que los nódulos tiroideos isotópicamente “fríos” son carcinomas, también son fríos la mayoría de los nódulos tiroideos benignos (quistes, nódulos coloides, lesiones foliculares benignas, nódulos hiperplásicos y nódulos en tiroiditis de Hashimoto). Por otra parte, también pueden ser cancerosos los nódulos “tibios” o iso-funcionantes que no suprimen totalmente la TSH ni por consiguiente la función del tejido tiroideo normal circundante. También se han descrito carcinomas, aunque en menor proporción, en nódulos calientes autónomos (498). El análisis de regresión logística indica que la probabilidad de obtener muestras citológicamente adecuadas se incrementa considerablemente con el tamaño del nódulo (448). Si bien se puede emplear la ecografía para detectar nódulos no palpables, esta técnica no permite diferenciar una lesión benigna de una maligna. Por lo general se la utiliza para evaluar masas quísticas mixtas y nódulos difíciles de palpar (449), determinar el tamaño de los nódulos y controlar su crecimiento, y verificar la presencia de nódulos no palpables detectados de modo fortuito mediante otra técnica de diagnóstico por imágenes. La PAAF guiada por ecografía debe utilizarse para nódulos hipoeoicos y cuando la aspiración usada individualmente no permite obtener material adecuado (450, 451).

1. Indicaciones para la PAAF

Todos los nódulos únicos o dominantes iguales o mayores de 1 cm de diámetro deberían evaluarse mediante PAAF. Se prefiere esta a la centellografía tiroidea o a la ecografía como método diagnóstico inicial en la evaluación de pacientes con nódulos tiroideos (452). Desde que la PAAF se impuso durante la década del '70, el número de cirugías de tiroides se redujo en un 50% mientras que el porcentaje de cáncer en pacientes sometidos a cirugía por nódulos tiroideos se incrementó desde 10-15% a 20-50% (453). La frecuencia de los falsos negativos de PAAF depende de la pericia del operador y de la experiencia del citopatólogo. Se estima que los índices de falsos negativos son inferiores al 2 % (455).

Recomendación N° 56. Uso de la punción aspirativa con aguja fina (PAAF)

- Se recomienda el uso de la PAAF para todos los nódulos únicos o dominantes palpables independientemente de su tamaño.
- En los nódulos tiroideos se prefiere la PAAF a la centellografía tiroidea o a la ecografía como método diagnóstico inicial. Sin embargo, una ecografía previa a la citología aspirativa puede ser útil para el médico cuando vaya a realizar la PAAF.
- Si hay supresión de TSH o el paciente es hipertiroideo puede indicarse una centellografía antes de la PAAF. Sin embargo, cualquiera sea el resultado de la centellografía no excluye la necesidad de realizar posteriormente la citología aspirativa.
- Los nódulos “calientes” detectados mediante centellografía tienen menos probabilidad de ser cancerosos que los “fríos”.

2. Factores que sugieren mayor riesgo de cáncer de tiroides

Existe una serie de factores que sugieren un mayor riesgo de carcinoma de tiroides (456-458). Ellos son:

- Edad < 20 o > 40 años
- Nódulo > 2cm de diámetro
- Adenopatía regional
- Presencia de metástasis a distancia
- Antecedentes de irradiación previa de cabeza o cuello
- Lesión de rápido crecimiento
- Aparición de disfonía, disfagia progresiva o disnea
- Antecedentes familiares de cáncer papilar de tiroides
- Antecedentes familiares de cáncer medular o neoplasia endocrina múltiple (MEN) tipo 2

Algunos de estos factores se incluyen en los protocolos de evaluación de riesgo de tumores. La clasificación TNM (tamaño del tumor, metástasis ganglionar, metástasis a distancia) y la edad constituyen el algoritmo general de evaluación de riesgo de los tumores. Existe una serie de protocolos de estados específicos para tumores tiroideos (12) que aportan la información requerida para establecer una estrategia terapéutica adecuada. Si bien la clasificación TNM está generalizada, puede ser engañosa cuando se aplica a tumores tiroideos. Concretamente, en carcinomas no tiroideos la presencia de metástasis ganglionares es un factor de peso con impacto negativo en la mortalidad. Por el contrario, en los carcinomas diferenciados de tiroides (CDT) que con frecuencia afectan a pacientes jóvenes, las metástasis ganglionares pueden o no tener efecto mínimo sobre la mortalidad pero sí incrementan la probabilidad de recurrencia.

Recomendación N° 57. Para los médicos

- Es importante que el endocrinólogo, cirujano, radioisotopista y citopatólogo actúen en forma conjunta para integrar la información referente a la estadificación en una estrategia terapéutica a largo plazo, garantizando de este modo la continuidad del seguimiento
- Preferentemente los médicos responsables del manejo a largo plazo del paciente deberían examinar los extendidos con el citopatólogo y estar en condiciones de interpretar los resultados a fin de establecer estrategias terapéuticas convenientes.

3. Factores que sugieren menor riesgo de cáncer de tiroides

La PAAF puede diferirse en pacientes de bajo riesgo que presenten las siguientes características:

- Nódulo caliente autónomo (TSH sérica < 0,1mUI/L).
- Nódulos incidentales < 1 cm detectados por ecografía.
- Pacientes embarazadas con un nódulo único. La PAAF de nódulos detectados durante el embarazo puede diferirse hasta después del parto sin aumentar el riesgo de morbilidad por CDT (459). La cirugía durante el segundo trimestre de embarazo minimiza el riesgo para el feto en caso que fuese necesario extirpar un nódulo tiroideo durante la gestación.
- Bocio multinodular con nódulos < 1 cm.
- Nódulos fluctuantes o blandos.
- Tiroiditis de Hashimoto. Las indicaciones incluyen una glándula semiológicamente firme y “renitente” sin nódulos dominantes asociados a elevado título de anticuerpos antiperoxidasa (TPOAb)

4. Seguimiento de pacientes con PAAF diferida

La frecuencia del seguimiento (eg, cada 6 ó 24 meses) debe adecuarse al grado de certeza diagnóstica de que el nódulo es benigno. La eficacia de la terapia supresiva de TSH con levotiroxina es variable. La finalidad del seguimiento es identificar a pacientes con procesos malignos no diagnosticados y reconocer cualquier crecimiento progresivo que pudiera resultar en complicaciones compresivas locales y preocupaciones estéticas, controlando el tamaño del nódulo preferentemente con ecografía. Si no es posible recurrir a este método debería realizarse un cuidadoso examen físico. Esto puede lograrse del siguiente modo:

- Colocando una cinta sobre el nódulo y delineando los bordes con una lapicera para luego pegar la cinta en la historia clínica del paciente.
- Utilizando una regla para registrar el diámetro del nódulo en dos dimensiones.
- Palpando los ganglios linfáticos adyacentes para detectar posible crecimiento.
- Diagnosticando cualquier otra disfunción tiroidea clínica o subclínica realizando determinaciones periódicas de TSH y TPOAb.
- Evaluando a los pacientes para detectar signos de malignidad subsecuente o no diagnosticada tales como:
 - agrandamiento progresivo del nódulo o bocio
 - aumento de Tg sérica
 - compresión local y síntomas invasivos (disfagia, disnea, disfonía, tos, dolor)
 - desviación traqueal
 - adenopatía regional

5. Recomendaciones para quienes realicen la PAAF

Es fundamental tener experiencia en citología aspirativa. Si la PAAF es realizada por el citólogo o el ecografista, debe haber un intercambio adecuado de información con el médico clínico (460). Los médicos que indican una PAAF deberían tener la posibilidad de solicitar un análisis de los extendidos al citopatólogo y ser capaces de interpretar los resultados citológicos a fin de recomendar un tratamiento adecuado basado en el diagnóstico. Es razonable que el médico que realiza la PAAF fuera también el responsable del manejo a largo plazo del paciente para asegurar la continuidad de su atención. Por otro lado, la realización de la PAAF por el citopatólogo ayuda a éste a interpretar los hallazgos macroscópicos (eg, cantidad y color de líquido en quistes, ubicación, consistencia, sensibilidad y tamaño del nódulo) para combinarlos con el estudio microscópico de los extendidos. Probablemente lo ideal sería que la PAAF de tiroides sea realizada en conjunto por el endocrinólogo y el citopatólogo.

Recomendación N° 58. Selección de los médicos que realicen las PAAF

La PAAF de tiroides debería ser realizada por médicos que:

- Sean expertos en la técnica y realicen punciones aspirativas de tiroides con frecuencia.
- Estén en condiciones de interpretar los resultados citológicos.
- Puedan recomendar un tratamiento adecuado en función de los resultados obtenidos.

6. Aspectos técnicos de la realización de la PAAF

Se recomienda suspender la aspirina u otros agentes que afecten la coagulación durante varios días antes de efectuar el procedimiento. Para realizar una PAAF normalmente se utilizan agujas de calibre 22 a 25 y jeringas de 10 ó 20 ml que pueden o no estar sujetas a un dispositivo tipo “mango de pistola”. La aspiración debería ser lo menos traumática posible. No todos los médicos son partidarios de aplicar anestesia tópica local (lidocaína al 1%). Se recomienda realizar dos pasadas como mínimo en diversas porciones del nódulo para minimizar el error en la toma de la muestra. Generalmente los extendidos se fijan y colorean siguiendo el procedimiento de Papanicolaou. Es indispensable proceder a la fijación inmediata y evitar un secado excesivo de la muestra para preservar los detalles nucleares. También es conveniente usar una coloración rápida como el método de Diff-Quik y examinar los extendidos en el momento de la aspiración para ver si son adecuados para la evaluación citológica. Este método también se usa para diagnóstico. Otros extendidos pueden fijarse en seco y subsecuentemente en alcohol para posterior coloración con los métodos de Papanicolaou o hematoxilina-eosina (excelente para detectar coloide). Cualquier material adicional puede combinarse con el material enjuagado de la aguja y centrifugarse para obtener un bloque de células apto para inclusión en agar. Los tacos celulares pueden proveer información histológica y utilizarse para estudios con coloraciones especiales (eg, inmunohistoquímica). Es importante proteger adecuadamente los extendidos al trasladarlos al laboratorio. Los mismos deberían enviarse al citopatólogo con los detalles

clínicos del paciente, junto con los datos sobre tamaño, ubicación y consistencia del nódulo.

Los nódulos firmes generalmente son sospechosos de carcinoma mientras que los nódulos fluctuantes o blandos sugieren proceso benigno. Al aspirarse líquido de un quiste se debería documentar volumen, color y presencia de sangre, como así también cualquier masa residual que persista luego de la aspiración. En caso de masa residual se debe repetir el procedimiento. La presencia de líquido claro e incoloro suele ser un indicador de quiste paratiroideo o hidatídico, mientras que el líquido amarillento o cetrino es más característico de quiste tiroideo de origen folicular. Es recomendable preservar parte de los fluidos para la determinación bioquímica de PTH y tiroglobulina. Luego de la aspiración se debería aplicar presión local en el punto de punción durante 10 a 15 minutos a fin de minimizar el edema. El paciente puede ser dado de alta con una pequeña venda sobre dicho punto con la recomendación de aplicar hielo ante cualquier molestia.

A menudo la información citológica de una PAAF puede ampliarse enviando el material para citometría de flujo o tinción por inmunoperoxidasa [Sección-3 H8]. A menos que se pruebe lo contrario todo tejido tiroideo presente en ganglio linfático lateral de cuello se considera cáncer de tiroides metastásico (99%).

7. Evaluación citológica

Si no es posible recurrir a un citopatólogo local con experiencia en tiroides, es esencial enviar los extendidos a un experto externo para su análisis. En este caso la telecitopatología es una técnica potencial que en el futuro hará más accesible la consulta de las muestras a distancia.

Recomendación N° 59. Selección del citopatólogo

- El citopatólogo debe tener experiencia en citología tiroidea. Si no es posible recurrir a un citopatólogo local con experiencia en tiroides, los extendidos deberían enviarse a un experto externo para su revisión.
- Los citopatólogos deberían estar dispuestos a analizar los extendidos con el médico del paciente cuando éste se lo requiera.

8. Coloraciones especiales

Las coloraciones especiales pueden resultar útiles en las siguientes situaciones:

- Masa de cuestionable malignidad u origen tiroideo. Usar inmunomarcación para anticuerpos específicos para tiroglobulina, peroxidasa tiroidea (MoAb 47), galectina-3 y CEA. (461-466).
- Ante duda de linfoma usar inmunotipificación de células linfoides de progenie B.
- Carcinoma indiferenciado/anaplásico de tiroides-inmunomarcación para vimentina, P53 y citoqueratina.
- Cáncer medular de tiroides dudoso: inmunomarcación para calcitonina, enolasa neuronal específica, cromogranina y/o somatostatina.

9. Categorías diagnósticas

Algunos citopatólogos consideran que debe haber al menos seis grupos de 10 a 20 células foliculares cada uno en dos extendidos diferentes para confirmar el carácter benigno de una lesión tiroidea (466-468). Un diagnóstico citológico de cáncer puede hacerse con un número menor de células, siempre que se encuentren presentes las características citológicas de malignidad.

Recomendación N° 60. Características citopatológicas

La interpretación de citopatología tiroidea puede ser difícil y desafiante. La cantidad de tejido presente en los extendidos puede depender de la experiencia de quien realiza la PAAF, del método de aspiración (guiada por ecografía versus manual) y del tipo de tejido presente en la lesión (eg, fibrosis, calcificación, necrosis, etc.). La evaluación debería determinar:

- Presencia o ausencia de folículos (microfolículos vs. folículos de tamaño variable)
- Tamaño de las células (uniforme vs. variable)
- Características tintoriales de las células
- Polaridad tisular (sólo en tacos de células)
- Presencia de hendiduras y/o palidez nucleares
- Presencia de nucleolos
- Presencia y tipo de coloide (acuoso y difuso vs. espeso y viscoso)
- Población uniforme de células foliculares u oncócicas (Hürthle)
- Presencia de linfocitos

(a) Lesiones benignas (~ 70% de los casos)

Presentaciones clínicas que sugieren una condición benigna (pero que no necesariamente excluyen la PAAF)

- La aparición súbita de dolor o sensibilidad sugiere hemorragia en un nódulo coloide, adenoma o quiste, o una tiroiditis granulomatosa subaguda (de De Quervain), respectivamente. (La hemorragia en un cáncer también puede presentarse con dolor súbito).
- Síntomas que sugieren hipertiroidismo o tiroiditis autoinmune (de Hashimoto).
- Antecedentes familiares de enfermedad nodular benigna, tiroiditis de Hashimoto u otra enfermedad autoinmune.
- Nódulo de superficie lisa, blando y móvil.
- Multinodularidad (sin nódulo dominante).
- Un nódulo en la línea media sobre el hueso hioides que se moviliza con la protrusión de la lengua es probable que sea un quiste tirogloso.

• Los análisis citológicos y/o de laboratorio que sugieren una afección benigna incluyen:

- Abundante coloide difuso y acuoso
- Macrófagos espumosos
- Quiste o degeneración quística de un nódulo sólido
- Nódulo hiperplásico
- TSH sérica anormal
- Linfocitos y/o valor elevado de TPOAb (sugiere tiroiditis de Hashimoto u ocasionalmente linfoma)

Recomendación N° 61. Para laboratorios y médicos

- Además de la citología de rutina, el laboratorio debería ofrecer coloraciones con inmunoperoxidasa para calcitonina, tiroglobulina, peroxidasa tiroidea o galectina-3 para casos especiales (si es necesario enviando las muestras a otro laboratorio).
- Los laboratorios deberían archivar todos los extendidos y cortes histológicos como reserva para brindar acceso para una segunda opinión que se pueda solicitar.
- Los laboratorios de citopatología deberían usar informes estandarizados de PAAF. La estrategia más simple consta de cuatro categorías diagnósticas: (1) Benigno, (2) Maligno, (3) Indeterminado / Sospechoso, y (4) Insatisfactorio / Inadecuado. Esto ayudaría a establecer comparaciones objetivas entre los resultados de distintos laboratorios.
- Los laboratorios de citopatología deberían compartir con los médicos clínicos los resultados de las punciones citando sus promedios de verdaderos y falsos positivos y negativos.

Recomendación N° 62. Seguimiento de pacientes con enfermedad benigna

- Hay quienes se inclinan por realizar una segunda PAAF varios meses después para confirmar la primera.
- Otros no recomiendan repetirla si el tejido obtenido en la primera fue adecuado, siempre que el tamaño del nódulo no alcance los 2 cm y se haya mantenido estable durante un año de seguimiento. En este caso se recomienda un seguimiento con examen semiológico anual del nódulo y control de su tamaño preferentemente con ecografía. Si esta no está disponible los cambios en el tamaño del nódulo pueden detectarse mediante su medición con cinta y/o regla.
- Se recomienda nueva PAAF para aquellos nódulos clínicamente sospechosos o que se agrandan durante el seguimiento.

Las condiciones benignas incluyen, entre otras, las siguientes:

- bocio simple
- bocio multinodular
- nódulo coloide*
- quiste coloide*
- quiste simple*
- nódulo coloide degenerativo
- tiroiditis de Hashimoto
- nódulo hiperplásico

**Con frecuencia proveen inadecuadas muestras para citología por ser hipocelulares.*

(b) Lesiones malignas (~ 5-10% de los casos)

Existen diversas opiniones respecto a extensión de la cirugía para las lesiones malignas de tiroides. En la mayoría de los centros de Estados Unidos la opción elegida es la tiroidectomía total o casi total practicada por un cirujano experto. En Europa existen otras opiniones (469). El riesgo de complicaciones es menor en cirujanos familiarizados con operaciones de tiroides.

(i) Carcinoma papilar (~ 80% de tumores tiroideos malignos)

Incluye la variante mixta papilar y folicular, y otras como las de células altas y difusa esclerosante (diagnóstico histológico).

Patrones citohistológicos. La presencia de dos o más de las siguientes características morfológicas sugieren carcinoma papilar:

- inclusiones citoplasmáticas intranucleares y núcleos “pálidos” o “en vidrio esmerilado”.
- hendiduras nucleares frecuentes
- núcleos superpuestos
- cuerpos psamomatosos (raros)
- proyecciones papilares con pedículo fibrovascular
- coloide “filamentoso”

(ii) Neoplasias foliculares o a células oncocíticas (Hürthle) (~20% de tumores tiroideos malignos)

Las lesiones de esta categoría muestran evidencia citológica de que pueden ser compatibles con malignidad pero no son diagnósticas (457, 470). Entre los factores que sugieren malignidad se incluyen sexo masculino, nódulo > 3 cm y edad >40 años (470). El diagnóstico definitivo requiere el examen histológico del nódulo para demostrar la presencia de invasión capsular o vascular. En general no se recomienda volver a aspirar ya que ello no suele aportar información útil. Actualmente no existen pruebas genéticas,

histológicas o bioquímicas que se utilicen de rutina para diferenciar lesiones benignas de malignas en esta categoría. Se necesitaría demostrar fehacientemente la existencia de marcadores apropiados que ayuden a distinguir neoplasias tiroideas benignas de malignas en las muestras de PAAF. Varios estudios sugieren que la expresión de peroxidasa tiroidea, determinada por el anticuerpo monoclonal MoAb 47, mejora la especificidad de diagnosticar correctamente lesiones histológicamente benignas con respecto a la PAAF como método aislado (83% vs 55%, inmunodetección de peroxidasa tiroidea vs citología pura, respectivamente) (461, 462). La galectina-3, proteína ligante de beta galactósido, se encuentra frecuente y difusamente expresada en todos los carcinomas tiroideos de origen folicular (eg, carcinomas papilar, folicular, oncocítico y anaplásico) aunque también puede ocurrir en menor cuantía en enfermedades benignas (463-466,471). La mayoría de los cirujanos asigna un valor mínimo a las biopsias intraoperatorias por congelación para diferenciar lesiones benignas de malignas cuando los pacientes tienen neoplasias foliculares u oncocíticas (Hürthle). A veces se realiza una lobectomía inicial seguida en 4 a 12 semanas de una intervención para completar la tiroidectomía si la muestra histológica diferida indica malignidad en base a invasión capsular o vascular. Un estudio reciente sugirió que el pronóstico de pacientes con carcinoma oncocítico (Hürthle) puede predecirse por características histomorfológicas bien definidas (473).

Patrones citohistológicos. Entre las características morfológicas que sugieren carcinoma folicular u oncocítico (Hürthle) se incluyen:

- cantidades mínimas o ausencia de material coloide de fondo
- abundantes células foliculares u oncocíticas (Hürthle)
- microfoliculos

Citología. Las lesiones pueden informarse como:

- “Neoplasia oncocítica (Hürthle)”
- “Sospecha de neoplasia folicular”
- “Neoplasia o lesión folicular”
- “Indeterminada” o “No diagnóstica”

(iii) Carcinoma medular (1-5% de tumores tiroideos malignos)

Debe sospecharse la presencia de este tipo de cáncer de tiroides en pacientes con antecedentes familiares de carcinoma medular o neoplasia endócrina múltiple (MEN) tipo 2 [Sección-3 F].

Las características citohistológicas que sugieren este tipo de cáncer incluyen:

- células fusiformes con núcleos excéntricos
- tinción para calcitonina positiva
- presencia de amiloide
- inclusiones citoplasmáticas intranucleares (frecuentes)

(iv) Carcinoma indiferenciado (anaplásico) (< 1% de tumores tiroideos malignos)

Este tipo de cáncer de tiroides generalmente afecta a pacientes añosos y se presentan como masa tiroidea de crecimiento rápido. Es posible que tales pacientes hayan tenido antecedentes de bocio por muchos años. Es necesario diferenciar entre carcinoma indiferenciado (anaplásico), cuyas posibilidades de tratamiento son muy limitadas, y linfoma tiroideo para el cual hay tratamiento disponible.

Las características citohistológicas que sugieren este tipo de carcinoma incluyen:

- pleomorfismo celular extremo
- células multinucleadas
- células gigantes

(v) Linfoma tiroideo (raro)

Sugerido por una masa de crecimiento rápido en un paciente añoso frecuentemente con tiroiditis de Hashimoto.

Las características citohistológicas que sugieren este tipo de cáncer incluyen:

- patrón monomórfico de células linfoides
- inmunotipificación positiva de células linfoides de progenie B

10. PAAF inadecuada o insuficiente (~ 5 a 15 %)

No se puede establecer un diagnóstico citológico con un manejo y preparación deficientes de la muestra o cuando el material obtenido durante la punción es inadecuado. La recolección insuficiente de material para diagnóstico suele producirse por inexperiencia del médico que realiza el procedimiento, número insuficiente de aspiraciones durante el mismo, tamaño de la masa, o presencia de una lesión quística necrótica o fibrótica. Una muestra adecuada de PAAF se define como aquella que contiene seis grupos de entre 10 y 20 células foliculares cada uno en dos extendidos diferentes (467). Ante la presencia de nódulos pequeños preocupantes, la PAAF debería repetirse bajo guía ecográfica, con lo que se reduce la incidencia de muestras inadecuadas de 15-20% a 3-4% (215, 450, 451, 474, 475). La PAAF guiada por ecografía también está indicada en nódulos no palpables de 1 a 1,5 cm, nódulos quísticos (complejos) para asegurar la obtención de muestra del componente sólido, y en nódulos posteriores, retroesternales altos o difíciles de palpar especialmente en pacientes obesos, con desarrollo muscular o componente óseo corporal importante (215, 450, 451). Los nódulos dominantes de un bocio multinodular deben someterse a PAAF guiada por ecografía a fin de focalizar el procedimiento en el/los los nódulo/s clínicamente sospechoso/s.

Recomendación N° 63. Pacientes con PAAF inadecuada o no diagnóstica

- Repetir la PAAF en nódulos pequeños habitualmente proporciona material celular adecuado para el diagnóstico. Preferentemente, la segunda PAAF debería ser guiada por ecografía lo cual reduce la incidencia de muestras inadecuadas de 15-20% a 3-4%.
- La PAAF guiada por ecografía también está indicada en nódulos no palpables de 1 a 1,5 cm, nódulos quísticos (complejos) para asegurar la obtención de muestras del componente sólido, y en nódulos posteriores, retroesternales altos o >1 cm que sean difícil de palpar, especialmente en pacientes obesos, con desarrollo muscular o con componente óseo corporal importante. La PAAF bajo guía ecográfica debería usarse ante nódulo/s principal/es (eg, dominante/s) en bocios multinodulares.

I.- Screening de Hipotiroidismo Congénito

La prevalencia del hipotiroidismo congénito primario (HC) (aproximadamente 1:3500 nacimientos) es mayor que la del hipotiroidismo central (hipotalámico o hipofisario) (aproximadamente 1:100.000). La prevalencia es más elevada en ciertos grupos étnicos y en las regiones del mundo con deficiencia de yodo (476, 477). Durante los últimos 25 años, el screening para el hipotiroidismo congénito se ha realizado en gotas de sangre entera, sobre papel de filtro, utilizando T4T o TSH como ensayos primarios. Esto constituye una práctica establecida en muchos países, como parte de los programas de pesquisa para una diversidad de patologías genéticas. Con el propósito de maximizar su eficiencia, estos programas con frecuencia se centralizan o regionalizan y operan según pautas estrictas con requerimientos de autorización para su concreción. En 1993 la American Academy of Pediatrics y la European Society for Pediatric Endocrinology publicaron recomendaciones para el screening de HC que fueron actualizadas en 1999 (478-480).

Los laboratorios participantes privados o estatales, deben contar con programas de aseguramiento de calidad aceptables y someterse a evaluaciones de dicha calidad regularmente.

La disgenesia tiroidea provocada por aplasia, hipoplasia o tiroides ectópica es la causa más común de hipotiroidismo congénito y representa aproximadamente el 85% de los casos. (12). Varios centros de screening han informado mutaciones inactivantes en el receptor de TSH, pero, aún se desconoce su prevalencia real. El fenotipo asociado con la resistencia a la TSH es variable pero parece dividirse en dos tipos: parcial y severo. Los individuos con elevación de la TSH debido a una resistencia parcial a la TSH son usualmente eutiroides, presentan T4T normal y en general no necesitan tratamiento de reemplazo con L-T4. En síndromes de resistencia a las hormonas tiroideas, existe cierta evidencia respecto a la secreción relativa de isoformas de TSH con aumento en la bioactividad [Sección-3 C4(g)ii] (244). Otra causa poco frecuente de HC, son mutaciones de los genes que codifican para los factores de transcripción tiroideos, TTF-1, TTF-2 y PAX-8. Estos factores desempeñan un rol fundamental en el control de la morfogénesis, diferenciación y desarrollo normal de la tiroides fetal, y se unen a los promotores de Tg y TPO para regular la producción de hormona tiroidea.

Recomendación N° 64. Laboratorios que realizan screening neonatal para el hipotiroidismo congénito

- Solamente los laboratorios con experiencia en inmunoensayos automatizados, tecnología informática, y personal adecuadamente capacitado deberían manejar muestras en grandes volúmenes para screening de hipotiroidismo congénito.

La interpretación correcta de la función tiroidea del recién nacido, requiere la comprensión de la interacción entre la madre y el feto. El yodo, la hormona liberadora de tirotrófina o TRH, los fármacos antitiroideos y los anticuerpos anti IgG atraviesan la placenta con facilidad. No hay pasaje transplacentario de TSH ni de triyodotironina. Por el contrario, en oposición a lo que se creía anteriormente, en la actualidad se reconoce que la tiroxina, atraviesa la placenta en cantidades suficientes como para proteger al feto hipotiroideo de las consecuencias de la deficiencia de tiroxina, hasta su detección mediante programas de screening neonatal (481). Inmediatamente después del parto se produce un pico de TSH en el neonato durante las primeras 24 horas, supuestamente en respuesta a la exposición al frío. En el recién nacido a término, durante las primeras 48 horas de vida, la tiroxina circulante duplica o triplica su nivel en comparación con los niveles adultos, luego se estabiliza y retorna a los niveles observados en el cordón en 5 –6 días. Este patrón de respuesta, en el niño prematuro es menos marcado y se relaciona inversamente con la inmadurez. Las concentraciones de T4 circulante y de TSH permanecen sobre los niveles de los adultos durante la lactancia y disminuyen en la niñez hasta alcanzar las concentraciones de los adultos después de la pubertad (Tabla 3) (42).

1. Criterios que deberían reunir los laboratorios de screening de HC

Solamente los laboratorios con experiencia en inmunoensayos automatizados, que cuenten con tecnología informática y suficiente personal adecuadamente capacitado, deberían realizar screening de hipotiroidismo congénito. Los programas de screening neonatal se basan en grandes números de muestras provenientes de una región relativamente amplia. La logística del transporte de las muestras (es decir, el tiempo de envío postal, las demoras en enviar el material a las salas de maternidad y las demoras en actuar después que se emite el resultado), son factores de tiempo limitantes más significativos que la velocidad de los procedimientos analíticos, para identificar a recién nacidos con riesgo de HC. El screening debería realizarse diariamente para que los resultados estén inmediatamente disponibles y se pueda actuar. El tratamiento debería comenzar lo antes posible, preferentemente dentro de las dos primeras semanas de vida.

El número mínimo de recién nacidos que deberían ser sometidos a screening por año, en un laboratorio especializado es cuestionable, en cuanto a que se alcanza una mayor eficiencia analítica cuando se encuentra un número razonable de casos positivos y, una mayor costo-eficiencia a partir de mayores volúmenes de muestras. El programa de screening debería asegurar que se realice un seguimiento de los neonatos con screening positivo y disponer de mecanismos de accesibilidad a un diagnóstico experimentado. Los laboratorios deberían controlar cuidadosamente la proporción de resultados falsos negativos y positivos y se debería contar con un endocrinólogo pediatra para los controles de seguimiento que aseguren que se ha realizado un diagnóstico y un tratamiento correctos.

2. Estrategias de Screening

Los métodos de screening deberían ser de bajo costo y fáciles de realizar.

La mayoría de los programas de screening para el hipotiroidismo congénito se basan en métodos que eluyen gotas de sangre sobre papel de filtro, extraídas del talón de los recién nacidos. Los reactivos para la determinación de hormonas tiroideas en el eluido generalmente requieren ciertas modificaciones para ser usados en diferentes autoanalizadores para inmunoensayos. Hay dos formas de realizar el screening de función tiroidea en muestras de gotas de sangre, la determinación de T4T o de TSH, como ensayos primarios. Con cualquiera de las dos, los resultados se deberían interpretar utilizando rangos de referencia ajustados para la edad (ver Tabla 3 y Recomendación N°3).

Recomendación N° 65. Para los laboratorios que realizan ensayos tiroideos en neonatos e infantes

- Los resultados de los ensayos tiroideos en neonatos e infantes se deben informar con intervalos de referencia específicos para la edad gestacional y para la edad cronológica, respectivamente.
- Cada laboratorio debería establecer sus propios niveles de corte para el método utilizado.

(a) T4T como ensayo primario con determinación confirmatoria de TSH

La mayoría de los programas norteamericanos de screening utilizan un ensayo inicial de T4T, con determinaciones de TSH confirmatorias para muestras con niveles bajos de T4T (habitualmente por debajo del percentilo 10°). Históricamente, este sistema se adoptó porque el tiempo de procesamiento de los primeros ensayos de T4T era marcadamente más corto que el de TSH, los métodos para T4T eran más confiables, el screening se realizaba en un período neonatal más temprano (habitualmente en el primer o segundo día de vida) y el costo de los ensayos de T4T era menor que los de TSH. Aunque se podría determinar T4L, esta determinación no se emplea en general para screening debido a las limitaciones en su sensibilidad derivada del tamaño pequeño de las muestras que representa la gota de sangre sobre el papel de filtro, y a la elevada dilución que resulta del procedimiento de elución. (482). El sistema de screening con T4T tiene ciertas ventajas, en particular en los programas donde las muestras se deben extraer en los primeros días del período neonatal. La T4T además está menos influenciada por el aumento de TSH que se produce después de cortar el cordón umbilical y que dura las primeras 24 horas. Ambos factores sugieren que el screening con T4T dará menos resultados falsos positivos cuando es necesario efectuar una pesquisa temprana (antes de las 24 horas). Por otra parte, la T4T puede detectar los casos menos frecuentes de hipotiroidismo central, no detectados con TSH como determinación primaria.

Las desventajas de un screening inicial con T4T consisten en la dificultad de establecer un valor de corte para T4T lo suficientemente bajo como para minimizar los falsos positivos, pero lo suficientemente alto como para detectar hipotiroidismo congénito en los recién nacidos con glándulas tiroideas ectópicas que tuvieran concentraciones de T4T por sobre el percentilo 10°. Por otra parte, es posible observar valores bajos de T4T y valores normales de TSH en una serie de otras situaciones: (a) hipotiroidismo hipotálamo-hipofisario (b) deficiencia de la globulina ligante de tiroxina (TBG) (c) prematuridad (d) enfermedad subyacente o (e) pico de TSH retrasado. En programas donde se llevó a cabo el seguimiento de recién nacidos con hipotiroidismo secundario o terciario, sólo se detectaron 8 casos de 19 mediante screening con T4T, siete se diagnosticaron clínicamente antes del screening y a cuatro no se les realizó seguimiento aunque tenían T4T baja (483-485). La deficiencia de TBG no tiene consecuencias clínicas de manera tal que el tratamiento de esta condición está contraindicado. El screening con T4T también puede ser útil en los infantes con muy bajo peso al nacer (< 1500g) en los que la TSH es normal en el momento habitual de realizar el screening y sólo comienza a elevarse semanas después. Sin embargo, se observan valores más bajos de T4T en los infantes prematuros que en aquellos nacidos a término.

(b) Determinación Primaria de TSH

Europa y gran parte del resto del mundo han adoptado la determinación de TSH como ensayo primario para el diagnóstico de hipotiroidismo congénito. El screening primario con TSH tiene ventajas sobre el screening con T4T en áreas con deficiencia de yodo, debida que los neonatos son más susceptibles a los efectos de la deficiencia de yodo que los adultos, y estos infantes tienen una mayor frecuencia de niveles elevados de TSH. El screening con TSH permite además evaluar el aporte de yodo en la población de recién nacidos, teniendo en cuenta que muchos países tienen aún deficiencia de yodo (486). En la actualidad hay muy poca diferencia de costos entre los reactivos para TSH y para T4.

El nivel de corte de TSH usado para recitar al paciente varía con los distintos programas. Algunos programas adoptan un método en dos etapas (487). Si el infante tiene más de 48 horas de vida y la TSH en la gota de sangre es <10 mUI/L de sangre entera, no se realiza seguimiento. Si la TSH está entre 10 y 20 mUI/L de sangre entera, se le extrae una segunda gota de sangre. La TSH es normal en la mayoría de estas segundas muestras. Sin embargo, si la TSH es >20 mUI/L de sangre entera, el infante es recitado para ser evaluado por un pediatra, y se le realizan otros ensayos de función tiroidea en una muestra de suero. Para muestras extraídas antes de las 48 horas, se deberían usar valores de corte apropiados (482). Este sistema asegura que puedan pesquisarse y seguirse las formas más leves de hipotiroidismo, caracterizadas sólo por un aumento ligero de la TSH, aunque esto produce un número mayor de falsos positivos, que deben ser seguidos a través del sistema. Aunque la mayoría de los resultados por encima de 20 mUI/L se deben a HC, es importante descartar la ingestión materna de fármacos antitiroideos o el uso de soluciones antisépticas con yodo en el parto como causa de aumentos transitorios de TSH.

Recomendación N° 66. Prematuros y alta hospitalaria temprana de neonatos

El aumento de TSH que sigue al corte del cordón umbilical y se mantiene durante las siguientes 24 horas se puede demorar en los prematuros, y por otra parte, puede haber más resultados falsos positivos de TSH cuando se evalúa a los recién nacidos dentro de las primeras 24 horas de vida

- Cuando se usa TSH para evaluar a los prematuros, se recomienda extraer una segunda muestra entre la segunda y la cuarta semana de vida, ya que en algunos casos hay una demora en el aumento de TSH, quizás debida a la inmadurez del mecanismo de autorregulación hipotálamo-hipofiso-tiroideo
- La T4T como ensayo primario puede ofrecer ventajas para los recién nacidos de muy bajo peso al nacer o cuando el screening sólo se puede realizar dentro de las primeras 24 horas de vida.

3. Ensayos de TSH en la Gota de Sangre

Las determinaciones de TSH realizadas en muestras de gotas de sangre se informan en unidades de suero, relacionando los calibradores de sangre entera con los valores séricos como en los programas

norteamericanos, o en unidades de sangre entera, como en los programas europeos. Los valores absolutos de TSH son significativamente más bajos con el segundo método porque parte del volumen de la gota está ocupado por los eritrocitos. Esta diferencia al realizar los informes ha creado confusión en el pasado y aún no se ha resuelto completamente. Es necesario aumentar las unidades de sangre entera entre 30 y 50% para aproximarlas a las unidades séricas.

Recomendación N° 67. Países con deficiencia de yodo

- Se recomienda la TSH como ensayo primario en vez de la T4T con TSH confirmatoria en los países que tienen deficiencia leve o moderada de yodo.

Los ensayos para el screening del HC requieren que se determine la TSH en pequeñas gotas de sangre de entre 3 y 4 mm de diámetro. Los métodos de “tercera generación” IMA para determinar TSH con sensibilidad funcional de 0,02 mUI/L son adecuados para este objetivo [Sección-2 C]. Sin embargo, no todos los fabricantes han desarrollado ensayos de TSH para gota de sangre, ya que se lo considera un mercado especializado y limitado. Los ensayos en microplacas que utilizan señales no isotópicas, como el de fluorescencia de tiempo resuelto, son adecuados para muestras de gotas de sangre y su uso se encuentra generalizado. Una ventaja de estos sistemas es que a medida que se realiza la elución de la gota de sangre en microplaca, la TSH de la muestra está disponible para unirse al anticuerpo monoclonal que recubre la pared del pocillo de la placa.

No obstante otros sistemas automáticos que no utilizan microplacas, pueden ser utilizados con éxito para los ensayos de TSH en gotas de sangre. Estos en general, requieren efectuar la elución de la TSH de la gota de sangre en forma separada y medir una muestra del eluido en un autoanalizador para inmunoensayos. Algunos de estos sistemas tienen la ventaja de proporcionar resultados a los 20 minutos, con una velocidad de procesamiento de unos 180 resultados por hora. Estos sistemas además incorporan la identificación de muestras positivas, y de esta manera aumentan la seguridad de la identificación correcta de un resultado elevado. Se ha diseñado la perforación automática del papel de filtro que contiene la gota de sangre para que se puedan leer los códigos de barras ubicados en los tubos de elución o en las microplacas, antes de la perforación. El mismo número de identificación luego se imprime en la tarjeta de papel de filtro del paciente. El autoanalizador lee el mismo código de barras en la etiqueta de los tubos de elución y los resultados se imprimen o se cargan en la computadora contra el número exclusivo de identificación, y la información demográfica del paciente si se han ingresado estos datos. Para los laboratorios sin automatización, son aún adecuados los ensayos de TSH que utilizan tubos recubiertos con el anticuerpo pero no son compatibles con muestras a gran escala.

Recomendación N° 68. Criterios de eficacia para el screening de recién nacidos con TSH en gota de sangre

- La sensibilidad funcional del ensayo de TSH debería ser por lo menos de 1,0 mUI/L.
- El coeficiente de variación inter-ensayo debería ser idealmente <10% y no mayor de 20%.
- Las muestras de control de calidad interno deberían cubrir el rango informable y se deberían incluir en cada corrida.
- Al menos una de las muestras de control de calidad debería provenir de un fabricante que no sea el mismo responsable del reactivo de TSH utilizado.
- Los estándares deberían prepararse con sangre entera, es decir ser idénticos a las muestras ensayadas.
- Usar el mismo tipo de papel de filtro para las muestras, estándares y controles.
- Es esencial la participación en programas de control de calidad externos Nacionales e Internacionales. (ver Apéndice B).

4. Recolección de la Muestra

La técnica para la recolección de muestras de sangre del talón sobre papel de filtro es de máxima importancia. Sólo se debe utilizar papel de filtro que cumpla con las normas de NCCLS [“Blood on Filter

Paper For Neonatal Screening Programs” Approved Standard – Tercera edición. LA4-A3, Vol 17 N° 16, octubre 1997. National Committee for Clinical Laboratory Standards] (488). Esto requiere un programa continuo de capacitación, protocolos bien redactados y que se establezcan criterios para una recolección adecuada de las muestras.

Recomendación N° 69. Valores de corte de TSH para el screening de neonatos de más de 48 horas de vida

Se debería poder identificar si los valores informados corresponden a unidades de sangre entera o de suero. Es necesario aumentar la concentración expresada en unidades de sangre entera entre 30 y 50% para aproximarlas a las expresadas en unidades séricas.

- TSH en gota de sangre inicial < 10 mUI/L de sangre entera: ninguna acción posterior
- TSH en gota de sangre inicial 10-20 mUI/L de sangre entera: repetir la determinación en una segunda gota de sangre.
- TSH en gota de sangre inicial >20 mUI/L de sangre entera: recitar al infante para su evaluación por el endocrinólogo pediatra.

La decisión con respecto a cuándo obtener la muestra está determinada por los requisitos de otros protocolos de screening y depende de si la extracción se realiza en el hospital o en la casa. En Europa, las muestras se extraen entre las 48 horas y los 8 días después del nacimiento, según la práctica de cada lugar. En muchos programas de screening en Estados Unidos, las presiones económicas que inducen a un alta hospitalaria temprana, determinan que las muestras se extraigan antes de las 48 horas. El momento de recolección de la muestra impacta más en la estrategia de TSH como ensayo primario que en la de T4T porque se produce un aumento de TSH en el momento en que se corta el cordón umbilical. En la mayoría de los recién nacidos el aumento en TSH retorna a los niveles normales dentro de las 24 horas, pero en algunos, la TSH puede permanecer elevada hasta 3 días. Para los prematuros, se recomienda extraer una segunda muestra 2 a 4 semanas después de la primera, ya que en algunos casos hay una demora en la elevación de TSH, quizás debida a la inmadurez del mecanismo de autorregulación hipotálamo-hipofiso tiroideo (489).

5. Exámenes confirmatorios

Las mediciones realizadas en eluidos de papel de filtro no son diagnósticas sino que tienen valor de screening solamente y los resultados anormales se deben confirmar con métodos cuantitativos de rutina. Las muestras de sangre para ensayos confirmatorios se deben extraer por punción venosa. En algunos países se recoge al mismo tiempo una muestra de sangre de la madre para evaluar la función tiroidea materna. Específicamente, los anticuerpos bloqueantes del receptor de TSH (TBAb/TSBAb) presentes en las madres con hipotiroidismo (aún cuando estén recibiendo un tratamiento de reemplazo adecuado con L-T4) pueden provocar hipotiroidismo transitorio en los recién nacidos (en 1:180.000 neonatos) (301, 490).

Recomendación N° 70. Determinaciones en eluidos de papel de filtro

- Las determinaciones que se realizan en eluidos de papel de filtro no son diagnósticas. Los valores apenas son semi cuantitativos y ayudan a identificar individuos que probablemente presenten hipotiroidismo congénito. Todo resultado anormal en el screening se debe confirmar con ensayos tiroideos cuantitativos en suero.

Algunos programas en Europa proponen el seguimiento con T4L, TSH y TPOAb en la madre y en el recién nacido. Es importante observar que los niveles de T4L y T4T son más altos en el período neonatal, por lo cual, los resultados dudosos en infantes con hipotiroidismo leve se deberían interpretar usando intervalos de referencia relacionados con la edad para cada ensayo específico. (Tabla 3).

El propósito de los programas de screening de HC es detectar esta patología y comenzar el tratamiento de reemplazo con hormona tiroidea tan pronto como sea posible (dentro de los 14 días). No obstante, deberían

realizarse además ensayos adicionales para determinar la etiología del HC con el propósito de determinar si es transitorio, permanente o debido a causas genéticas (que requieren un asesoramiento adecuado) (Tabla 11). Algunos de estos ensayos necesitan hacerse antes de que se inicie el tratamiento de reemplazo con L-T4, mientras que otros se pueden realizar durante el tratamiento. En el caso del hipotiroidismo transitorio debido a pasaje transplacentario de TBAb/TSBAb de la madre al niño se indica tratamiento con L-T4 ya que la presencia de anticuerpos bloqueantes en el neonato inhibe la acción de la TSH y resulta en una concentración reducida de T4L (301, 491). Una vez que los anticuerpos se hayan degradado en un período entre tres y seis meses, dependiendo de su concentración, el tratamiento con L-T4 puede ser discontinuado gradualmente. En los embarazos subsiguientes se debería evaluar el estado de los anticuerpos tiroideos de la madre, ya que estos anticuerpos pueden persistir por muchos años (492).

En muchos casos, en el momento del diagnóstico de HC, es imposible determinar si el hipotiroidismo es permanente o transitorio. Algunos indicadores asociados con patologías transitorias incluyen un nivel de TSH por debajo de 100 mUI/L, sexo masculino, pseudohipoparatiroidismo, nacimiento prematuro, exposición al yodo o administración de dopamina (484). En estos casos es mejor manejar al paciente como si tuviera hipotiroidismo permanente (493). Si el diagnóstico no se ha podido establecer hasta los 2 años de edad, se debe discontinuar el tratamiento con L-T4 durante un mes y hacer controles con determinaciones seriadas de T4L y TSH.

Recomendación N° 71. Ensayos confirmatorios para resultados de screening (T4T o TSH) anormales

- Las muestras de sangre del neonato para confirmar un resultado positivo se deberían extraer por punción venosa.
- Algunos programas en Europa proponen ensayos de seguimiento sólo para el infante y en algunos casos también se investiga el estado tiroideo de la madre utilizando determinaciones de T4L, TSH y TPOAb.
- Verificar la presencia de anticuerpos bloqueantes del receptor de TSH en la madre.
- Usar métodos e intervalos de referencia específicos para la edad para T4T y TSH.

6. Ensayos para conocer la Etiología de Hipotiroidismo Congénito

La Tabla 11 muestra los ensayos que se pueden utilizar para establecer el diagnóstico de HC e investigar su etiología. La solicitud de dichos ensayos es responsabilidad del endocrinólogo pediatra y no del programa de screening. La centellografía tiroidea es útil para documentar la presencia de cualquier tejido tiroideo presente y su localización. Las determinaciones de tiroglobulina sérica son más sensibles que la centellografía para la detección de tejido tiroideo residual funcionante y pueden ser normales en casos donde la centellografía no demuestre captación del trazador utilizado. La presencia de glándula tiroidea se determina mejor por ecografía la cual puede realizarse después del inicio del tratamiento. La centellografía con I¹²³ no está disponible en todos los países. Es posible no obtener captación en la centellografía y observar claramente tejido tiroideo en la ecografía. En estos casos, los ensayos deberían dirigirse hacia la búsqueda de un error congénito en la síntesis de T4 (~ 10% de los casos) o a una causa transitoria como los anticuerpos bloqueantes del receptor de TSH adquiridos por pasaje transplacentario (301, 491).

Una respuesta >15% en una prueba de descarga de perclorato sugiere un trastorno congénito del metabolismo. Los laboratorios especializados ofrecen ensayos que incluyen determinación de yoduria, ensayos para mutaciones en un gen específico como el co-transportador sodio/yodo, TPO o tiroglobulina (494). Con mayor frecuencia, pueden ocurrir defectos en la oxidación y organificación del yoduro y defectos de acoplamiento resultantes de una mutación en el gen de TPO. Las mutaciones en el gen de tiroglobulina causan síntesis anormal de tiroglobulina que pueden generar un defecto en la proteólisis y en la secreción de la T4. Las mutaciones en los genes de las deiodinasas provocan defectos en las mismas.

Recomendación N° 72. Detección de hipotiroidismo congénito transitorio (HC)

Debido a que el HC puede ser transitorio como resultado del pasaje transplacentario de los anticuerpos bloqueantes del receptor de TSH, se recomienda que el diagnóstico se vuelva a evaluar en todos los casos a los 2 años de edad.

- (c) A los 2 años de edad se debería obtener una muestra de sangre para determinaciones basales de T4L y TSH. Discontinuar el tratamiento con L-T4 y volver a evaluar la T4L y la TSH después de 2 semanas. Una tercera evaluación debería efectuarse después de 3 semanas. Prácticamente el 100% de los niños con HC verdadero presentan valores elevados de TSH, después de 2 semanas de la interrupción del tratamiento.

Tabla 11. Procedimientos Diagnósticos para la Evaluación del Hipotiroidismo Congénito (HC)

Para establecer el diagnóstico:

• Recién nacido:	TSH T4L	• Madre:	TSH T4L TPOAb
-------------------------	------------	-----------------	---------------------

Para establecer la etiología:

- Recién nacido:**
 - Determinar el tamaño y la posición de la glándula tiroides mediante:
 - Ecografía
 - Centellografía – con Tc ^{99m} o con I¹²³
 - Estudios funcionales:
 - Captación de I¹²³
 - Tiroglobulina sérica (Tg)
 - Sospecha de error congénito en la síntesis de T4:
 - Captación de I¹²³ y prueba de descarga de perclorato
 - Sospecha de exposición o deficiencia de yodo:
 - Determinación de yodo urinario
- Madre:**
 - Presencia de enfermedad autoinmune:
 - Anticuerpos anti- receptor de TSH (TRAb)
 - (si están presentes en la madre, determinarlos en el recién nacido)

7. Seguimiento a Largo plazo de Pacientes con Hipotiroidismo Congénito

La mayoría de los infantes y niños con HC tienen un feed-back hipotálamo-hipofiso-tiroideo normal aunque tienen umbrales más elevados de T4 y TSH (Tabla 3) (43). Los recién nacidos y los niños con diagnóstico de hipotiroidismo congénito deberían evaluarse con frecuencia en los primeros dos años de vida utilizando TSH como determinación primaria y T4L como parámetro secundario, empleando intervalos de referencia adecuados para la edad (Tabla 3) (40). En Estados Unidos, la dosis de reemplazo con L-T4 se ajusta para llevar la TSH por debajo de 20 mUI/L y producir un nivel de T4 circulante en la mitad superior del rango de referencia (>10 µg/dl/129 nmol/L) dentro de las dos primeras semanas después de iniciado el tratamiento. Los recién nacidos generalmente se mantienen con una dosis de L-T4 de 10-15 µg /kg de peso corporal/día con control de TSH y T4 cada uno o dos meses. En Europa, se utiliza una dosis única de L-T4 de 50 µ/día y las determinaciones de T4 y TSH se realizan después de 2 semanas, y luego mensualmente si es posible. La experiencia ha demostrado que con estas dosis, el tratamiento no necesita

ajuste durante los primeros dos años. Los cambios frecuentes de dosis con el objeto de mantener una dosis máxima por kilo de peso corporal pueden provocar una sobredosificación (493).

Una minoría de infantes tratados por HC pareciera presentar una resistencia hipofisaria variable a la hormona tiroidea, con valores de TSH relativamente altos para su concentración de T4L. Aparentemente, esta resistencia mejora con la edad (43). En casos poco frecuentes, el hipotiroidismo transitorio puede derivar del pasaje transplacentario de anticuerpos bloqueantes del receptor de TSH (282, 301). Se recomienda la reevaluación del diagnóstico de HC en todos los casos después de los 2 años de edad. Después que se determinan los niveles basales de T4L y TSH, se discontinúa el tratamiento con L-T4 y se vuelve a evaluar la T4L y la TSH después de dos semanas y una tercera vez después de tres semanas. Prácticamente el 100% de los niños con HC verdadero presentan un claro aumento de TSH después de 2 semanas de la interrupción del tratamiento.

8. Casos no Detectados

Ningún ensayo bioquímico proporciona el 100% de exactitud diagnóstica y técnica. Un estudio en los que el screening se realizó después de las dos semanas de vida reveló que no se detectó el 7% de los casos de HC cuando se utilizó T4T como estrategia inicial ni el 3% de los casos con las determinaciones de TSH como estrategia primaria. Se necesitan recomendaciones para manejarse con las implicancias clínicas, económicas y legales de los resultados de screening falsos negativos, y en este sentido considerar si fuera conveniente realizar un segundo control obligatorio a las 2 semanas como se hace en algunos programas.

Recomendación N° 73. Tratamiento y seguimiento de recién nacidos con hipotiroidismo congénito

- En Europa, se utiliza una dosis única de L-T4 de 50 µg/día para minimizar el riesgo de sobretratamiento que puede ocurrir con frecuentes cambios de dosis.
- En EE.UU., habitualmente se inicia el tratamiento con L-T4 con dosis de 10-15 µg/kg/día. El objetivo es elevar el nivel de T4 circulante a más de 10 µg/dl al final de la primera semana.
- Durante el primer año de vida, la T4T generalmente se mantiene en la mitad superior del rango de referencia normal (objetivo terapéutico 10-16 µg/dl/ 127-203 nmol/L) y, si se utiliza T4L, los objetivos terapéuticos están entre 1,4 y a 2,3 ng/dl (18 y 30 pmol/L) dependiendo del rango de referencia (Tabla 3).
- Los recién nacidos y los niños con diagnóstico de hipotiroidismo congénito se deberían controlar con frecuencia en los primeros dos años de vida utilizando TSH como determinación primaria y T4L como ensayo secundario, empleando estándares apropiados para la edad.
- Se debería realizar un control cada 1-2 meses durante el primer año de vida, cada 1-3 meses durante el segundo y tercer año y cada 3-6 meses hasta que se complete el crecimiento.
- Si los niveles de T4 circulante se mantienen persistentemente bajos y la TSH se mantiene elevada a pesar de las dosis de reemplazo con L-T4 progresivamente más altas, es importante eliminar primero la posibilidad de falta de cumplimiento con el tratamiento.
- La causa más frecuente de falta de respuesta al tratamiento de reemplazo, ha sido la interferencia en la absorción por compuestos a base de soja. No se debería administrar L-T4 en combinación con ninguna sustancia a base de soja o con medicamentos que contengan hierro.

9. Garantía de Calidad

Todos los programas de screening deberían contar con un sistema continuo de auditoría y publicar un informe anual del resultado de esa auditoría. De esta forma, se podría realizar una evaluación de cada aspecto del screening en relación con patrones de calidad acordados nacionalmente. Aunque en general los laboratorios cumplen con los estándares de calidad ya que participan rutinariamente en programas de control de calidad, las fases pre-y post-analíticas del screening son las que habitualmente reciben menos atención. Los programas de control de calidad deberían contemplar cada una de las siguientes fases:

- *Preanalítica*

- capacitación del personal que realiza la recolección de las muestras

- conservación y transporte oportuno de los papeles de filtro al laboratorio
- relacionar la identificación de la muestra en el papel de filtro con el resultado analítico
- *Analítica*
 - mantenimiento y servicio de los equipos
 - control de calidad interno de los resultados obtenidos en el papel de filtro
 - participación en programas de control de calidad nacionales e internacionales
- *Post-analítica*
 - coordinación del seguimiento de los resultados anormales
 - ensayos de confirmación cuando corresponda
 - conservación y archivo de las muestras para ensayos posteriores

10. Informe Anual

El informe anual debería incluir los aspectos resaltados en la auditoría y mostrar un panorama exhaustivo del screening del HC durante los doce meses previos. El informe debería evaluar la distribución de concentraciones altas de TSH en gotas de sangre, y contar con un sistema para reportar todos los casos de HC verdadero y registrar los casos de aumentos transitorios de TSH. El sistema también debería informar acerca de los casos no detectados. Un programa eficiente de screening depende de una estrecha colaboración entre el laboratorio que lo realiza, los pediatras, los endocrinólogos y todos los que participan en el proceso.

Recomendación N° 74. Para los médicos

- Repetir los ensayos cuando el cuadro clínico no concuerde con los resultados del de laboratorio.
- Existen errores potenciales siempre presentes en el screening a los que ningún laboratorio es inmune.
- Mantener un alto grado de vigilancia. A pesar de adoptar todas las medidas de seguridad posibles y de contar con sistemas automatizados, a veces los programas de screening no pueden detectar a niños con hipotiroidismo congénito. No es conveniente quedarse tranquilo con un falso sentido de seguridad por un informe de laboratorio que presenta valores de función tiroidea normal.

Sección 4. Importancia de la colaboración entre el laboratorio y los médicos

Los médicos necesitan el respaldo de un laboratorio de alta calidad para un diagnóstico eficiente y un manejo costo-efectivo de los pacientes con problemas tiroideos. Los laboratorios deben ofrecer métodos analíticos que cumplan con ambas cualidades, pero a veces resulta difícil conciliarlas. La costo-efectividad y la calidad en la atención, requieren que el laboratorio satisfaga no sólo las necesidades de la mayoría, sino también las de grupos reducidos de pacientes con problemas tiroideos inusuales que desafían la exactitud diagnóstica de los diferentes ensayos tiroideos disponibles. La mayoría de los estudios sobre “costo-efectividad” no tienen en cuenta los costos humanos y financieros resultantes de un manejo inadecuado, la duplicación superflua de esfuerzos ni el chequeo innecesario de pacientes con una presentación inusual de la enfermedad tiroidea. Estas presentaciones atípicas, llevan a un gasto de laboratorio desproporcionadamente grande para arribar a un diagnóstico correcto (191). Entre estas presentaciones inusuales se incluyen: alteraciones en la proteínas transportadoras que afectan los ensayos de estimación de Tiroxina libre (T4L), presencia de autoanticuerpos anti-Tiroglobulina (TgAb) que interfieren con las determinaciones de Tg sérica, medicamentos que interfieren con el metabolismo *in vivo* e *in vitro* de las hormonas tiroideas, y formas severas de NTI que tienen innumerables efectos sobre los resultados de los ensayos tiroideos.

Recomendación N° 75. Para los laboratorios y los médicos

- Es fundamental que los profesionales del laboratorio clínico colaboren activamente con los médicos usando todas las herramientas disponibles para seleccionar los ensayos tiroideos más adecuados para los pacientes en cuestión.
- Una colaboración activa entre el laboratorio y el médico garantiza que ensayos de alta calidad y al mismo tiempo costo-efectivos, se realicen en una secuencia lógica para evaluar las presentaciones inusuales de la enfermedad tiroidea, e investigar los resultados discordantes.

Es fundamental que los profesionales del laboratorio clínico colaboren activamente con los médicos a fin de optimizar los ensayos tiroideos en función de los pacientes en cuestión. Por ejemplo, si el laboratorio trabaja principalmente con pacientes ambulatorios el efecto de las NTI sobre la determinación de T4L no es tan importante.

Por el contrario, es muy importante excluir en forma precisa una disfunción tiroidea en pacientes hospitalizados. Ciertos medicamentos y otros interferentes pueden afectar más del 10% de los resultados de laboratorio en general, y los ensayos tiroideos no son la excepción (67, 68, 98). Ello significa que en la práctica clínica se encuentran con frecuencia resultados discordantes, que necesitan ser cuidadosamente interpretados mediante un abordaje conjunto entre el laboratorio que los genera y el médico que maneja al paciente con enfermedad tiroidea supuesta o confirmada.

A. Qué deberían esperar los médicos de los laboratorios clínicos

Los médicos dependen del laboratorio para la obtención de resultados exactos de los ensayos y para interpretar los resultados discordantes, ya sea que los ensayos se realicen en el mismo laboratorio o se deriven a un laboratorio de referencia. Es particularmente importante que el laboratorio aporte los datos disponibles sobre la interacción de medicamentos, los intervalos de referencia, las sensibilidades funcionales, los límites de detección, y las posibles interferencias que afecten a los métodos utilizados. El laboratorio, debería, además, abstenerse de efectuar modificaciones frecuentes o sin previo aviso en los métodos de ensayo e interactuar estrechamente con los médicos antes de introducir algún cambio. También debería estar preparado para colaborar con los médicos en validar clínicamente los datos obtenidos con el nuevo método, y para aportar no sólo evidencia de la superioridad del método propuesto en relación con el anterior sino, en caso necesario, ofrecer un factor de conversión. Tanto el valor diagnóstico como el costo asociados a las estrategias de usar ensayos confirmatorios (por ejemplo, la determinación sistemática de T3L cuando el valor de T4L está elevado, o de T4L cuando el valor de TSH es anormal) son, por lo

general, específicos de cada lugar (495). En Estados Unidos, la ley establece que los laboratorios sólo pueden implementar ensayos confirmatorios luego de consultar a los médicos que utilizan sus servicios.

Los médicos deberían esperar que el laboratorio clínico con el que trabajan establezca una relación con un laboratorio de referencia y/u otro laboratorio local que realice ensayos tiroideos con métodos de otro fabricante. La nueva medición de la muestra con un método alternativo es esencial para determinar si un resultado discordante fue causado por un problema técnico, una sustancia interferente en la muestra o una situación clínica rara (Recomendación 7 y Tabla 1).

Recomendación N° 76. Posibilidad de reevaluación de las muestras. Un derecho del paciente

- Los médicos deberían tener la posibilidad de enviar muestras de prueba a otros laboratorios (que no sean aquel con el que trabajan habitualmente) si los resultados no son válidos o significativos desde el punto de vista diagnóstico.
- También deberían tener la posibilidad de solicitar a su laboratorio habitual que envíe una muestra a otro laboratorio para que sea evaluada con un método de otro fabricante si los resultados no concuerdan con el cuadro clínico.

El laboratorio debería establecer y mantener una relación activa con los laboratorios de referencia para garantizar la disponibilidad de ensayos tiroideos especializados de alta calidad como por ejemplo tiroglobulina (Tg), anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea (TPOAb) y anticuerpos anti-receptor de TSH (TRAb). Además, se debería contar con un laboratorio de referencia que realice determinaciones de T4L mediante una técnica de separación física como la diálisis de equilibrio. La determinación de T4L por diálisis de equilibrio puede ser necesaria para diagnosticar enfermedad tiroidea en pacientes con alteraciones en las proteínas transportadoras de hormonas tiroideas que interfieran con los ensayos automatizados de estimación de T4L que realizan la mayoría de los laboratorios clínicos. En algunos casos puede ser necesaria la asistencia de un laboratorio de diagnóstico molecular capaz de identificar las mutaciones genéticas de la resistencia a las hormonas tiroideas o de una hiperplasia o cáncer medular de tiroides.

Como se observa en la Tabla 1 y en la Figura 11, algunas situaciones clínicas, medicamentos e interferencias en la muestra pueden generar un resultado inexacto, lo cual puede llevar a ensayos excesivos o a tratamientos inadecuados, o, en el caso del hipotiroidismo central, enmascarar la necesidad de tratamiento. Algunas interpretaciones incorrectas que pueden provocar errores graves se enuncian en la Recomendación N° 79.

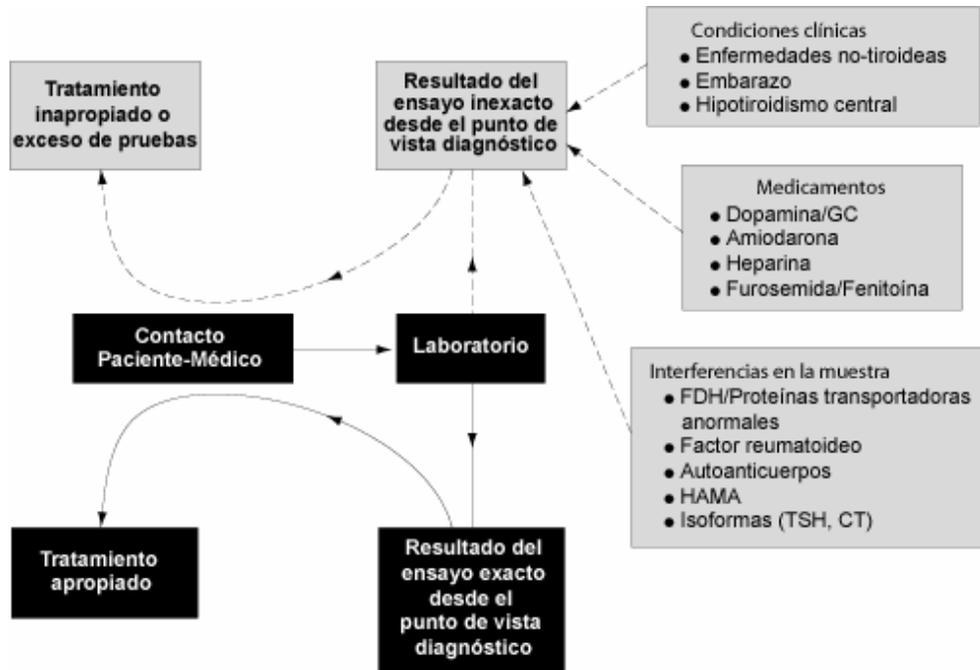


Fig. 12. Posibles consecuencias de ensayos tiroideos erróneos.

Los fabricantes tienen la responsabilidad de evaluar sus métodos en forma exhaustiva y cooperar estrechamente con los laboratorios que usan sus productos. Específicamente deberían, comunicar de inmediato a todos los usuarios los problemas que se susciten con los reactivos o las interferencias asociadas al método, si se conocen, y hacer recomendaciones para minimizar el impacto clínico del problema. Deberían abstenerse de modificar la composición de los equipos de reactivos, aún si su objetivo fuera minimizar la interferencia, sin informar a los usuarios; y permitir que tengan suficiente tiempo para efectuar estudios de correlación con el método anterior. Si el procedimiento tiene que modificarse, debería indicarse en la etiqueta del equipo mediante un número de versión.

Recomendación N° 77. Para los fabricantes

Los fabricantes deberían cooperar estrechamente con los laboratorios que usan sus productos. Deberían:

- Informar rápidamente a todos los usuarios si hubiera problemas con los reactivos y las interferencias inherentes al método, y recomendar cómo minimizar el impacto clínico del problema.
- La composición de los equipos de reactivos no debería ser cambiada sin informar previamente a los usuarios, aún cuando el objetivo fuera reducir la interferencia. Si el procedimiento tiene que cambiarse, el cambio debería indicarse en la etiqueta del equipo mediante un número de versión.

B. Qué deberían esperar los laboratorios de los médicos

El laboratorio debería esperar idealmente que los médicos acompañen la muestra enviada con la información clínica relevante y que entendieran claramente las limitaciones de los ensayos tiroideos. Por ejemplo, en algunos casos, los médicos deberían notar que en pacientes con hipotiroidismo central puede producirse una desconexión entre la actividad inmunológica y la actividad biológica de la TSH. Ello puede deberse a una disfunción hipofisaria en la que una forma inmunorreactiva de la TSH tenga deteriorada su bioactividad (197, 238).

El médico debería saber que el uso de algunos medicamentos puede producir resultados anómalos en los ensayos tiroideos, y que la eficiencia diagnóstica de los mismos en pacientes afectados por NTI depende del método. Sin información clínica, el laboratorio no puede apreciar las consecuencias de un error

diagnóstico (191). Un error de interpretación en los resultados por un desequilibrio transitorio entre la T4L y la TSH séricas debido a un tratamiento reciente para el hipo o el hipertiroidismo, puede tener consecuencias significativas.

Recomendación N° 78. Para los laboratorios

- Cada laboratorio clínico debería relacionarse con otro laboratorio que utilice un método de otro fabricante. Una nueva determinación del analito en muestras que presentan resultados discordantes con un método alternativo, es fundamental para determinar si ese resultado es causado por una sustancia interferente en la muestra o por una “verdadera” enfermedad (Tabla 1).
- Los laboratorios deberían estar en condiciones de brindar a los médicos detalles de los fundamentos del método usado, de la sensibilidad funcional, de la precisión inter-ensayo, de las interferencias y de todo desvío asociado a ese u otros métodos, e informar si los ensayos se realizan en esos laboratorios o se derivan a un laboratorio de referencia.

Recomendación N° 79. Errores de interpretación que pueden provocar errores médicos graves

Cuando los médicos o los profesionales del laboratorio no son conscientes de las limitaciones de los métodos, pueden surgir graves errores médicos:

- Ablación tiroidea innecesaria por niveles elevados de hormonas tiroideas producidos por HDF, presencia de autoanticuerpos anti-hormona tiroidea o resistencia a las hormonas tiroideas.
- Omisión del diagnóstico de “T3-toxicosis” en un paciente anciano débil afectado por NTI.
- Tratamiento inadecuado de un paciente hospitalizado por hipo o hipertiroidismo en base a ensayos tiroideos anómalos provocados por NTI o interferencia medicamentosa.
- Omisión del diagnóstico de hipotiroidismo central por haberse informado un nivel normal de TSH inmunorreactiva pero correspondiente a una isoforma biológicamente inactiva.
- Desconocimiento de enfermedad recurrente o metastásica en un paciente con cáncer de tiroides debido a un valor de Tg sérica demasiado bajo o indetectable por interferencia de anticuerpos anti-Tiroglobulina (TgAb) o por efecto “hook” (gancho) cuando se mide por IMA.
- Desconocimiento de que una tirotoxicosis neonatal puede estar enmascarada por el pasaje transplacentario de medicamentos antitiroideos suministrados a la madre con enfermedad de Graves.

Sin una estrecha colaboración entre el laboratorio y los médicos, la calidad del servicio que preste el laboratorio en el diagnóstico, indudablemente será subóptima. Esto se comprueba especialmente en países como Estados Unidos, donde los laboratorios rara vez reciben datos clínicos del paciente o de su medicación junto con la muestra. La imposibilidad del laboratorio de realizar la comprobación clínica de la validez del resultado informado (es decir, relacionarlo con la historia clínica y con los medicamentos del paciente) puede ocasionar errores de interpretación, especialmente cuando los médicos no están familiarizados con las limitaciones técnicas ni con las interferencias que afectan el ensayo.



Apéndice A: Revisores de la Monografía

Robert Adler, M.D.

Medical College of Virginia, VA, EE.UU.

Gisah Amaral de Carvalho, MD, Ph.D

Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Parana, Brasil

Nobuyuki Amino, M.D.

Osaka University Graduate School of Medicine, Japón

Claudio Aranda, Bioch. Spec.

Hospital Carlos G. Durand, Buenos Aires, Argentina

Jack H. Baskin M.D., F.A.C.E

Florida Thyroid & Endocrine Clinic, Orlando, FL, EE.UU.

Graham Beastall, Ph.D

Edinburgh Royal Infirmary NHS Trust, Scotland, Reino Unido

Geoff Beckett Ph.D., F.R.C.Path

Edinburgh Royal Infirmary NHS Trust, Scotland, Reino Unido

Liliana Bergoglio, Bioch.Spec.

Hospital N. de Clínicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Roger Bertholf, Ph.D., DABCC, FACB

University of Florida Health Science Center, Jacksonville, FL, EE.UU.

Thomas Bigos, M.D., Ph.D.

Maine Medical Center, MA, EE.UU.

Manfred Blum, M.D.

New York University Medical Center, New York, NY, EE.UU.

Gustavo Borrajo, M.D.

Detección de Errores Congénitos, Fundación Bioquímica Argentina, La Plata, Argentina

Irv Bromberg, M.D., C.M.

Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canadá

Rosalind Brown, M.D.

University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, EE.UU.

Bo Youn Cho

Asan Medical Center, Seoul, Corea

Nic Christofides, Ph.D.,

Ortho-Clinical Diagnostics, Cardiff CF14 7YT, Gales, Reino Unido.

Orlo Clark, M.D.

UCSF/ Mount Zion Medical Center, San Francisco, CA, EE.UU.

Rhonda Cobin, M.D.

Midland Park, NJ, EE.UU.

David Cooper, M.D.

Sinai Hospital of Baltimore, Baltimore, MD, EE.UU.

Gilbert Cote, M.D.

UT MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, EE.UU.

Marek Czarkowski, M.D.

Varsovia, Polonia

Gilbert Daniels, M.D.

Massachusetts General Hospital, Boston, MA, EE.UU.

Catherine De Micco, M.D.

University of the Medeterranea Medical School, Marsella, Francia

D.Robert.Dufour, M.D.

VA Medical Center, Washington DC, EE.UU.

John Dunn, M.D.

University of Virginia Health Sciences Center, Charlottesville, VA, EE.UU.

Joel Ehrenkranz, M.D.

Aspen, CO, EE.UU.

David Endres, PhD,

University of Southern California, Los Angeles, CA, EE.UU.

Carol Evans, BSc., MSc., Ph.D, MRcPath.

University Hospital of Wales, Reino Unido

Shireen Fatemi, M.D.

Kaiser Permanente of Southern California, Panorama City, CA, EE.UU.

J. Douglas Ferry, Ph.D.,

Beaumont Hospital, Southfield, MI, EE.UU.

Jayne Franklyn, M.D. Ph.D. F.R.C.P.

Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, Reino Unido

Jeffery Garber M.D.

Harvard Vanguard Medical Associates, Boston, MA, EE.UU.

Daniel Glinoe, M.D.

University Hospital St.Pierre, Bruxelles, Bélgica

Timothy Greaves, M.D., F.A.C.P.

LAC-USC Medical Center, Los Angeles, CA, EE.UU.

B.J. Green

Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EE.UU.

Ian Hanning, BSc., MSc.,MRCPath

Hull Royal Infirmary, Hull, Reino Unido

Charles D. Hawker, Ph.D., MBA

Salt Lake City, UT, EE.UU.

Georg Hennemann, M.D.

Erasmus University, Rotterdam, Holanda

Tien-Shang Huang, M.D.

College of Medicine, National Taiwan University, Taiwán

James Hurley, M.D.

New York Presbyterian Hospital, New York, NY, EE.UU.

William L Isley, MD

University of Missouri, Kansas City, MO, EE.UU.

Lois Jovanovic, MD

Sansum Medical Research Institute, Santa Barbara, CA, EE.UU.

George Kahaly M.D.

Gutenberg University Hospital, Mainz, Alemania

Laurence Kaplan, Ph.D.

Bellevue Hospital, New York, EE.UU.

Elaine Kaptein, M.D.

University of Southern California, Los Angeles, CA, EE.UU.

J. H. Keffer, M.D.

Melbourne Beach, FL, EE.UU.

Pat Kendall-Taylor, M.D.

Newcastle on Tyne, England, Reino Unido

Leonard Kohn, M.D.

Ohio University College of Osteopathic Medicine Athens, OH, EE.UU.

Annie Kung, M.D.

The University of Hong Kong, Hong Kong

Paul Ladenson, M.D.

Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD, EE.UU.

Peter Laurberg, M.D.

University of Aalborg, Aalborg, Dinamarca

P. Reed Larsen, M.D. FACP, FRCP

Harvard Medical School, Boston, MA, EE.UU.

John Lazarus, M.A. M.D., F.R.C.P.

University of Wales College of Medicine, Cardiff, Gales, Reino Unido

Charles Lewis, Jr., Ph.D.

Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EE.UU.

Jon LoPresti, M.D., Ph.D.

University of Southern California, Los Angeles, CA, EE.UU.
Gustavo Maccallini, Bioch. Spec.
Hospital Carlos G. Durand, Buenos Aires, Argentina
Rui Maciel, M.D., Ph.D.
Department of Medicine, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil
Susan J. Mandel, MD, MPH
Hospital of the University of Pennsylvania, Pennsylvania, EE.UU.
Geraldo Medeiros-Neto, M.D.
Hospital das Clinicas, Sao Paulo, Brasil
Jorge H. Mestman, M.D.
University of Southern California, Los Angeles, CA, EE.UU.
Greg Miller M.D.
Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, EE.UU.
James J. Miller, Ph.D., DABCC, FACB
University of Louisville, Kentucky, EE.UU.
Marvin Mitchell, M.D.
University Massachusetts Medical Center, Jamaica Plain, MA, EE.UU.
John Morris, M.D.
Mayo Clinic, Rochester, MN, EE.UU.
Jerald C. Nelson, M.D.
Loma Linda University, California, EE.UU.
John T. Nicoloff, M.D.
University of Southern California, Los Angeles, CA, EE.UU.
Hugo Niepomnische, M.D.
Hospital de Clinicas, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina
Ernst Nystrom, M.D.
University of Goteborg, Suecia
Richard Pikner, M.D.
Charles University, Plzen, República Checa
Frank Quinn, Ph.D.
Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EE.UU.
Peter Raggatt, M.D.
Addenbrooke's Hospital, Cambridge, Reino Unido
Robert Rude, M.D.
University of Southern California, Los Angeles, CA, EE.UU.
Jean Ruf, M.D.
Department of Biochemistry & Molecular Biology, Marsella, Francia
Remy Sapin, Ph.D.
Institut de Physique Biologique, Estrasburgo, Francia
Gerardo Sartorio, Bioch. Spec.
Hospital J.M. Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina
Steven I. Sherman, M.D.
MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, EE.UU.
Peter A. Singer, M.D.
University of Southern California, Los Angeles, CA, EE.UU.
Stephen Spalding, M.D.
VA Medical Center, Buffalo, NY, EE.UU.
Martin I. Surks, M.D.
Montefiore Medical Center, Bronx, NY, EE.UU.
Brad Therrell, Ph.D.
National Newborn Screening and Genetics Resource Center, Austin, TX, EE.UU.
Anthony D. Toft, M.D.
Edinburgh Royal Infirmary NHS Trust, Scotland, Reino Unido
Toni Torresani M.D.
University Children's Hospital, Zürich, Suiza
R. Michael Tuttle, M.D.,

Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, EE.UU.

Hidemasa Uchimura, M.D.

Department of Clinical Pathology, Kyorin University, Japón

Greet Van den Berghe M.D., Ph.D.

Department of Intensive Care Medicine, University of Leuven, Leuven, Bélgica

Lester Van Middlesworth, M.D., Ph.D.

University of Tennessee, Memphis, TN, EE.UU.

Paul Verheecke, M.D.

Centraal Laboratorium, Hasselt, Bélgica

Paul Walfish, C.M., M.D.,

University of Toronto, Ontario, Canadá

John P. Walsh, F.R.A.C.P. Ph.D.,

Sir Charles Gairdner Hospital, Nedlands, WA, Australia

Barry Allen Warner, D.O.

University of South Alabama College of Medicine, Mobile, AL, EE.UU.

Joseph Watine PharmD,

Laboratoire de biologie polyvalente, Hôpital Général, Rodez, Francia

Anthony P. Weetman, M.D.

Northern General Hospital, Sheffield, Reino Unido

Thomas Williams, M.D.

Methodist Hospital, Omaha, NE, EE.UU.

Ken Woeber, M.D.

UCSF, Mount Zion Medical Center, San Francisco, CA, EE.UU.

Nelson G. Wohlk MD,

Hospital del Salvador, Santiago, Chile

Apéndice B. – Programas de Control de Calidad Externos para el Screening de Neonatos

- Australasia-Australasian Quality Assurance Program, National Testing Center 2nd Floor, National Women's Hospital, Claude Road, Epsom, Auckland, Nueva Zelanda.
- Europa-Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie eV, Im Muhlenbach 52a, D-53127 Bonn, Alemania.
- América Latina – Programa de Evaluación Externa de Calidad para Pesquisa Neonatal (PEEC). Fundación Bioquímica Argentina. Calle 6 # 1344. (1900) La Plata, Argentina*
- United Kingdom External Quality Assurance Scheme, Wolfson EQA laboratory, PO Box 3909, Birmingham, B15 2UE, Reino Unido.
- EE.UU.-Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 4770 Buford Highway NE, Atlanta, GA 30341-3724, EE.UU..

(El programa UK NEQAS es el único que aplica un cargo a los participantes).

Apéndice C – Glosario de Abreviaturas

En el texto, algunas abreviaturas han sido traducidas al español de una manera que refleje su utilización más corriente, y se las menciona en el glosario en ambos idiomas.

AIH =	Amiodarone-Induced Hyperthyroidism: Hipertiroidismo inducido por amiodarona (HIA)
AITD =	Autoimmune Thyroid Disease: Enfermedad tiroidea autoinmune
ANS =	8-Anilino-1-Naphthalene-Sulphonic Acid: ácido 1,8 anilino naftaleno sulfónico
ATD =	Anti-Thyroid Drug Treatment: Tratamiento con fármaco anti tiroideo
CT =	Calcitonin: Calcitonina
CV =	Coefficient of Variation: Coeficiente de variación
DTC =	Differentiated Thyroid Carcinoma: Carcinoma diferenciado de tiroides (CDT)

FDH =	Familial Dysalbuminemic Hyperthyroxinemia: Hipertiroxinemia disalbuminémica familiar
FFA =	Free Fatty Acids: Ácidos grasos libres
FMTC =	Familial Medullary Thyroid Carcinomas: Carcinoma medular de tiroides familiar (CMTF)
FNA =	Fine Needle Aspiration: Punción aspirativa con aguja fina (PAAF)
HAAA =	Human anti_animal antibodies: Anticuerpos heterofílicos (humanos anti animal)
HAMA =	Human anti_mouse antibodies: Anticuerpos heterofílicos (humanos anti ratón)
T3L =	T3 libre
T4L =	T4 libre
HCC=	C-cell Hyperplasia: Hiperplasia de células C
HCG =	Human chorionic gonadotropin: Gonadotropina coriónica humana
IMA =	Immunometric Assay: Ensayo inmunométrico
L-T4 =	Levotiroxina
MEN =	Multiple Endocrine Neoplasia: Neoplasia endócrina múltiple (NEM)
MTC =	Medullary Thyroid Carcinoma: Carcinoma medular de tiroides (CMT)
NIS =	Sodium Iodide Symporter: Co-transportador Na⁺/I⁻
NTI =	Nonthyroidal Illness: Enfermedad no tiroidea
PBI =	Protein-bound Iodine: Yodo unido a proteínas
Pg =	Pentagastrina
PTH =	Parathyroid Hormone: Hormona Paratiroidea
RT3 =	T3 inversa (T3R)
RET =	RET Proto-oncogene: proto-oncogen RET
rhTSH =	Recombinant human TSH: TSH recombinante humana
RIA =	Radioinmunoensayo
T4 =	Tiroxina
T3 =	Triyodotironina
TBG =	Thyroxine Binding Globulin: Globulina fijadora de tiroxina
TBPA=	Thyroxine Binding Prealbumin: Prealbúmina fijadora de tiroxina
T4T =	Total Thyroxine: Tiroxina total
T3T =	Total Triiodothyronine: Triyodotironina total
TTR=	Transtiretina
Tg =	Tiroglobulina
TgAb =	Thyroglobulin Autoantibody: Autoanticuerpos anti tiroglobulina
TPO =	Thyroid Peroxidase: Peroxidasa tiroidea
TPOAb =	Thyroid Peroxidase Autoantibody: Autoanticuerpos anti-peroxidasa tiroidea
TBAb/TSBAb =	Anticuerpo bloqueante del receptor de TSH
TBIH =	TSH Binding Inhibitory Immunoglobulins: Inmunoglobulinas que inhiben la unión de TSH (ensayo de radiorreceptor)
TRAb =	TSH Receptor Antibody. Anticuerpo anti-receptor de la TSH
TRH =	Thyrotropin Releasing Hormone: Hormona liberadora de TSH
TSAb =	Thyroid Stimulating Antibody: Anticuerpo estimulante tiroideo
TSH =	Thyroid Stimulating Hormone (Thyrotropin): Hormona estimulante de la tiroides (Tirotrofina)
WHO =	World Health Organization: Organización Mundial de la Salud (OMS)

Apéndice D – Agradecimiento

La publicación de estas recomendaciones en idioma Español fue autorizada por la National Academy of Clinical Biochemistry (www.nacb.org)

Agradecemos el respaldo del Laboratorio Abbott Int. para la difusión de esta Monografía en idioma Español.

Referencias Bibliográficas

1. Nohr SB, Laurberg P, Borlum KG, Pedersen Km, Johannesen PL, Damm P. Iodine deficiency in pregnancy in Denmark. Regional variations and frequency of individual iodine supplementation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993;72:350-3.
2. Glinoe D. Pregnancy and iodine. *Thyroid* 2001;11:471-81.
3. Hollowell JG, Staehling NW, Hannon WH, Flanders DW, Gunter EW, Maberly GF et al. Iodine nutrition in the United States. Trends and public health implications: iodine excretion data from National Health and Nutrition Examination Surveys I and III (1971-1974 and 1988-1994). *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3398-400.
4. Wartofsky L, Glinoe D, Solomon d, Nagataki S, Lagasse R, Nagayama Y et al. Differences and similarities in the diagnosis and treatment of Graves disease in Europe, Japan and the United States. *Thyroid* 1990;1:129-35.
5. Singer PA, Cooper DS, Levy EG, Ladenson PW, Braverman LE, Daniels G et al. Treatment guidelines for patients with hyperthyroidism and hypothyroidism. *JAMA* 1995;273:808-12.
6. Singer PA, Cooper DS, Daniels GH, Ladenson PW, Greenspan FS, Levy EG et al. Treatment Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Well-differentiated Thyroid Cancer. *Arch Intern Med* 1996;156:2165-72.
7. Vanderpump MPJ, Ahlquist JAO, Franklyn JA and Clayton RN. Consensus statement for good practice and audit measures in the management of hypothyroidism and hyperthyroidism. *Br Med J* 1996;313:539-44.
8. Laurberg P, Nygaard B, Glinoe D, Grussendorf M and Orgiazzi J. Guidelines for TSH-receptor antibody measurements in pregnancy: results of an evidence-based symposium organized by the European Thyroid Association. *Eur J Endocrinol* 1998;139:584-6.
9. Cobin RH, Gharib H, Bergman DA, Clark OH, Cooper DS, Daniels GH et al. AACE/AAES Medical/Surgical Guidelines for Clinical Practice: Management of Thyroid Carcinoma. *Endocrine Pract* 2001;7:203-20.
10. Ladenson PW, Singer PA, Ain KB, Bagchi N, Bigos ST, Levy EG et al. American Thyroid Association Guidelines for detection of thyroid dysfunction. *Arch Intern Med* 2000;160:1573-5.
11. Brandi ML, Gagel RJ, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C et al. Consensus Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5658-71.
12. Werner and Ingbar's "The Thyroid". A Fundamental and Clinical Text. Lippincott-Raven, Philadelphia 2000. Braverman LE and Utiger RD eds.
13. DeGroot LJ, Larsen PR, Hennemann G, eds. The Thyroid and Its Diseases. (www.thyroidmanager.org) 2000.
14. Piketty ML, D'Herbomez M, Le Guillouzie D, Lebtahi R, Cosson E, Dumont A et al. Clinical comparison of three labeled-antibody immunoassays of free triiodothyronine. *Clin Chem* 1996;42:933-41.
15. Sapin R, Schlienger JL, Goichot B, Gasser F and Grucker D. Evaluation of the Elecsys free triiodothyronine assay; relevance of age-related reference ranges. *Clin Biochem* 1998;31:399-404.
16. Robbins J. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. In "Hormones in Blood". Academic Press, London 1996. Gray CH, James VHT, eds. pp 96-110.
17. Demers LM. Thyroid function testing and automation. *J Clin Ligand Assay* 1999;22:38-41.
18. Hollowell JG, Staehling NW, Hannon WH, Flanders WD, Gunter EW, Spencer CA et al. Serum thyrotropin, thyroxine and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): NHANES III. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:489-99.
19. Wardle CA, Fraser WD and Squire CR. Pitfalls in the use of thyrotropin concentration as a first-line thyroid-function test. *Lancet* 2001;357:1013-4.
20. Spencer CA, LoPresti JS, Patel A, Guttler RB, Eigen A, Shen D et al. Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:453-60.
21. Meikle, A. W., J. D. Stringham, M. G. Woodward and J. C. Nelson. Hereditary and environmental influences on the variation of thyroid hormones in normal male twins. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:588-92.

22. Andersen S, Pedersen KM, Bruun NH and Laurberg P. Narrow individual variations in serum T4 and T3 in normal subjects: a clue to the understanding of subclinical thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1068-72.
23. Cooper, D. S., R. Halpern, L. C. Wood, A. A. Levin and E. V. Ridgway. L-thyroxine therapy in subclinical hypothyroidism. *Ann Intern Med* 1984;101:18-24.
24. Biondi B, Fazio E, Palmieri EA, Carella C, Panza N, Cittadini A et al. Left ventricular diastolic dysfunction in patients with subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;2064-7.
25. Hak AE, Pols HAP, Visser TJ, Drexhage HA, Hofman A and Witteman JCM. Subclinical Hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam Study. *Ann Intern Med* 2000;132:270-8.
26. Michalopoulou G, Alevizaki M, Pipingos G, Mitsibounas D, Mantzos E, Adamopoulos P et al. High serum cholesterol levels in persons with 'high-normal' TSH levels: should one extend the definition of subclinical hypothyroidism? *Eur J Endocrinol* 1998;138:141-5.
27. Beck-Peccoz P, Brucker-Davis F, Persani L, Smallridge RC and Weintraub BD. Thyrotropin-secreting pituitary tumors. *Endocrine Rev* 1996;17:610-38.
28. Brucker-Davis F, Oldfield EH, Skarulis MC, Doppman JL and Weintraub BD. Thyrotropin-secreting pituitary tumors: diagnostic criteria, thyroid hormone sensitivity and treatment outcome in 25 patients followed at the National Institutes of Health. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;1089-94.
29. Oliveira JH, Persani L, Beck-Peccoz P and Abucham J. Investigating the paradox of hypothyroidism and increased serum thyrotropin (TSH) levels in Sheehan's syndrome: characterization of TSH carbohydrate content and bioactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1694-9.
30. Uy H, Reasner CA and Samuels MH. Pattern of recovery of the hypothalamic-pituitary thyroid axis following radioactive iodine therapy in patients with Graves' disease. *Amer J Med* 1995;99:173-9.
31. Hershman JM, Pekary AE, Berg L, Solomon DH and Sawin CT. Serum thyrotropin and thyroid hormone levels in elderly and middle-aged euthyroid persons. *J Am Geriatr Soc* 1993;41:823-8.
32. Fraser CG. Age-related changes in laboratory test results. Clinical applications. *Drugs Aging* 1993;3:246-57.
33. Fraser CG. 2001. *Biological Variation: from principles to practice*. AACCC Press, Washington DC.
34. Drinka PJ, Siebers M and Voeks SK. Poor positive predictive value of low sensitive thyrotropin assay levels for hyperthyroidism in nursing home residents. *South Med J* 1993;86:1004-7.
35. Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG, French JM, Appleton D, Bates D, Rodgers H et al. The incidence of thyroid disorders in the community; a twenty year follow up of the Whickham survey. *Clin Endocrinol* 1995;43:55-68.
36. Sawin CT, Geller A, Kaplan MM, Bacharach P, Wilson PW, Hershman JM et al. Low serum thyrotropin (thyroid stimulating hormone) in older persons without hyperthyroidism. *Arch Intern Med* 1991;151:165-8.
37. Parle JV, Maisonneuve P, Sheppard MC, Boyle P and Franklyn JA. Prediction of all-cause and cardiovascular mortality in elderly people from one low serum thyrotropin result: a 10-year study. *Lancet* 2001;358:861-5.
38. Nelson JC, Clark SJ, Borut DL, Tomei RT and Carlton EI. Age-related changes in serum free thyroxine during childhood and adolescence. *J Pediatr* 1993;123:899-905.
39. Adams LM, Emery JR, Clark SJ, Carlton EI and Nelson JC. Reference ranges for newer thyroid function tests in premature infants. *J Pediatr* 1995;126:122-7.
40. Lu FL, Yau KI, Tsai KS, Tang JR, Tsao PN and Tsai WY. Longitudinal study of serum free thyroxine and thyrotropin levels by chemiluminescent immunoassay during infancy. *T'aiwan Erh K'o i Hseh Hui Tsa Chih* 1999;40:255-7.
41. Zurakowski D, Di Canzio J and Majzoub JA. Pediatric reference intervals for serum thyroxine, triiodothyronine, thyrotropin and free thyroxine. *Clin Chem* 1999;45:1087-91.
42. Fisher DA, Nelson JC, Carlton EI and Wilcox RB. Maturation of human hypothalamic-pituitary-thyroid function and control. *Thyroid* 2000;10:229-34.
43. Fisher DA, Schoen EJ, La Franchi S, Mandel SH, Nelson JC, Carlton EI and Goshi JH. The hypothalamic-pituitary-thyroid negative feedback control axis in children with treated congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2722-7.

44. Penny R, Spencer CA, Frasier SD and Nicoloff JT. Thyroid stimulating hormone (TSH) and thyroglobulin (Tg) levels decrease with chronological age in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:177-80.
45. Verheecke P. Free triiodothyronine concentration in serum of 1050 euthyroid children is inversely related to their age. *Clin Chem* 1997;43:963-7.
46. Glinoe D, De Nayer P, Bourdoux P, Lemone M, Robyn C, van Steirteghem A et al. Regulation of maternal thyroid function during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:276-87.
47. Glinoe D. The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. *Endocrinol Rev* 1997;18:404-33.
48. Weeke J, Dybkjaer L, Granlie K, Eskjaer Jensen S, Kjaerulff E, Laurberg P et al. A longitudinal study of serum TSH and total and free iodothyronines during normal pregnancy. *Acta Endocrinol* 1982;101:531-7.
49. Pedersen KM, Laurberg P, Iversen E, Knudsen PR, Gregersen HE, Rasmussen OS et al. Amelioration of some pregnancy associated variation in thyroid function by iodine supplementation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1078-83.
50. Nohr SB, Jorgensen A, Pedersen KM and Laurberg P. Postpartum thyroid dysfunction in pregnant thyroid peroxidase antibody-positive women living in an area with mild to moderate iodine deficiency: Is iodine supplementation safe? *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3191-8.
51. Panesar NS, Li CY and Rogers MS. Reference intervals for thyroid hormones in pregnant Chinese women. *Ann Clin Biochem* 2001;38:329-32.
52. Nissim M, Giorda G, Ballabio M, D'Alborton A, Bochicchio D, Orefice R et al. Maternal thyroid function in early and late pregnancy. *Horm Res* 1991;36:196-202.
53. Talbot JA, Lambert A, Anobile CJ, McLoughlin JD, Price A, Weetman AP et al. The nature of human chorionic gonadotrophin glycoforms in gestational thyrotoxicosis. *Clin Endocrinol* 2001;55:33-9.
54. Jordan V, Grebe SK, Cooke RR, Ford HC, Larsen PD, Stone PR et al. Acidic isoforms of chorionic gonadotrophin in European and Samoan women are associated with hyperemesis gravidarum and may be thyrotrophic. *Clin Endocrinol* 1999;50:619-27.
55. Goodwin TM, Montoro M, Mestman JH, Pekary AE and Hershman JM. The role of chorionic gonadotropin in transient hyperthyroidism of hyperemesis gravidarum. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1333-7.
56. Hershman JM. Human chorionic gonadotropin and the thyroid: hyperemesis gravidarum and trophoblastic tumors. *Thyroid* 1999;9:653-7.
57. McElduff A. Measurement of free thyroxine (T4) in pregnancy. *Aust NZ J Obst Gynecol* 1999;39:158-61.
58. Christofides, N., Wilkinson E, Stoddart M, Ray DC and Beckett GJ. Assessment of serum thyroxine binding capacity-dependent biases in free thyroxine assays. *Clin Chem* 1999;45:520-5.
59. Roti E, Gardini E, Minelli R, Bianconi L, Flisi M., Thyroid function evaluation by different commercially available free thyroid hormone measurement kits in term pregnant women and their newborns. *J Endocrinol Invest* 1991;14:1-9.
60. Stockigt JR. Free thyroid hormone measurement: a critical appraisal. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2001;30:265-89.
61. Mandel SJ, Larsen PR, Seely EW and Brent GA. Increased need for thyroxine during pregnancy in women with primary hypothyroidism. *NEJM* 1990;323:91-6.
62. Burrow GN, Fisher DA and Larsen PR. Maternal and fetal thyroid function. *N Engl J Med* 1994;331:1072-8.
63. Pop VJ, De Vries E, Van Baar AL, Waelkens JJ, De Rooy HA, Horsten M et al. Maternal thyroid peroxidase antibodies during pregnancy: a marker of impaired child development? *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3561-6.
64. Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, K. G. Williams JR, Gagnon J, O'Heir CE et al. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *NEJM* 1999;341:549-55.
65. Pop VJ, Kuijpers JL, van Baar AL, Verkerk G, van Son MM, de Vijlder JJ et al. Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. *Clin Endocrinol* 1999;50:147-8.

66. Radetti G, Gentili L, Paganini C, Oberhofer R, Deluggi I and Delucca A. Psychomotor and audiological assessment of infants born to mothers with subclinical thyroid dysfunction in early pregnancy. *Minerva Pediatr* 2000;52:691-8.
67. Surks MI and Sievert R. Drugs and thyroid function. *NEJM* 1995;333:1688-94.
68. Kailajarvi M, Takala T, Gronroos P, Tryding N, Viikari J, Irjala K et al. Reminders of drug effects on laboratory test results. *Clin Chem* 2000;46:1395-1400.
69. Brabant A, Brabant G, Schuermeyer T, Ranft U, Schmidt FW, Hesch RD et al. The role of glucocorticoids in the regulation of thyrotropin. *Acta Endocrinol* 1989;121:95-100.
70. Samuels MH and McDaniel PA. Thyrotropin levels during hydrocortisone infusions that mimic fasting-induced cortisol elevations: a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3700-4.
71. Kaptein EM, Spencer CA, Kamiel MB and Nicoloff JT. Prolonged dopamine administration and thyroid hormone economy in normal and critically ill subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:387-93.
72. Geffner DL and Hershman JM. Beta-adrenergic blockade for the treatment of hyperthyroidism. *Am J Med* 1992;93:61-8.
73. Meurisse M, Gollogly MM, Degauque C, Fumal I, Defechereux T and Hamoir E. Iatrogenic thyrotoxicosis: causal circumstances, pathophysiology and principles of treatment- review of the literature. *World J Surg* 2000;24:1377-85.
74. Martino E, Aghini-Lombardi F, Mariotti S, Bartalena L, Braverman LE and Pinchera A. Amiodarone: a common source of iodine-induced thyrotoxicosis. *Horm Res* 1987;26:158-71.
75. Martino E, Bartalena L, Bogazzi F and Braverman LE. The effects of amiodarone on the Thyroid. *Endoc Rev* 2001;22:240-54.
76. Daniels GH. Amiodarone-induced thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3-8.
77. Harjai KJ and Licata AA. Effects of amiodarone on thyroid function. *Ann Intern Med* 1997;126:63-73.
78. Caron P. Effect of amiodarone on thyroid function. *Press Med* 1995;24:1747-51.
79. Bartalena L, Grasso L, Brogioni S, Aghini-Lombardi F, Braverman LE and Martino E. Serum interleukin-6 in amiodarone-induced thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:423-7.
80. Eaton SE, Euinton HA, Newman CM, Weetman AP and Bennet WM. Clinical experience of amiodarone-induced thyrotoxicosis over a 3-year period: role of colour-flow Doppler sonography. *Clin Endocrinol* 2002;56:33-8.
81. Lazarus JH. The effects of lithium therapy on thyroid and thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid* 1998;8:909-13.
82. Kusalic M and Engelsmann F. Effect of lithium maintenance therapy on thyroid and parathyroid function. *J Psych Neurosci* 1999;24:227-33.
83. Oakley PW, Dawson AH and Whyte IM. Lithium: thyroid effects and altered renal handling. *Clin Toxicol* 2000;38:333-7.
84. Mendel CM, Frost PH, Kunitake ST and Cavalieri RR. Mechanism of the heparin-induced increase in the concentration of free thyroxine in plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:1259-64.
85. Iitaka M, Kawasaki S, Sakurai S, Hara Y, Kuriyama R, Yamanaka K et al. Serum substances that interfere with thyroid hormone assays in patients with chronic renal failure. *Clin Endocrinol* 1998;48:739-46.
86. Bowie LJ, Kirkpatrick PB and Dohnal JC. Thyroid function testing with the TDx: Interference from endogenous fluorophore. *Clin Chem* 1987;33:1467.
87. DeGroot LJ and Mayor G. Admission screening by thyroid function tests in an acute general care teaching hospital. *Amer J Med* 1992;93:558-64.
88. Kaptein EM. Thyroid hormone metabolism and thyroid diseases in chronic renal failure. *Endocr Rev* 1996;17:45-63.
89. Van den Berghe G, De Zegher F and Bouillon R. Acute and prolonged critical illness as different neuroendocrine paradigms. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1827-34.
90. Van den Berhe G. Novel insights into the neuroendocrinology of critical illness. *Eur J Endocrinol* 2000;143:1-13.
91. Wartofsky L and Burman KD. Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: the "euthyroid sick syndrome". *Endocrinol Rev* 1982;3:164-217.

92. Spencer CA, Eigen A, Duda M, Shen D, Qualls S, Weiss S et al. Sensitive TSH tests - specificity limitations for screening for thyroid disease in hospitalized patients. *Clin Chem* 1987;33:1391-1396.
93. Stockigt JR. Guidelines for diagnosis and monitoring of thyroid disease: nonthyroidal illness. *Clin Chem* 1996;42:188-92.
94. Nelson JC and Weiss RM. The effects of serum dilution on free thyroxine (T4) concentration in the low T4 syndrome of nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:239-46.
95. Chopra IJ, Huang TS, Beredo A, Solomon DH, Chua Teco GN. Serum thyroid hormone binding inhibitor in non thyroidal illnesses. *Metabolism* 1986;35:152-9.
96. Wang R, Nelson JC and Wilcox RB. Salsalate administration - a potential pharmacological model of the sick euthyroid syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3095-9.
97. Sapin R, Schliener JL, Kaltenbach G, Gasser F, Christofides N, Roul G et al. Determination of free triiodothyronine by six different methods in patients with non-thyroidal illness and in patients treated with amiodarone. *Ann Clin Biochem* 1995;32:314-24.
98. Docter R, van Toor H, Krenning EP, de Jong M and Hennemann G. Free thyroxine assessed with three assays in sera of patients with nonthyroidal illness and of subjects with abnormal concentrations of thyroxine-binding proteins. *Clin Chem* 1993;39:1668-74.
99. Wilcox RB, Nelson JC and Tomei RT. Heterogeneity in affinities of serum proteins for thyroxine among patients with non-thyroidal illness as indicated by the serum free thyroxine response to serum dilution. *Eur J Endocrinol* 1994;131:9-13.
100. Liewendahl K, Tikanoja S, Mahonen H, Helenius T, Valimaki M and Tallgren LG. Concentrations of iodothyronines in serum of patients with chronic renal failure and other nonthyroidal illnesses: role of free fatty acids. *Clin Chem* 1987;33:1382-6.
101. Sapin R, Schlienger JL, Gasser F, Noel E, Lioure B, Grunenberger F. Intermethod discordant free thyroxine measurements in bone marrow-transplanted patients. *Clin Chem* 2000;46:418-22.
102. Chopra IJ. Simultaneous measurement of free thyroxine and free 3,5,3'-triiodothyronine in undiluted serum by direct equilibrium dialysis/radioimmunoassay: evidence that free triiodothyronine and free thyroxine are normal in many patients with the low triiodothyronine syndrome. *Thyroid* 1998;8:249-57.
103. Hamblin PS, Dyer SA, Mohr VS, Le Grand BA, Lim C-F, Tuxen DB, Topliss DJ and Stockigt JR. Relationship between thyrotropin and thyroxine changes during recovery from severe hypothyroxinemia of critical illness. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:717-22.
104. Brent GA and Hershman JM. Thyroxine therapy in patients with severe nonthyroidal illnesses and low serum thyroxine concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:1-8.
105. De Groot LJ. Dangerous dogmas in medicine: the nonthyroidal illness syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:151-64.
106. Burman KD and Wartofsky L. Thyroid function in the intensive care unit setting. *Crit Care Clin* 2001;17:43-57.
107. Behrend EN, Kempainen RJ and Young DW. Effect of storage conditions on cortisol, total thyroxine and free thyroxine concentrations in serum and plasma of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1998;212:1564-8.
108. Oddie TH, Klein AH, Foley TP and Fisher DA. Variation in values for iodothyronine hormones, thyrotropin and thyroxine binding globulin in normal umbilical-cord serum with season and duration of storage. *Clin Chem* 1979;25:1251-3.
109. Koliakos G, Gaitatzi M and Grammaticos P. Stability of serum TSH concentration after non refrigerated storage. *Minerva Endocrinol* 1999;24:113-5.
110. Waite KV, Maberly GF and Eastman CJ. Storage conditions and stability of thyrotropin and thyroid hormones on filter paper. *Clin Chem* 1987;33:853-5.
111. Levinson SS. The nature of heterophilic antibodies and their role in immunoassay interference. *J Clin Immunoassay* 1992;15:108-15.
112. Norden AGM, Jackson RA, Norden LE, Griffin AJ, Barnes MA and Little JA. Misleading results for immunoassays of serum free thyroxine in the presence of rheumatoid factor. *Clin Chem* 1997;43:957-62.
113. Covinsky M, Laterza O, Pfeifer JD, Farkas-Szallasi T and Scott MG. Lambda antibody to *Escherichia coli* produces false-positive results in multiple immunometric assays. *Clin Chem* 2000;46:1157-61.

114. Martel J, Despres N, Ahnadi CE, Lachance JF, Monticello JE, Fink G, Ardemagni A, Banfi G, Tovey J, Dykes P, John R, Jeffery J and Grant AM. Comparative multicentre study of a panel of thyroid tests using different automated immunoassay platforms and specimens at high risk of antibody interference. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:785-93.
115. Howanitz PJ, Howanitz JH, Lamberson HV and Ennis KM. Incidence and mechanism of spurious increases in serum Thyrotropin. *Clin Chem* 1982;28:427-31.
116. Boscato, L. M. and M. C. Stuart. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem* 1988;34:27-33.
117. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interference in immunological assays. *Clin Chem* 1999;45:942-56.
118. Sapin R and Simon C. False hyperprolactinemia corrected by the use of heterophilic antibody-blocking agent. *Clin Chem* 2001;47:2184-5.
119. Feldt-Rasmussen U, Petersen PH, Blaabjerg O and Horder M. Long-term variability in serum thyroglobulin and thyroid related hormones in healthy subjects. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1980;95:328-34.
120. Browning MCK, Ford RP, Callaghan SJ and Fraser CG. Intra- and interindividual biological variation of five analytes used in assessing thyroid function: implications for necessary standards of performance and the interpretation of results. *Clin Chem* 1986;32:962-6.
121. Lum SM and Nicoloff JT. Peripheral tissue mechanism for maintenance of serum triiodothyronine values in a thyroxine-deficient state in man. *J Clin Invest* 1984;73:570-5.
122. Spencer CA and Wang CC. Thyroglobulin measurement:- Techniques, clinical benefits and pitfalls. *Endocrinol Metab Clin N Amer* 1995;24:841-63.
123. Weeke J and Gundersen HJ. Circadian and 30 minute variations in serum TSH and thyroid hormones in normal subjects. *Acta Endocrinol* 1978;89:659-72.
124. Brabant G, Prank K, Hoang-Vu C and von zur Muhlen A. Hypothalamic regulation of pulsatile thyrotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:145-50.
125. Fraser CG, Petersen PH, Ricos C and Haeckel R. Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry. *Eur J Clin Chem Biochem* 1992;30:311-7.
126. Rodbard, D. Statistical estimation of the minimal detectable concentration (“sensitivity”) for radioligand assays. *Anal Biochem* 1978;90:1-12.
127. Ekins R and Edwards P. On the meaning of “sensitivity”. *Clin Chem* 1997;43:1824-31.
128. Fuentes-Arderiu X and Fraser CG. Analytical goals for interference. *Ann Clin Biochem* 1991;28:393-5.
129. Petersen PH, Fraser CG, Westgard JO and Larsen ML. Analytical goal-setting for monitoring patients when two analytical methods are used. *Clin Chem* 1992;38:2256-60.
130. Fraser CG and Petersen PH. Desirable standards for laboratory tests if they are to fulfill medical needs. *Clin Chem* 1993;39:1453-5.
131. Stockl D, Baadenhuijsen H, Fraser CG, Libeer JC, Petersen PH and Ricos C. Desirable routine analytical goals for quantities assayed in serum. Discussion paper from the members of the external quality assessment (EQA) Working Group A on analytical goals in laboratory medicine. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:157-69.
132. Plebani M, Giacomini A, Beghi L, de Paoli M, Roveroni G, Galeotti F, Corsini A and Fraser CG. Serum tumor markers in monitoring patients: interpretation of results using analytical and biological variation. *Anticancer Res* 1996;16:2249-52.
133. Browning MC, Bennet WM, Kirkaldy AJ and Jung RT. Intra-individual variation of thyroxine, triiodothyronine and thyrotropin in treated hypothyroid patients: implications for monitoring replacement therapy. *Clin Chem* 1988;34:696-9.
134. Harris EK. Statistical principles underlying analytic goal-setting in clinical chemistry. *Am J Clin Pathol* 1979;72:374-82.
135. Nelson JC and Wilcox RB. Analytical performance of free and total thyroxine assays. *Clin Chem* 1996;42:146-54.
136. Evans SE, Burr WA and Hogan TC. A reassessment of 8-anilino-1-naphthalene sulphonic acid as a thyroxine binding inhibitor in the radioimmunoassay of thyroxine. *Ann Clin Biochem* 1977;14:330-4.

137. Karapitta CD, Sotiroidis TG, Papadimitriou A and Xenakis A. Homogeneous enzyme immunoassay for triiodothyronine in serum. *Clin Chem* 2001;47:569-74.
138. De Brabandere VI, Hou P, Stockl D, Theinpont LM and De Leenheer AP. Isotope dilution-liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the determination of serum thyroxine as a potential reference method. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998;12:1099-103.
139. Tai SSC, Sniegoski LT and Welch MJ. Candidate reference method for total thyroxine in human serum: Use of isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. *Clin Chem* 2002;48:637-42.
140. Thienpont LM, Fierens C, De Leenheer AP and Przywara L. Isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/electro-spray ionization-tandem mass spectrometry for the determination of triiodo-L-thyronine in serum. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999;13:1924-31.
141. Sarne DH, Refetoff S, Nelson JC and Linarelli LG. A new inherited abnormality of thyroxine-binding globulin (TBG-San Diego) with decreased affinity for thyroxine and triiodothyronine. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:114-9.
142. Schussler GC. The thyroxine-binding proteins. *Thyroid* 2000;10:141-9.
143. Beck-Peccoz P, Romelli PB, Cattaneo MG, Faglia G, White EL, Barlow JW et al. Evaluation of free T4 methods in the presence of iodothyronine autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;58:736-9.
144. Sakata S, Nakamura S and Miura K. Autoantibodies against thyroid hormones or iodothyronine. *Ann Intern Med* 1985;103:579-89.
145. Despres N and Grant AM. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clin Chem* 1998;44:440-54.
146. Hay ID, Bayer MF, Kaplan MM, Klee GG, Larsen PR and Spencer CA. American Thyroid Association Assessment of Current Free Thyroid Hormone and Thyrotropin Measurements and Guidelines for Future Clinical Assays. *Clin Chem* 1991;37:2002 - 2008.
147. Ekins R. The science of free hormone measurement. *Proc UK NEQAS Meeting* 1998;3:35-59.
148. Wang R, Nelson JC, Weiss RM and Wilcox RB. Accuracy of free thyroxine measurements across natural ranges of thyroxine binding to serum proteins. *Thyroid* 2000;10:31-9.
149. Nelson JC, Wilcox BR and Pandian MR. Dependence of free thyroxine estimates obtained with equilibrium tracer dialysis on the concentration of thyroxine-binding globulin. *Clin Chem* 1992;38:1294-1300.
150. Ekins R. The free hormone hypothesis and measurement of free hormones. *Clin Chem* 1992;38:1289-93.
151. Ekins RP. Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clin Chem* 1998;44:2015-30.
152. Ekins R. Analytic measurements of free thyroxine. *Clin Lab Med* 1993;13:599-630.
153. Nusynowitz, M. L. Free-thyroxine index. *JAMA* 1975;232:1050.
154. Larsen PR, Alexander NM, Chopra IJ, Hay ID, Hershman JM, Kaplan MM et al. Revised nomenclature for tests of thyroid hormones and thyroid-related proteins in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:1089-94.
155. Burr WA, Evans SE, Lee J, Prince HP, Ramsden DB. The ratio of thyroxine to thyroxine-binding globulin measurement in the evaluation of thyroid function. *Clin Endocrinol* 1979;11:333-42.
156. Attwood EC and Atkin GE. The T4: TBG ratio: a re-evaluation with particular reference to low and high serum TBG levels. *Ann Clin Biochem* 1982;19:101-3.
157. Szpunar WE, Stoffer SS and DiGiulio W. Clinical evaluation of a thyroxine binding globulin assay in calculation a free thyroxine index in normal, thyroid disease and sick euthyroid patients. *J Nucl Med* 1987;28:1341-3.
158. Nelson JC and Tomei RT. Dependence of the thyroxin/thyroxin-binding globulin (TBG) ratio and the free thyroxin index on TBG concentrations. *Clin Chem* 1989;35:541-4.
159. Sterling K and Brenner MA. Free thyroxine in human serum: Simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *J Clin Invest* 1966;45:153-60.
160. Schulssler GC and Plager JE. Effect of preliminary purification of ¹³¹-Thyroxine on the determination of free thyroxine in serum. *J Clin Endocrinol* 1967;27:242-50.
161. Nelson JC and Tomei RT. A direct equilibrium dialysis/radioimmunoassay method for the measurement of free thyroxin in undiluted serum. *Clin Chem* 1988;34:1737-44.

162. Tikanoja SH. Ultrafiltration devices tested for use in a free thyroxine assay validated by comparison with equilibrium dialysis. *Scand J Clin Lab Invest* 1990;50:663-9.
163. Ellis SM and Ekins R. Direct measurement by radioimmunoassay of the free thyroid hormone concentrations in serum. *Acta Endocrinol (Suppl)* 1973;177:106-110.
164. Weeke J and Orskov H. Ultrasensitive radioimmunoassay for direct determination of free triiodothyronine concentration in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1975;35:237-44.
165. Surks MI, Hupart KH, Chao P and Shapiro LE. Normal free thyroxine in critical nonthyroidal illnesses measured by ultrafiltration of undiluted serum and equilibrium dialysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:1031-9.
166. Holm SS andreasen L, Hansen SH, Faber J and Staun-Olsen P. Influence of adsorption and deproteination on potential free thyroxine reference methods. *Clin Chem* 2002;48:108-114.
167. Jaume JC, Mendel CM, Frost PH, Greenspan FS, Laughton CW. Extremely low doses of heparin release lipase activity into the plasma and can thereby cause artifactual elevations in the serum-free thyroxine concentrations as measured by equilibrium dialysis. *Thyroid* 1996;6:79-83.
168. Stevenson HP, Archbold GP, Johnston P, Young IS, Sheridan B. Misleading serum free thyroxine results during low molecular weight heparin treatment. *Clin Chem* 1998;44:1002-7.
169. Laji K, Rhidha B, John R, Lazarus J and Davies JS. Artifactual elevations in serum free thyroxine and triiodothyronine concentrations during heparin therapy. *QJM* 2001;94:471-3.
170. Lim CF, Bai Y, Topliss DJ, Barlow JW and Stockigt JR. Drug and fatty acid effects on serum thyroid hormone binding. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:682-8.
171. Czako G, M. H. Zweig, C. Benson and M. Ruddel. On the albumin-dependence of measurements of free thyroxin. II Patients with non-thyroidal illness. *Clin Chem* 1987;33:87-92.
172. Csako G, Zweig MH, Glickman J, Ruddel M and K. J. Direct and indirect techniques for free thyroxin compared in patients with nonthyroidal illness. II. Effect of prealbumin, albumin and thyroxin-binding globulin. *Clin Chem* 1989;35:1655-62.
173. Csako G, Zweig MH, Glickman J, Kestner J and Ruddel M. Direct and indirect techniques for free thyroxin compared in patients with nonthyroidal illness. I. Effect of free fatty acids. *Clin Chem* 1989;35:102-9.
174. Ross HA and Benraad TJ. Is free thyroxine accurately measurable at room temperature? *Clin Chem* 1992;38:880-6.
175. Van der Sluijs Veer G, Vermes I, Bonte HA and Hoorn RKJ. Temperature effects on Free Thyroxine Measurement: Analytical and Clinical Consequences. *Clin Chem* 1992;38:1327-31.
176. Fisher DA. The hypothyroxinemia of prematurity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1701-3.
177. Stockigt JR, Stevens V, White EL and Barlow JW. Unbound analog radioimmunoassays for free thyroxin measure the albumin-bound hormone fraction. *Clin Chem* 1983;29:1408-10.
178. Aravelo G. Prevalence of familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia in serum samples received for thyroid testing. *Clin Chem* 1991;37:1430-1.
179. Sapin R and Gasser F. Anti-solid phase antibodies interfering in labeled-antibody assays for free thyroid hormones. *Clin Chem* 1995;45:1790-1.
180. Inada M and Sterling K. Thyroxine transport in thyrotoxicosis and hypothyroidism. *J Clin Invest* 1967;46:1442-50.
181. Lueprasitsakul W, Alex S, Fang SL, Pino S, Irmscher K, Kohrle J et al. Flavonoid administration immediately displaces thyroxine (T4) from serum transthyretin, increases serum free T4 and decreases serum thyrotropin in the rat. *Endocrinol* 1990;126:2890-5.
182. Stockigt JR, Lim CF, Barlow J, Stevens V, Topliss DJ, Wynne KN. High concentrations of furosemide inhibit plasma binding of thyroxine. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:62-6.
183. Hawkins RC. Furosemide interference in newer free thyroxine assays. *Clin Chem* 1998;44:2550-1.
184. Wang R, Nelson JC and Wilcox RB. Salsalate and salicylate binding to and their displacement of thyroxine from thyroxine-binding globulin, transthyrin and albumin. *Thyroid* 1999;9:359-64.
185. Munro SL, Lim C-F, Hall JG, Barlow JW, Craik DJ, Topliss DJ and Stockigt JR. Drug competition for thyroxine binding to transthyretin (prealbumin): comparison with effects on thyroxine-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:1141-7.
186. Stockigt JR, Lim C-F, Barlow JW and Topliss DJ. 1997. Thyroid hormone transport. Springer Verlag, Heidelberg. 119 pp.

187. Surks MI and Defesi CR. Normal free thyroxine concentrations in patients treated with phenytoin or carbamazepine: a paradox resolved. *JAMA* 1996;275:1495-8.
188. Ross HA. A dialysis method for the measurement of free iodothyronine and steroid hormones in blood. *Experientia* 1978;34:538-9.
189. Sapin R. Serum thyroxine binding capacity-dependent bias in five free thyroxine immunoassays: assessment with serum dilution experiments and impact on diagnostic performance. *Clin Biochem* 2001;34:367-71.
190. Law LK, Cheung CK and Swaminathan R. Falsely high thyroxine results by fluorescence polarization in sera with high background fluorescence. *Clin Chem* 1988;34:1918.
191. Kricka LJ. Interferences in Immunoassay - still a threat. *Clin Chem* 2000;46:1037-8.
192. McBride JH, Rodgerson DO and Allin RE. Choriogonadotrophin interference in a sensitive assay for Thyrotropin. *Clin Chem* 1987;33:1303-4.
193. Ritter D, Stott R, Grant N and Nahm MH. Endogenous antibodies that interfere with Thyroxine fluorescence polarization assay but not with radioimmunoassay or EMIT. *Clin Chem* 1993;39:508-11.
194. DeGroot LJ, Larsen PR, Refetoff S and Stanbury JB. *The Thyroid and its Diseases*. Fifth Edition, 1984; John Wiley & Sons, Inc., New York:266-7.
195. Beck-Peccoz P, Amr S, Menezes-Ferreira NM, Faglia G and Weintraub BD. Decreased receptor binding of biologically inactive thyrotropin in central hypothyroidism: effect of treatment with thyrotropin-releasing hormone. *N Engl J Med* 1985;312:1085-90.
196. Beck-Peccoz P and Persani L. Variable biological activity of thyroid-stimulating hormone. *Eur J Endocrinol* 1994;131:331-40.
197. Persani L, Ferretti E, Borgato S, Faglia G and Beck-Peccoz P. Circulating thyrotropin bioactivity in sporadic central hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3631-5.
198. Rafferty B and Gaines Das R. Comparison of pituitary and recombinant human thyroid-stimulating hormone (rhTSH) in a multicenter collaborative study: establishment of the first World Health Organization reference reagent for rhTSH. *Clin Chem* 1999;45:2207-15.
199. Persani L, Borgato S, Romoli R, Asteria C, Pizzocaro A and Beck-Peccoz P. Changes in the degree of sialylation of carbohydrate chains modify the biological properties of circulating thyrotropin isoforms in various physiological and pathological states. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2486-92.
200. Gershengorn MC and Weintraub BD. Thyrotropin-induced hyperthyroidism caused by selective pituitary resistance to thyroid hormone. A new syndrome of "inappropriate secretion of TSH". *J Clin Invest* 1975;56:633-42.
201. Faglia G, Beck-Peccoz P, Piscitelli G and Medri G. Inappropriate secretion of thyrotropin by the pituitary. *Horm Res* 1987;26:79-99.
202. Spencer CA, Takeuchi M and Kazarosyan M. Current status and performance goals for serum thyrotropin (TSH) assays. *Clinical Chemistry* 1996;42:141-145.
203. Laurberg P. Persistent problems with the specificity of immunometric TSH assays. *Thyroid* 1993;3:279-83.
204. Spencer CA, Schwarzbein D, Guttler RB, LoPresti JS and Nicoloff JT. TRH stimulation test responses employing third and fourth generation TSH assays. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:494-498.
205. Vogeser M, Weigand M, Fraunberger P, Fischer H and Cremer P. Evaluation of the ADVIA Centaur TSH-3 assay. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:331-4.
206. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyn M, MacKenzie F, Beckett GJ and Wilkinson E. Interlaboratory/intermethod differences in functional sensitivity of immunometric assays for thyrotropin (TSH): impact on reliability of measurement of subnormal concentration. *Clin Chem* 1995;41:367-74.
207. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, Evans JG, Young E, Bird T and Smith PA. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin Endocrinol* 1977;7:481-93.
208. Rago T, Chiovato L, Grasso L, Pinchera A and Vitti P. Thyroid ultrasonography as a tool for detecting thyroid autoimmune diseases and predicting thyroid dysfunction in apparently healthy subjects. *J Endocrinol Invest* 2001;24:763-9.

209. Hershman JM and Pittman JA. Utility of the radioimmunoassay of serum thyrotropin in man. *Ann Intern Med* 1971;74:481-90.
210. Becker DV, Bigos ST, Gaitan E, Morris JC, Rallison ML, Spencer CA, Sugawara M, Middlesworth LV and Wartofsky L. Optimal use of blood tests for assessment of thyroid function. *JAMA* 1993;269:2736.
211. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G and Ridgway EC. The Colorado Thyroid Disease Prevalence Study. *Arch Intern Med* 2000;160:19-27.
212. Skamene A and Patel YC. Infusion of graded concentrations of somatostatin in man: pharmacokinetic and differential inhibitory effects on pituitary and islet hormones. *Clin Endocrinol* 1984;20:555-64.
213. Berghout A, Wiersinga WM, Smits NJ and Touber JL. Interrelationships between age, thyroid volume, thyroid nodularity and thyroid function in patients with sporadic nontoxic goiter. *Am J Med* 1990;89:602-8.
214. Parle JV, Franklyn JA, Cross KW, Jones SC and Sheppard MC. Prevalence and follow-up of abnormal thyrotropin (TSH) concentrations in the elderly in the United Kingdom. *Clin Endocrinol* 1991;34:77-83.
215. Danese D, Sciacchitano S, Farsetti A, Andreoli M and Pontecorvi A. Diagnostic accuracy of conventional versus sonography-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *Thyroid* 1998;8:15-21.
216. McDermott MT and Ridgway EC. Subclinical hypothyroidism is mild thyroid failure and should be treated. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4585-90.
217. Chu JW and Crapo LM. The treatment of subclinical hypothyroidism is seldom necessary. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4591-9.
218. Lewis GF, Alessi CA, Imperial JG and Refetoff S. Low serum free thyroxine index in ambulating elderly is due to a resetting of the threshold of thyrotropin feedback suppression. *JCEM* 1991;73:843-9.
219. Pearce CJ and Himsworth RL. Total and free thyroid hormone concentrations in patients receiving maintenance replacement treatment with thyroxine. *Br Med J* 1984;288:693-5.
220. Fish LH, Schwarz HL, Cavanaugh MD, Steffes MW, Bantle JP, Oppenheimer JH. Replacement dose, metabolism and bioavailability of levothyroxine in the treatment of hypothyroidism. *N Engl J Med* 1987;316:764-70.
221. Sawin CT, Herman T, Molitch ME, London MH and Kramer SM. Aging and the thyroid. Decreased requirement for thyroid hormone in older hypothyroid patients. *Amer J Med* 1983;75:206-9.
222. Davis FB, LaMantia RS, Spaulding SW, Wemann RE and Davis PJ. Estimation of a physiologic replacement dose of levothyroxine in elderly patients with hypothyroidism. *Arch Intern Med* 1984;144.
223. Arafah BM. Estrogen therapy may necessitate an increase in thyroxine dose for hypothyroidism. *NEJM* 2001;344:1743-9.
224. Scheithauer BW, Kovacs K, Randall RV and Ryan N. Pituitary gland in hypothyroidism. Histologic and immunocytologic study. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:499-504.
225. Ain KB, Pucino F, Shiver T and Banks SM. Thyroid hormone levels affected by time of blood sampling in thyroxine-treated patients. *Thyroid* 1993;3:81-5.
226. Chorazy PA, Himelhoch S, Hopwood NJ, Greger NG and Postellon DC. Persistent hypothyroidism in an infant receiving a soy formula: case report and review of the literature. *Pediatrics* 1995;96:148-50.
227. Dulgeroff AJ and Hershman JM. Medical therapy for differentiated thyroid carcinoma. *Endocrinol Rev* 1994;15:500-15.
228. Pujol P, Daures JP, Nsakala N, Baldet L, Bringer J and Jaffiol C. Degree of thyrotropin suppression as a prognostic determinant in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4318-23.
229. Cooper DS, Specker B, Ho M, Sperling M, Ladenson PW, Ross DS, Ain KB, Bigos ST, Brierley JD, Haugen BR, Klein I, Robbins J, Sherman SI, Taylor T and Maxon HR 3rd. Thyrotropin suppression and disease progression in patients with differentiated thyroid cancer: results from the National thyroid Cancer Treatment Cooperative Registry. *Thyroid* 1999;8:737-44.

230. Hurley DL and Gharib H. Evaluation and management of multinodular goiter. *Otolaryngol Clin North Am* 1996;29:527-40.
231. Bayer MF, Macoviak JA and McDougall IR. Diagnostic performance of sensitive measurements of serum thyrotropin during severe nonthyroidal illness: Their role in the diagnosis of hyperthyroidism. *Clin Chem* 1987;33:2178-84.
232. Lum SM, Kaptein EM and Nicoloff JT. Influence of nonthyroidal illnesses on serum thyroid hormone indices in hyperthyroidism. *West J Med* 1983;138:670-5.
233. Faglia G, Bitensky L, Pinchera A, Ferrari C, Paracchi A, Beck-Peccoz P, Ambrosi B and Spada A. Thyrotropin secretion in patient with central hypothyroidism: Evidence for reduced biological activity of immunoreactive thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;48:989-98.
234. Faglia G, Beck-Peccoz P, Ballabio M and Nava C. Excess of beta-subunit of thyrotropin (TSH) in patients with idiopathic central hypothyroidism due to the secretion of TSH with reduced biological activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:908-14.
235. Faglia G. The clinical impact of the thyrotropin-releasing hormone test. *Thyroid* 1998;8:903-8.
236. Trejbal D, Sulla I, Trejbalova L, Lazurova I, Schwartz P and Machanova Y. Central hypothyroidism - various types of TSH responses to TRH stimulation. *Endocr Regul* 1994;28:35-40.
237. Faglia G, Ferrari C, Paracchi A, Spada A and Beck-Peccoz P. Triiodothyronine response to thyrotropin releasing hormone in patients with hypothalamic-pituitary disorders. *Clin Endocrinol* 1975;4:585-90.
238. Horimoto M, Nishikawa M, Ishihara T, Yoshikawa N, Yoshimura M and Inada M. Bioactivity of thyrotropin (TSH) in patients with central hypothyroidism: comparison between in vivo 3,5,3'-triiodothyronine response to TSH and in vitro bioactivity of TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1124-8.
239. Refetoff S, Weiss RE and Usala SJ. The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr Rev* 1993;14:348-99.
240. Weiss RE, Hayashi Y, Nagaya T, Petty KJ, Murata Y, Tunca H, Seo H and Refetoff S. Dominant inheritance of resistance to thyroid hormone not linked to defects in the thyroid hormone receptors alpha or beta genes may be due to a defective co-factor. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4196-203.
241. Snyder D, Sesser D, Skeels M et al. Thyroid disorders in newborn infants with elevated screening T4. *Thyroid* 1997;7 (Suppl 1):S1-29 (abst).
242. Refetoff S. 2000. Resistance to Thyroid Hormone. *In The Thyroid*. Braverman LE and Utiger RD, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1028-43.
243. Beck-Peccoz P and Chatterjee VKK. The variable clinical phenotype in thyroid hormone resistance syndrome. *Thyroid* 1994;4:225-32.
244. Persani L, Asteria C, Tonacchera M, Vitti P, Krishna V, Chatterjee K and Beck-Peccoz P. Evidence for the secretion of thyrotropin with enhanced bioactivity in syndromes of thyroid hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1034-9.
245. Sarne DH, Sobieszczyk S, Ain KB and Refetoff S. Serum thyrotropin and prolactin in the syndrome of generalized resistance to thyroid hormone: responses to thyrotrophin-releasing hormone stimulation and triiodothyronine suppression. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1305-11.
246. Ercan-Fang S, Schwartz HL, Mariash CN and Oppenheimer JH. Quantitative assessment of pituitary resistance to thyroid hormone from plots of the logarithm of thyrotropin versus serum free thyroxine index. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2299-303.
247. Safer JD, Colan SD, Fraser LM and Wondisford FE. A pituitary tumor in a patient with thyroid hormone resistance: a diagnostic dilemma. *Thyroid* 2001;11:281-91.
248. Marcocci C and Chiovato L. 2000. Thyroid -directed antibodies. *In Thyroid*. B. L. a. U. RD, editor. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 414-31.
249. Chiovato L, Bassi P, Santini F, Mammoli C, Lapi P, Carayon P and Pinchera A. Antibodies producing complement-mediated thyroid cytotoxicity in patients with atrophic or goitrous autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1700-5.
250. Guo J, Jaime JC, Rapoport B and McLachlan SM. Recombinant thyroid peroxidase-specific Fab converted to immunoglobulin G (IgG)molecules: evidence for thyroid cell damage by IgG1, but not IgG4, autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:925-31.

251. Doullay F, Ruf J, Codaccioni JL and Carayon P. Prevalence of autoantibodies to thyroperoxidase in patients with various thyroid and autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1991;9:237-44.
252. Radetti G, Persani L, Moroder W, Cortelazzi D, Gentili L, Beck-Peccoz P. Transplacental passage of anti-thyroid autoantibodies in a pregnant woman with auto-immune thyroid disease. *Prenatal Diagnosis* 1999;19:468-71.
253. Heithorn R, Hauffa BP and Reinwein D. Thyroid antibodies in children of mothers with autoimmune thyroid disorders. *Eur J Pediatr* 1999;158:24-8.
254. Feldt-Rasmussen. Anti-thyroid peroxidase antibodies in thyroid disorders and non thyroid autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1991;9:245-51.
255. Mariotti S, Chiovato L, Franceschi C and Pinchera A. Thyroid autoimmunity and aging. *Exp Gerontol* 1999;33:535-41.
256. Ericsson UB, Christensen SB and Thorell JI. A high prevalence of thyroglobulin autoantibodies in adults with and without thyroid disease as measured with a sensitive solid-phase immunosorbent radioassay. *Clin Immunol Immunopathol* 1985;37:154-62.
257. Feldt-Rasmussen U, Hoier-Madsen M, Rasmussen NG, Hegedus L and Hornnes P. Anti-thyroid peroxidase antibodies during pregnancy and postpartum. Relation to postpartum thyroiditis. *Autoimmunity* 1990;6:211-4.
258. Premawardhana LD, Parkes AB, AMMARI F, John R, Darke C, Adams H and Lazarus JH. Postpartum thyroiditis and long-term thyroid status: prognostic influence of Thyroid Peroxidase Antibodies and ultrasound echogenicity. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:71-5.
259. Johnston AM and Eagles JM. Lithium-associated clinical hypothyroidism. Prevalence and risk factors. *Br. J Psychiatry* 1999;175:336-9.
260. Bell TM, Bansal AS, Shorthouse C, Sandford N and Powell EE. Low titre autoantibodies predict autoimmune disease during interferon alpha treatment of chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:419-22.
261. Ward DL and Bing-You RG. Autoimmune thyroid dysfunction induced by interfereon-alfa treatment for chronic hepatitis C: screening and monitoring recommendations. *Endoc Pract* 2001;7:52-8.
262. Carella C, Mazziotti G, Morisco F, Manganello G, Rotondi M, Tuccillo C, Sorvillo F, Caporaso N and Amato G. Long-term outcome of interferon-alpha-induced thyroid autoimmunity and prognostic influence of thyroid autoantibody pattern at the end of treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1925-9.
263. Feldt-Rasmussen U, Schleusener H and Carayon P. Meta-analysis evaluation of the impact of thyrotropin receptor antibodies on long term remission after medical therapy of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:98-103.
264. Estienne V, Duthoit C, Di Costanzo, Lejeune PJ, Rotondi M, Kornfeld S et al. Multicenter study on TGPO autoantibodies prevalence in various thyroid and non-thyroid diseases: relationships with thyroglobulin and thyroperoxidase autoantibody parameters. *Eur J Endocrinol* 1999;141:563-9.
265. Czarnocka B, Ruf J, Ferrand M et al. Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett* 1985;190:147-52.
266. Mariotti S, Caturegli P, Piccolo P, Barbesino G and Pinchera A. Antithyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:661-9.
267. Rubello D, Pozzan GB, Casara D, Girelli ME, Boccato s, Rigon F, Baccichetti C, Piccolo M, Betterle C and Busnardo B. Natural course of subclinical hypothyroidism in Down's syndrome: prospective study results and therapeutic considerations. *J Endocrinol Invest* 1995;18:35-40.
268. Karlsson B, Gustafsson J, Hedov G, Ivarsson SA and Anneren G. Thyroid dysfunction in Down's syndrome: relation to age and thyroid autoimmunity. *Arch Dis Child* 1998;79:242-5.
269. Bussen S, Steck T and Dietl J. Increased prevalence of thyroid antibodies in euthyroid women with a history of recurrent in-vitro fertilization failure. *Hum Reprod* 2000;15:545-8.
270. Phan GQ, Attia P, Steinberg SM, White DE and Rosenberg SA. Factors associated with response to high-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19:3477-82.
271. Durelli L, Ferrero B, Oggero A, Verdun E, Ghezzi A, Montanari E and Zaffaroni M. Thyroid function and autoimmunity during interferon-Beta-1b Treatment: a Multicenter Prospective Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3525-32.

272. Roti E, Minelli R, Giuberti T, Marchelli C, Schianchi C, Gardini E, Salvi M, Fiaccadori F, Ugolotti G, Neri TM and Braverman LE. Multiple changes in thyroid function in patients with chronic active HCV hepatitis treated with recombinant interferon-alpha. *Am J Med* 1996;101:482-7.
273. Ruf J, Carayon P and Lissitzky S. Various expression of a unique anti-human thyroglobulin antibody repertoire in normal state and autoimmune disease. *Eur J Immunol* 1985;15:268-72.
274. Ruf J, Toubert ME, Czarnocka B, Durand-Gorde JM, Ferrand M, Carayon P. Relationship between immunological structure and biochemical properties of human thyroid peroxidase. *Endocrinol* 1989;125:1211-8.
275. Feldt-Rasmussen U and Rasmussen A K. Serum thyroglobulin (Tg) in presence of thyroglobulin autoantibodies (TgAb). Clinical and methodological relevance of the interaction between Tg and TgAb in vivo and in vitro. *J Endocrinol Invest* 1985;8:571-6.
276. Spencer CA, Wang C, Fatemi S, Guttler RB, Takeuchi M and Kazarosyan M. Serum Thyroglobulin Autoantibodies: Prevalence, influence on serum thyroglobulin measurement and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1121-7.
277. Pacini F, Mariotti S, Formica N and Elisei R. Thyroid autoantibodies in thyroid cancer: Incidence and relationship with tumor outcome. *Acta Endocrinol* 1988;119:373-80.
278. Rubello D, Casara D, Girelli ME, Piccolo M and Busnardo B. Clinical meaning of circulating antithyroglobulin antibodies in differentiated thyroid cancer: a prospective study. *J Nucl Med* 1992;33:1478-80.
279. Nordyke RA, Gilbert FI, Miyamoto LA and Fleury KA. The superiority of antimicrobial over antithyroglobulin antibodies for detecting Hashimoto's thyroiditis. *Arch Intern Med* 1993;153:862-5.
280. Di Cerbo A, Di Paola R, Menzaghi C, De Filippis V, Tahara K, Corda D et al. Graves' immunoglobulins activate phospholipase A2 by recognizing specific epitopes on the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3283-92.
281. Kung AWC, Lau KS and Kohn LD. Epitope mapping of TSH Receptor-blocking antibodies in Graves' disease that appear during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3647-53.
282. Ueta Y, Fukui H, Murakami M, Yamanouchi Y, Yamamoto R, Murao A et al. Development of primary hypothyroidism with the appearance of blocking-type antibody to thyrotropin receptor in Graves' disease in late pregnancy. *Thyroid* 1999;9:179-82.
283. Gupta MK. Thyrotropin-receptor antibodies in thyroid diseases: advances in detection techniques and clinical application. *Clin Chem Acta* 2000;293:1-29.
284. Kung AW, Lau KS and Kohn LD. Characterization of thyroid-stimulating blocking antibodies that appeared during transient hypothyroidism after radioactive iodine therapy. *Thyroid* 2000;10:909-17.
285. Filetti S, Foti D, Costante G and Rapoport B. Recombinant human thyrotropin (TSH) receptor in a radioreceptor assay for the measurement of TSH receptor antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1096-101.
286. Adams DD and Purves HD. Abnormal responses in the assay of thyrotropin. *Proc Univ Otago Med Sch* 1956;34:11-12.
287. Morgenthaler NG. New assay systems for thyrotropin receptor antibodies. *Current Opinion Endocrinol Diabetes* 1998;6:251-60.
288. Kamijo K, Nagata A and Sato Y. Clinical significance of a sensitive assay for thyroid-stimulating antibodies in Graves' disease using polyethylene glycol at high concentration and porcine thyroid cells. *Endocrinol J* 1999;46:397-403.
289. Takasu N, Yamashiro K, Ochi Y, Sato Y, Nagata A, Komiya I et al. TSBAb (TSH-Stimulation Blocking Antibody) and TSAb (Thyroid Stimulating Antibody) in TSBAb-positive patients with hypothyroidism and Graves' patients with hyperthyroidism. *Horm Metab Res* 2001;33:232-7.
290. Costagliola S, Swillens S, Niccoli P, Dumont JE, Vassart G and Ludgate M. Binding assay for thyrotropin receptor autoantibodies using the recombinant receptor protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1540-44.
291. Morgenthaler NG, Hodak K, Seissler J, Steinbrenner H, Pampel I, Gupta M et al. Direct binding of thyrotropin receptor autoantibody to in vitro translated thyrotropin receptor: a comparison to radioreceptor assay and thyroid stimulating bioassay. *Thyroid* 1999;9:466-75.

292. Akamizu T, Inoue D, Kosugi S, Kohn LD and Mori T. Further studies of amino acids (268-304) in thyrotropin (TSH)-lutropin/chorionic gonadotropin (LH/CG) receptor chimeras: Cysteine-301 is important in TSH binding and receptor tertiary structure. *Thyroid* 1994;4:43-8.
293. Grasso YZ, Kim MR, Faiman C, Kohn LD, Tahara K and Gupta MK. Epitope heterogeneity of thyrotropin-blocking antibodies in Graves' patients as detected with wild-type versus chimeric thyrotropin receptors. *Thyroid* 1999;9:521-37.
294. Kim WB, Chung HK, Lee HK, Kohn LD, Tahara K and Cho BY. Changes in epitopes for thyroid stimulation antibodies in Graves' disease sera during treatment of hyperthyroidism: Therapeutic implications. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1953-9.
295. Shewring G and Smith BR. An improved radioreceptor assay for TSH receptor. *Methods Enzymol* 1982;17:409-17.
296. Costagliola S, Morgenthaler NG, Hoermann R, Badenhop K, Struck J, Freitag D, Poertl S, Weglohner W, Hollidt JM, Quadbeck B, Dumont JE, Schumm-Draeger PM, Bergmann A, Mann K, Vassart G and Usadel KH. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:90-7.
297. Schott M, Feldkamp J, Bathan C, Fritzen R, Scherbaum WA and Seissler J. Detecting TSH-Receptor antibodies with the recombinant TBII assay: Technical and Clinical evaluation. 32 2000;429-35.
298. Feldt-Rasmussen U. Analytical and clinical performance goals for testing autoantibodies to thyroperoxidase, thyroglobulin and thyrotropin receptor. *Clin Chem* 1996;42:160-3.
299. Giovanella L, Ceriani L and Garancini S. Clinical applications of the 2nd. generation assay for anti-TSH receptor antibodies in Graves' disease. Evaluation in patients with negative 1st. generation test. *Clin Chem Lab med* 2001;39:25-8.
300. Momotani N, Noh JY, Ishikawa N and Ito K. Effects of propylthiouracil and methimazole on fetal thyroid status in mothers with Graves' hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3633-6.
301. Brown RS, Bellisario RL, Botero D, Fournier L, Abrams CA, Cower ML et al. Incidence of transient congenital hypothyroidism due to maternal thyrotropin receptor-blocking antibodies in over one million babies. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1147-51.
302. Gerding MN, van der Meer Jolanda WC, Broenink M, Bakker O, W. WM and Prummel MF. Association of thyrotropin receptor antibodies with the clinical features of Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol* 2000;52:267-71.
303. Bartelena L, Marcocci C, Bogazzi F, Manetti L, Tanda ML, Dell'Unto E et al. Relation between therapy for hyperthyroidism and the course of Graves' disease. *N Engl J Med* 1998;338:73-8.
304. Bech K. Immunological aspects of Graves' disease and importance of thyroid stimulating immunoglobulins. *Acta Endocrinol (Copenh) Suppl* 1983;103:5-38.
305. Feldt-Rasmussen U. Serum thyroglobulin and thyroglobulin autoantibodies in thyroid diseases. Pathogenic and diagnostic aspects. *Allergy* 1983;38:369-87.
306. Nygaard B, Metcalfe RA, Phipps J, Weetman AP and Hegedus L. Graves' disease and thyroid-associated ophthalmopathy triggered by 131I treatment of non-toxic goitre. *J Endocrinol Invest* 1999;22:481-5.
307. Ericsson UB, Tegler L, Lennquist S, Christensen SB, Stahl E and Thorell JI. Serum thyroglobulin in differentiated thyroid carcinoma. *Acta Chir Scand* 1984;150:367-75.
308. Haugen BR, Pacini F, Reinert C, Schlumberger M, Ladenson PW, Sherman SI, Cooper DS, Graham KE, Braverman LE, Skarulis MC, Davies TF, DeGroot LJ, Mazzaferri EL, Daniels GH, Ross DS, Luster M, Samuels MH, Becker DV, Maxon HR, Cavalieri RR, Spencer CA, McEllin K, Weintraub BD and Ridgway EC. A comparison of recombinant human thyrotropin and thyroid hormone withdrawal for the detection of thyroid remnant or cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3877-85.
309. Spencer CA, LoPresti JS, Fatemi S and Nicoloff JT. Detection of residual and recurrent differentiated thyroid carcinoma by serum Thyroglobulin measurement. *Thyroid* 1999;9:435-41.
310. Schlumberger M, C. P., Fragu P, Lumbroso J, Parmentier C and Tubiana M. Circulating thyrotropin and thyroid hormones in patients with metastases of differentiated thyroid carcinoma: relationship to serum thyrotropin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:513-9.
311. Pacini F, Fugazzola L, Lippi F, Ceccarelli C, Centoni R, Miccoli P, Elisei R and Pinchera A. 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* 1992;74:1401-4.

312. Spencer CA, Takeuchi M and Kazarosyan M. Current Status and Performance Goals for Serum Thyroglobulin Assays. *Clin Chem* 1996;42:164-73.
313. Feldt-Rasmussen U and Schlumberger M. European interlaboratory comparison of serum thyroglobulin measurement. *J Endocrinol Invest* 1988;11:175-81.
314. Feldt-Rasmussen U, Profilis C, Colinet E, Black E, Bornet H, Bourdoux P et al. Human thyroglobulin reference material (CRM 457) 2nd part: Physicochemical characterization and certification. *Ann Biol Clin* 1996;54:343-348.
315. Schlumberger M J. Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma. *NEJM* 1998;338:297-306.
316. Hjiyiannakis P, Mundy J and Harmer C. Thyroglobulin antibodies in differentiated thyroid cancer. *Clin Oncol* 1999;11:240-4.
317. Spencer CA. Recoveries cannot be used to authenticate thyroglobulin (Tg) measurements when sera contain Tg autoantibodies. *Clin Chem* 1996;42:661-3.
318. Massart C and Maugendre D. Importance of the detection method for thyroglobulin antibodies for the validity of thyroglobulin measurements in sera from patients with Graves' disease. *Clin Chem* 2002;48:102-7.
319. Mariotti S, Barbesino G, Caturegli P, Marino M, Manetti L, Pacini F, Centoni R and Pinchera A. Assay of thyroglobulin in serum with thyroglobulin autoantibodies: an unobtainable goal? *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:468-72.
320. Black EG and Hoffenberg R. Should one measure serum thyroglobulin in the presence of anti-thyroglobulin antibodies? *Clin Endocrinol* 1983;19:597-601.
321. Schneider AB and Pervos R. Radioimmunoassay of human thyroglobulin: effect of antithyroglobulin autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;47:126-37.
322. Spencer CA, Platler BW and Nicoloff JT. The effect of 125-I thyroglobulin tracer heterogeneity on serum Tg RIA measurement. *Clin Chem Acta* 1985;153:105-115.
323. Bugalho MJ, Domingues RS, Pinto AC, Garrao A, Catarino AL, Ferreira T, Limbert E and Sobrinho L. Detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of individuals with and without thyroid glands: evidence for thyroglobulin expression by blood cells. *Eur J Endocrinol* 2001;145:409-13.
324. Bellantone R, Lombardi CP, Bossola M, Ferrante A, Princi P, Boscherini M et al. Validity of thyroglobulin mRNA assay in peripheral blood of postoperative thyroid carcinoma patients in predicting tumor recurrence varies according to the histologic type: results of a prospective study. *Cancer* 2001;92:2273-9.
325. Bojunga J, Roddiger S, Stanisch M, Kusterer K, Kurek R, Renneberg H, Adams S, Lindhorst E, Usadel KH and Schumm-Draeger PM. Molecular detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease by RT-PCR. *Br J Cancer* 2000;82:1650-5.
326. Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C and Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;338:1227-9.
327. Luppi M, Morselli M, Bandieri E, Federico M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari MG, Savarino M, Frassoldati A and Torelli G. Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction of maspin gene. *Ann Oncol* 1996;7:619-24.
328. Ghossein RA and Bhattacharya S. Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. *Eur J Cancer* 2000;36:1681-94.
329. Ditkoff BA, Marvin MR, Yemul S, Shi YJ, Chabot J, Feind C et al. Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood. *Surgery* 1996;120:959-65.
330. Arturi F, Russo D, Giuffrida D et al. Early diagnosis by genetic analysis of differentiated thyroid cancer metastases in small lymph nodes. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1638-41.

331. Ringel MD, Balducci-Silano PL anderson JS, Spencer CA, Silverman J, Sparling YH, Francis GL, Burman KD, Wartofsky L, Ladenson PW, Levine MA and Tuttle RM. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;84:4037-42.
332. Biscolla RP, Cerutti JM and Maciel RM. Detection of recurrent thyroid cancer by sensitive nested reverse transcription-polymerase chain reaction of thyroglobulin and sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid transcripts in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3623-7.
333. Takano T, Miyauchi A, Yoshida H, Hasegawa Y, Kuma K and Amino N. Quantitative measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of patients after total thyroidectomy. *Br J Cancer* 2001;85:102-6.
334. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC and Kahn A. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2617-21.
335. Premawardhana LDKE, Phillips DW, Prentice LM and Smith BR. Variability of serum thyroglobulin levels is determined by a major gene. *Clin Endocrinol* 1994;41:725-9.
336. Bertelsen JB and Hegedus L. Cigarette smoking and the thyroid. *Thyroid* 1994;4:327-31.
337. Knudsen N, Bulow I, Jorgensen T, Perrild H, Oversen L and Laurberg P. Serum Tg - a sensitive marker of thyroid abnormalities and iodine deficiency in epidemiological studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3599-603.
338. Van den Briel T, West CE, Hautvast JG, Vulsmas T, de Vijlder JJ and Ategbo EA. Serum thyroglobulin and urinary iodine concentration are the most appropriate indicators of iodine status and thyroid function under conditions of increasing iodine supply in schoolchildren in Benin. *J Nutr* 2001;131:2701-6.
339. Gardner DF, Rothman J and Utiger RD. Serum thyroglobulin in normal subjects and patients with hyperthyroidism due to Graves' disease: effects of T3, iodide, 131I and antithyroid drugs. *Clin Endocrinol* 1979;11:585-94.
340. Feldt-Rasmussen U, Petersen PH, Date J and Madsen CM. Serum thyroglobulin in patients undergoing subtotal thyroidectomy for toxic and nontoxic goiter. *J Endocrinol Invest* 1982;5:161-4.
341. Hocevar M, Auersperg M and Stanovnik L. The dynamics of serum thyroglobulin elimination from the body after thyroid surgery. 1997;23:208-10.
342. Cohen JH, Ingbar SH and Braverman LE. Thyrotoxicosis due to ingestion of excess thyroid hormone. *Endocrine Rev* 1989;10:113-24.
343. Mitchell ML and Hermos RJ. Measurement of thyroglobulin in newborn screening specimens from normal and hypothyroid infants. *Clin Endocrinol* 1995;42:523-7.
344. Smallridge RC, De Keyser FM, Van Herle AJ, Butkus NE and Wartofsky L. Thyroid iodine content and serum thyroglobulin: clues to the natural history of destruction-induced thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:1213-9.
345. Pacini F, Molinaro E, Lippi F, Castagna MG, Agate L, Ceccarelli C, Taddei D, Elisei R, Capezzone M and Pinchera A. Prediction of disease status by recombinant human TSH-stimulated serum Tg in the postsurgical follow-up of differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5686-90.
346. Cobin RH. 1992. Medullary carcinoma of the thyroid. *In* Malignant tumors of the thyroid: clinical concepts and controversies. S. D. Cobin RH, editor. Springer-Verlag., New York. 112-41.
347. Dunn JT. When is a thyroid nodule a sporadic medullary carcinoma? *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:824-5.
348. Pacini F, Fontanelli M, Fugazzola L and et. al. Routine measurement of serum calcitonin in nodular thyroid diseases allows the preoperative diagnosis of unsuspected sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:826-9.
349. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993;363:458-60.
350. Hofstra RM, Landvaster RM, Ceccherini I et al. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 1994;367:375-6.
351. Heyningen van V. One gene-four syndromes. *Nature* 1994;367:319-20.

352. Becker KL, Nylen ES, Cohen R and Snider RH. Calcitonin: structure, molecular biology and actions. In: J.P. Belezian, L.E. Raisz, G.A. Rodan eds. Principle of bone biology, Academic Press, San Diego 1996;:471-4.
353. Motte P, Vauzelle P, Gardet P, Ghillani P, Caillou B, Parmentier C et al. Construction and clinical validation of a sensitive and specific assay for mature calcitonin using monoclonal anti-peptide antibodies. Clin Chim Acta 1988;174:35-54.
354. Zink A, Blind E and Raue F. Determination of serum calcitonin by immunometric two-site assays in normal subjects and patients with medullary thyroid carcinoma. Eur J Clin Chem Biochem 1992;30:831-5.
355. Engelbach M, Gorges R, Forst T, Pftzner A, Dawood R, Heerdt S, Kunt T, Bockisch A and Beyer J. Improved diagnostic methods in the follow-up of medullary thyroid carcinoma by highly specific calcitonin measurements. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:1890-4.
356. Milhaud G, Tubiana M, Parmentier C and Coutris G. Epithelioma de la thyroïde secretant de la thyrocalcitonine. C.R. Acad. Sci (serie D), Paris 1968;266:608-10.
357. Guilloteau D, Perdrisot D, Calmettes C and et. al. Diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid by calcitonin assay using monoclonal antibodies. J Clin Endocrinol Metab 1990;71:1064-7.
358. Niccoli P, Wion-Barbot N, Caron P and et.al. Interest of routine measurement of serum calcitonin (CT): study in a large series of thyroidectomized patients. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:338-41.
359. Wells SA, Baylin SB, Linehan W, Farrell RE, Cox EB, Cooper CW. Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. Ann Surg 1978;188:139-41.
360. Gagel RF. The abnormal pentagastrin test. Clin Endocrinol 1996;44:221-2.
361. Wion-Barbot N, Schuffenecker I, Niccoli P et al. Results of the calcitonin stimulation test in normal volunteers compared with genetically unaffected members of MEN 2A and familial medullary thyroid carcinoma families. Ann Endocrinol 1997;58:302-8.
362. Barbot N, Calmettes C, Schuffenecker I et al. Pentagastrin stimulation test and early diagnosis of medullary carcinoma using an immunoradiometric assay of calcitonin: comparison with genetic screening in hereditary medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 1994;78:114-20.
363. Erdogan MF, Gullu S, Baskal N, Uysal AR, Kamel N, Erdogan G. Omeprazole: calcitonin stimulation test for the diagnosis follow-up and family screening in medullary carcinoma of the thyroid gland. Ann Surg 1997;188:139-41.
364. Vieira AEF, Mello MP, Elias LLK et al. Molecular and biochemical screening for the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma in multiple endocrine neoplasia Type 2A. Horm Metab Res 2002;34:202-6.
365. Wells SA, Chi DD, toshima K, Dehner LP, Coffin cm, Downton SB, Ivanovich JL, DeBenedetti MK, Dilley WG and Moley JF. Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. Ann Surg 1994;220:237-50.
366. Telander RL and Moir CR. Medullary thyroid carcinoma in children. Semin Pediatr Surg 1994;3:188-93.
367. Niccoli-Sire P, Murat A, Baudin E, Henry JF, Proye C, Bigorgne JC et al. Early or prophylactic thyroidectomy in MEN2/FMTC gene carriers: results in 71 thyroidectomized patients. Eur J Endocrinol 1999;141:468-74.
368. Niccoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Franc S, Chabrier G, Baldet L, Maes B, Savagner F, Giraud S, Bezieau S, Kottler ML, Morange S and Conte-Devolx B. Familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) with non-cysteine RET mutations: phenotype-genotype relationship in large series of patients. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:3756-53.
369. Body JJ, Chanoine JP, Dumon JC and Delange F. Circulating calcitonin levels in healthy children and subjects with congenital hypothyroidism from birth to adolescence. J Clin Endocrinol Metab 1993;77:565-7.
370. Gharib H, Kao PC and Heath H. Determination of silica-purified plasma calcitonin for the detection and management of medullary thyroid carcinoma: comparison of two provocative tests. Mayo Clin Proc 1987;62:373-8.
371. Telander R, Zimmerman D, Sizemore GW, van Heerden JA and Grant CS. Medullary carcinoma in children. Results of early detection and surgery. Arch Surg 1989;124:841-3.

372. Calmettes C, Ponder BA, Fisher JA and Raue F. Early diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome: consensus statement. European community concerted action: medullary thyroid carcinoma. *Eur J Clin Invest* 1992;22:755-60.
373. Modigliani E, Cohen R, Campos JM, Conte-Devolx B, Maes B, Boneu A et al. Prognostic factors for survival and biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients. *Clin Endocrinol* 1998;48:265-73.
374. Machens A, Gimm O, Ukkat J et al. Improved prediction of calcitonin normalization in medullary thyroid carcinoma patients by quantitative lymph node analysis. *Cancer* 2000;88:1909-15.
375. Fugazzola L, Pinchera A, Lucchetti F et al. Disappearance rate of serum calcitonin after total thyroidectomy for medullary thyroid carcinoma. *Internat J Biolog Markers* 1994;9:21-4.
376. Vierhapper H, Raber W, Bieglmayer C and et.al. Routine measurement of plasma calcitonin in nodular thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1589-93.
377. Ferreira-Valbuena H, Fernandez de Arguello E, Campos G, Ryder E and Avellaneda A. Serum concentration of calcium and calcitonin in hyperthyroidism caused by Graves' disease. *Invest Clin* 1991;32:109-14.
378. Lips CJM, Hoppener JWM and Thijssen JHH. Medullary thyroid carcinoma: role of genetic testing and calcitonin measurement. *Ann Clin Biochem* 2001;38:168-79.
379. Niccoli P, Brunet Ph, Roubicek C, Roux F, Baudin E, Lejeune PJ et al. Abnormal calcitonin basal levels and pentagastrin response in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis. *Eur J Endocrinol* 1995;132:75-81.
380. Snider RH, Nylen ES and Becker KL. Procalcitonin and its component peptides in systemic inflammation: immunochemical characterization. *J Invest Med* 1997;47:552-60.
381. Russwurm S, Wiederhold M, Oberhoffer M et al. Molecular aspects and natural source of Procalcitonin. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:789-97.
382. Niccoli P, Conte-Devolx B, Lejeune PJ, Carayon P, Henry JF, Roux F et al. Hypercalcitoninemia in conditions other than medullary cancers of the thyroid. *Ann Endocrinol* 1996;57:15-21.
383. Baudin E, Bidart JM, Rougier P et al. Screening for multiple endocrine neoplasia type 1 and hormonal production in apparently sporadic neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:69-75.
384. DeLellis RA. C-Cell hyperplasia. In: Rosai J., Carangiu M.L., DeLellis R.A. eds: Atlas of Tumor Pathology, 3rd. series, Fasc 5: tumors of the thyroid gland. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology. 1992;:247-58.
385. Guyetant S, Wion-Barbot N and Rousselet MC. C-cell hyperplasia associated with chronic lymphocytic thyroiditis: a retrospective study of 112 cases. *Hum Pathol* 1994;25:514-21.
386. Albores-Saavedra J, Monforte H, Nadji M and Morales AR. C-Cell hyperplasia in thyroid tissue adjacent to follicular cell tumor. *Hum Pathol* 1988;19:795-9.
387. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffenecker I, Zedenius J, Lips CJ et al. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the international RET mutation consortium. *J Intern Med* 1995;238:243-6.
388. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA* 1996;276:1575-9.
389. Ito S, Iwashita T, Asai N, Murakami H, Iwata Y, Sobue G et al. Biological properties of RET with cysteine mutations correlate with multiple endocrine neoplasia type 2A, familial medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease phenotype. *Cancer Res* 1997;57:2870-2.
390. Heshmati HM, Gharib H, Khosla S et al. Genetic testing in medullary thyroid carcinoma syndromes: mutation types and clinical significance. *Mayo Clin Proc* 1997;72:430-6.
391. Berndt I, Reuter M, Saller B et al. A new hot spot for mutations in the RET proto-oncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:770-4.
392. Komminoth P, Roth J, Muletta-Feurer S, Saremaslani P, Seelentag WKF and Heitz PU. RET proto-oncogene point mutations in sporadic neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2041-6.
393. Conte-Devolx B, Schuffenecker I, Niccoli P, Maes B, Boneu A, Barbot N et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: Management of patients and subjects at risk. *Horm Res* 1997;47:221-6.

394. Smith DP, Houghton C and Ponder BA. Germline mutation of RET codon 883 in two cases of de novo MEN2B. *Oncogene* 1997;15:1213-7.
395. Carlson KM, Bracamontes J, Jackson CE, Clark R, Lacroix A, Wells SA Jr et al. Parent-of-origin effects in multiple endocrine neoplasia type 2B. *J Hum Genet* 1994;55:1076-82.
396. Moers AMJ, Landsvater RM, Schaap C, van Veen JM, de Valk IAJ, Blijham GH et al. Familial medullary thyroid carcinoma: not a distinct entity/ Genotype-phenotype correlation in a large family: familial medullary thyroid carcinoma revisited. *Am J Med* 1996;101:634-41.
397. Dunn JT. Iodine deficiency - the next target for elimination. *N Engl J Med* 1992;326:267-8.
398. Delange F. Correction of iodine deficiency: benefits and possible side effects. *Eur J Endocrinol* 1995;132:542-3.
399. Dunn JT. Whats happening to our iodine. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3398-3400.
400. Knudsen N, Christiansen E, Brandt-Christensen M, Nygaard B and Perrild H. Age- and sex-adjusted iodine/creatinine ratio. A new standard in epidemiological surveys? Evaluation of three different estimates of iodine excretion based on casual urine samples and comparison to 24 h values. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:361-3.
401. Aumont G and Tressol JC. Improved routine method for the determination of total iodine in urine and milk. *Analyst* 1986;111:841-3.
402. Unak P, Darcan S, Yurt F, Biber Z and Coker M. Determination of iodine amounts in urine and water by isotope dilution analysis. *Biol Trace Elem Res Winter* 1999;71-2:463-70.
403. Kilbane MT, Ajja RA, Weetman AP, Dwyer R, McDermott EWM, O'Higgins NJ and Smyth PPA. Tissue Iodine content and serum mediated 125I uptake blocking activity in breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1245-50.
404. Liberman CS, Pino SC, Fang SL, Braverman LE and Emerson CH. Circulating iodine concentrations during and after pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3545-9.
405. Vought RL, London WT, Lutwak L and Dublin TD. Reliability of estimates of serum inorganic iodine and daily faecal and urinary iodine excretion from single casual specimens. *J Clin Endocrinol Metab* 1963;23:1218-28.
406. Smyth PPA, Darke C, Parkes AB, Smith DF, Hetherington AM and Lazarus JH. Assessment of goitre in an area of endemic iodine deficiency. *Thyroid* 1999;9:895-901.
407. Thomson CD, Smith TE, Butler KA and Packer MA. An evaluation of urinary measures of iodine and selenium status. *J Trace Elem Med and Biol* 1996;10:214-22.
408. Als C, Helbling A, Peter K, Haldimann M, Zimmerli B and Gerber H. Urinary iodine concentration follows a circadian rhythm: A study with 3023 spot urine samples in adults and children. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1367-9.
409. Lightowler H and Davis JG. Iodine intake and iodine deficiency in vegans as assessed by the duplicate-portion technique and urinary iodine excretion. *Br. J Nutr* 1999;80:529-35.
410. Utiger RD. Maternal hypothyroidism and fetal development. *N Engl J Med* 1999;341:601-2.
411. Aboul-Khair S, Crooks J, Turnbull AC and Hytten FE. The physiological changes in thyroid function during pregnancy. *Clin Sci* 1964;27:195-207.
412. Smyth PPA, Smith DF, Radcliff M and O'Herlihy C. Maternal iodine status and thyroid volume during pregnancy: correlation with neonatal intake. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2840-3.
413. Gunton JE, Hams GH, Fiegert M and McElduff A. Iodine deficiency in ambulatory participants at a Sydney teaching hospital: Is Australia truly iodine replete? *Med J Aust* 1999;171:467-70.
414. Smyth PPA. Variation in iodine handling during normal pregnancy. *Thyroid* 1999;9:637-42.
415. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. National Academic Press 2001
416. Koutras DA, Papadopoulos SN, Sfontouris JG and Rigopoulos GA. Comparison of methods for measuring the plasma inorganic iodine and the absolute iodine uptake by the thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1968;28:757-60.
417. Mizukami Y, Michigishi T, Nonomura A, Hashimoto T, Tonami N, Matsubara F et al. Iodine-induced hypothyroidism: a clinical and histological study of 28 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:466-71.
418. Heymann WR. Potassium iodide and the Wolff-Chaikhoff effect: relevance for the dermatologist. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:490-2.s

419. Stanbury JB, Ermans AE, Bourdoux P, Todd C, Oken E, Tonglet R, Bidor G, Braverman LE and Medeiros-Neto G. Iodine-induced hyperthyroidism: occurrence and epidemiology. *Thyroid* 1998;8:83-100.
420. Roti E and Uberti ED. Iodine excess and hyperthyroidism. *Thyroid* 2001;5:493-500.
421. Baltisberger BL, Minder CE and Burgi H. Decrease of incidence of toxic nodular goitre in a region of Switzerland after full correction of mild iodine deficiency. *Eur J Endocrinol* 1995;132:546-9.
422. Bacher-Stier RG, Totsch M, Kemmler G, Oberaigner W and Moncayo R. Incidence and clinical characteristics of thyroid carcinoma after iodine prophylaxis in an endemic goiter country. *Thyroid* 1997;7:733-41.
423. Barakat MCD, Carson D, Hetherington AM, Smyth PPA and Leslie H. Hypothyroidism secondary to topical iodine treatment in infants with spina bifida. *Acta Paediatr* 1994;83:741-3.
424. Martino E, Safran M, Aghino-Lombardi F, Rajatanavin R, Lenziardi M, Fay M et al. Environmental iodine intake and thyroid dysfunction during chronic amiodarone therapy. *Ann Intern Med* 1984;101:28-34.
425. Rose NR, Rasooly L, Saboori AM and Burek CL. Linking iodine with autoimmune thyroiditis. *Environmental Health Perspectives* 1999;107:749-52.
426. Premawardhana LDKEPA, Smyth PPA, Wijeyaratne C, Jayasinghe A, De Silva H and Lazarus JH. Increased prevalence of thyroglobulin antibodies in Sri Lankan schoolgirls - is iodine the cause? *Eur J Endocrinol* 2000;143:185-8.
427. Costa A, Testori OB, Cenderelli C, Giribone G and Migliardi M. Iodine content of human tissues after administration of iodine containing drugs or contrast media. *J Endocrinol Invest* 1978;1:221-5.
428. May W, Wu D, Eastman C, Bourdoux P and Maberly G. Evaluation of automated urinary iodine methods: problems of interfering substances identified. *Clin Chem* 1990;35:865-9.
429. Lauber K. Iodine determination in biological material. Kinetic measurement of the catalytic activity of iodine. *Analyt Chem* 1975;47:769-71.
430. Mantel M. Improved method for the determination of iodine in urine. *Clin Chim Acta* 1971;33:39-44.
431. Dunn JT, Crutchfield HE, Gutenkunst R and Dunn AD. Two simple methods for measuring iodine in urine. *Thyroid* 1993;3:119-23.
432. May SL, May WA, Bourdoux PP, Pino S, Sullivan KM and Maberly GF. Validation of a simple, manual urinary iodine method for estimating the prevalence of iodine-deficiency disorders and interlaboratory comparison with other methods. *J Clin Nutr* 1997;65:1441-5.
433. Ohashi T, Yamaki M, Pandav SC, Karmarkar GM and Irie M. Simple microplate method for determination of urinary iodine. *Clin Chem* 2000;46:529-36.
434. Rendl J, Seybold S and Borner W. Urinary iodine determined by paired-ion reverse-phase HPLC with electrochemical detection. *Clin Chem* 1994;40:908-13.
435. Tsuda K, Namba H, Nomura T, Yokoyama N, Yamashita S, Izumi M and Nagataki S. Automated Measurement of urinary iodine with use of ultraviolet radiation. *Clin Chem* 1995;41:581-5.
436. Haldimann M, Zimmerli B, Als C and Gerber H. Direct determination of urinary iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry using isotope dilution with iodine-129. *Clin Chem* 1998;44:817-24.
437. Mura P, Piriou A, Guillard O, Sudre Y and Reiss D. Dosage des iodures urinaires par electrode specifique: son interet au cours des dysthyroides. *Ann Biol Clin* 1985;44:123-6.
438. Allain P, Berre S, Krari N, Laine-Cessac P, Le Bouil A, Barbot N, Rohmer V and Bigorgne JC. Use of plasma iodine assays for diagnosing thyroid disorders. *J Clin Pathol* 1993;46:453-5.
439. Vander JB, Gaston EA and Dawber TR. The significance of nontoxic thyroid nodules: Final report of a 15-year study of the incidence of thyroid malignancy. *Ann Intern Med* 1968;69:537-40.
440. Rojeski MT and Gharib H. Nodular thyroid disease: Evaluation and management. *N Engl J Med* 1985;313:428-36.
441. Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med* 1993;328:553-9.
442. Kirkland RT and Kirkland JL. Solitary thyroid nodules in 30 children and report of a child with thyroid abscess. *Pediatrics* 1973;51:85-90.
443. Rallison ML, Dobyns EM, Keating FR, Rall J and Tyler E. Thyroid nodularity in children. *JAMA* 1975;233:1069-72.

444. Khurana KK, Labrador E, Izquierdo R, Mesonero CE and Pisharodi LR. The role of fine-needle aspiration biopsy in the management of thyroid nodules in children, adolescents and young adults: A multi-institutional study. *Thyroid* 1999;4:383-6.
445. Aghini-Lombardi F, Antonangeli L, Martino E, Vitti P, Maccherini D, Leoli F, Rago T, Grasso L, Valeriano R, Balestrieri A and Pinchera A. The spectrum of thyroid disorders in an iodine-deficient community: the Pescopanano Survey. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:561-6.
446. Hamburger JI, Husain M, Nishiyama R, Nunez C and Solomon D. Increasing the accuracy of fine-needle biopsy for thyroid nodules. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:1035-41.
447. Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E, McKee RF, Rosai J, Shah JP, Fremgen AM, Stewart AK and Holzer S. Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the United States during 1996. *Cancer (Cytopathol)* 2000;89:202-17.
448. Leenhardt L, Hejblum G, Franc B, Du Pasqueir Fediaevsky L, Delbot T, De Guillouzie D, Menegaux F, Guillausseau C, Hoang C, Turpin G and Aurengo A. Indications and limits of ultrasound-guided cytology in the management of nonpalpable thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:24-8.
449. Braga M, Cavalcanti TC, Collaco LM and Graf H. Efficacy of ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of complex thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4089-91.
450. Cochand-Priollet B, Guillausseau P, Chagnon S, Hoang C, Guillausseau-Scholer C, Chanson P, Dahan H, Warnet A, Tran Ba Huy PT and Valleur P. The diagnostic value of fine-needle aspiration biopsy under ultrasonography in nonfunctional thyroid nodules: a prospective study comparing cytologic and histologic findings. *Am J Med* 1994;97:152-7.
451. Takashima S, Fukuda H and Kobayashi T. Thyroid nodules: Clinical effect of ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy. *J Clin Ultrasound* 1994;22:535-42.
452. Gharib H. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: Advantages, limitations and effect. *Mayo Clin Proc* 1994;69:44-9.
453. Hamberger B, Gharib H, Melton LF III, Goellner JR and Zinsmeister AR. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. Impact on thyroid practice and cost of care. *Am J Med* 1982;73:381-4.
454. Grant CS, Hay ID, Gough IR, McCarthy PM and Goellner JR. Long-term follow-up of patients with benign thyroid fine-needle aspiration cytologic diagnoses. *Surgery* 1989;106:980-6.
455. Liel Y, Ariad S and Barchana M. Long-term follow-up of patients with initially benign fine-needle aspirations. *Thyroid* 2001;11:775-8.
456. Belfiore A, La Rosa G, La Porta GA, Giuffrida D, Milazzo G, Lupo L, Regalbutto C and V. R. Cancer Risk in patients with cold thyroid nodules: Relevance of iodine intake, sex, age and multinodularity. *J Amer Med* 1992;93:363-9.
457. Tuttle RM, Lemar H and Burch HB. Clinical features associated with an increased risk of thyroid malignancy in patients with follicular neoplasia by fine-needle aspiration. *Thyroid* 1998;8:377-83.
458. Kumar H, Daykin J, Holder R, Watkinson JC, Sheppard M and Franklyn JA. Gender, clinical findings and serum thyrotropin measurements in the prediction of thyroid neoplasia in 1005 patients presenting with thyroid enlargement and investigated by fine-needle aspiration cytology. *Thyroid* 1999;11:1105-9.
459. Moosa M and Mazzaferri EL. Outcome of differentiated thyroid cancer diagnosed in pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2862-6.
460. Oertel YC. A pathologist trying to help endocrinologists to interpret cytology reports from thyroid aspirates. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1459-61.
461. De Micco, Zoro P, Garcia S, Skoog L, Tani EM, C. PK and Henry JF. Thyroid peroxidase immunodetection as a tool to assist diagnosis of thyroid nodules on fine-needle aspiration biopsy. *Eur J Endocrinol* 1994;131:474-9.
462. Faroux MJ, Theobald S, Pluot M, Patey M and Menzies D. Evaluation of the monoclonal antithyropoxidase MoAb47 in the diagnostic decision of cold thyroid nodules by fine-needle aspiration. *Pathol Res Pract* 1997;193:705-12.
463. Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, Akahani S, Yoshida J, Hattori K, Okamoto S, Sawada T, Raz A and Kubo T. Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Cancer* 1999;85:2475-84.

464. Medeiros-Neto G, Nascimento MC, Bisi H, Alves VA, Longatto-Filho A and Kanamura CT. Differential reactivity for Galectin-3 in Hurthle Cell Adenomas and Carcinomas. *Endocr Pathol* 2001;12:275-9.
465. Saggiorato E, Cappia S, De Guili P, Mussa A, Pancani G, Caraci P, Angeli A and Orlandi F. Galectin -3 as a presurgical immunocyodiagnostic marker of minimally invasive follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5152-8.
466. Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, Inohara H, Marandino F, Orkandi F, Nardi F, Vacchione A, Tecce R and Larsson O. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001;357:1644-50.
467. Goellner JR. Problems and pitfalls in thyroid cytology. *Monogr Pathol* 1997;39:75-93.
468. Oertel YC, O. J. Diagnosis of benign thyroid lesions: fine-needle aspiration and histopathologic correlation. *Ann Diagn Pathol* 1998;2:250-63.
469. Baldet L, Manderscheid JC, Glinoyer D, Jaffiol C, Coste-Seignovert B and Percheron C. The management of differentiated thyroid cancer in Europe in 1988. Results of an international survey. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989;120:547-58.
470. Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA and Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2002;26:41-4.
471. Herrmann ME, LiVolsi VA, Pasha TL, Roberts SA, Wojcik EM and Baloch ZW. Immunohistochemical expression of Galectin-3 in benign and malignant thyroid lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:710-13.
472. Leteurtre E, Leroy Z, Pattou F, Wacrenier A, Carnaille B, Proye C and Lecomte-Houcke M. Why do frozen sections have limited value in encapsulated or minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid? *Amer J Clin Path* 2001;115:370-4.
473. Stojadinovic A, Ghossein RA, Hoos A, Urist MJ, Spiro RH, Shah JP, Brennan MF, Shaha AR and Singh B. Hurthle cell carcinoma: a critical histopathologic appraisal. *J Clin Oncol* 2001;19:2616-25.
474. Carmeci C, Jeffrey RB, McDougall IR, Nowels KW and Weigel RJ. Ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid masses. *Thyroid* 1998;8:283-9.
475. Yang GCH, Liebeskind D and Messina AV. Ultrasound-guided fine-needle aspiration of the thyroid assessed by ultrafast Papanicolaou stain: Data from 1135 biopsies with a two- six-year follow-up. *Thyroid* 2001;6:581-9.
476. Fisher DA, Dussault JH, Foley TP, Klein AH, LaFranchi S, Larsen PR, Mitchell NL, Murphey WH and Walfish PG. Screening for congenital hypothyroidism: results of screening one million North American infants. *J Pediatr* 1979;94:700.
477. Brown AL, Fernhoff PM, Milner J, McEwen C and Elsas LS. Racial differences in the incidence of congenital hypothyroidism. *J Pediatr* 1981;99:934-.
478. LaFranchi SH, Dussault JH, Fisher DA, Foley TP and Mitchell ML. Newborn screening for congenital hypothyroidism: Recommended guidelines. *Pediatrics* 1993;91:1203-9.
479. Gruters A, Delange F, Giovanelli G, Klett M, Richiccioli P, Torresani T et al. Guidelines for neonatal screening programmes for congenital hypothyroidism. *Pediatr* 1993;152:974-5.
480. Toublanc JE. Guidelines for neonatal screening programs for congenital hypothyroidism. *Acta Paediatr* 1999;88 Suppl 432:13-4.
481. Vulsma T, Gons MH and de Vijlder JJ. Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *N Engl J Med* 1989;321:13-6.
482. Gruneiro-Papendieck L, Prieto L, Chiesa A, Bengolea S, Bossi G and Bergada C. Usefulness of thyroxine and free thyroxine filter paper measurements in neonatal screening for congenital hypothyroidism of preterm babies. *J Med Screen* 2000;7:78-81.
483. Hanna DE, Krainz PL, Skeels MR, Miyahira RS, Sesser DE and LaFranchi SH. Detection of congenital hypopituitary hypothyroidism: Ten year experience in the Northwest Regional Screening Program. *J Pediatr* 1986;109:959-64.
484. Fisher DA. Hypothyroxinemia in premature infants: is thyroxine treatment necessary? *Thyroid* 1999;9:715-20.

485. Wang ST, Pizzalato S and Demshar HP. Diagnostic effectiveness of TSH screening and of T4 with secondary TSH screening for newborn congenital hypothyroidism. *Clin Chim Acta* 1998;274:151-8.
486. Delange F. Screening for congenital hypothyroidism used as an indicator of the degree of IDD and its control. *Thyroid* 1998;8:1185-92.
487. Law WY, Bradley DM, Lazarus JH, John R and Gregory JW. Congenital hypothyroidism in Wales (1982-93): demographic features, clinical presentation and effects on early neurodevelopment. *Clin Endocrinol* 1998;48:201-7.
488. Mei JV, Alexander JR, Adam BW and Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr* 2001;131:1631S-6S.
489. LaFranchi SH, Hanna CE, Krainz PL, Skeels MR, Miyahira RS and Sesser DE. Screening for congenital hypothyroidism with specimen collection at two time periods: Results of the Northwest Regional Screening Program. *J Pediatr* 1985;76:734-40.
490. Zakarija M, McKenzie JM and Eidson MS. Transient neonatal hypothyroidism: Characterization of maternal antibodies to the Thyrotropin Receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1239-46.
491. Matsuura N, Yamada Y, Nohara Y, Konishi J, Kasagi K, Endo K, Kojima H and Wataya K. Familial neonatal transient hypothyroidism due to maternal TSH-binding inhibitor immunoglobulins. *N Engl J Med* 1980;303:738-41.
492. McKenzie JM and Zakaria M. Fetal and neonatal hyperthyroidism and hypothyroidism due to maternal TSH receptor antibodies. *Thyroid* 1992;2:155-9.
493. Vogiatzi MG and Kirkland JL. Frequency and necessity of thyroid function tests in neonates and infants with congenital hypothyroidism. *Pediatr* 1997;100.
494. Pohlenz J, Rosenthal IM, Weiss RE, Jhiang SM, Burant C and Refetoff S. Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. *J Clin Invest* 1998;101:1028-35.
495. Nordyke RA, Reppun TS, Mandanay LD, Wood JC, Goldstein AP and Miyamoto LA. Alternative sequences of thyrotropin and free thyroxine assays for routine thyroid function testing. Quality and cost. *Arch Intern Med* 1998;158:266-72.
496. Hansen D, Bennedbaek FN, Hoier- Madsen M, Jacobsen BB, and Hegedus L. Thyroid function, morphology and autoimmunity in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 1999;140:512-8.
497. Pedersen OM, Aardal NP, Larssen TB, Varhaug JE, Myking O, and Vik-Mo H. The value of ultrasonography in predicting autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2000;10:251-9.
498. Harach HR, Solís Sánchez S, Williams ED. Pathology of the autonomously functioning (hot) thyroid nodule. *Ann Diagn Pathol* 2002;6:10-19.
499. Pretell EA, Delange F, Hostalek U, Corigliano S, Barreda L, Higa AM, Altschuler N, Barragán, D, Cevallos JL, Gonzales O, Jara JA, Medeiros-Neto G, Montes JA, Muzzo S, Pacheco VM and Cordero L. Iodine nutrition improves in Latin America. *Thyroid* 2004;14:590-9.