



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
“SALVADOR ZUBIRÁN”

“ESTABLECIMIENTO DE INTERVALOS DE REFERENCIA PARA
ANTICUERPOS ANTI PEROXIDASA TIROIDEA EN POBLACIÓN
MEXICANA”

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL GRADO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

PRESENTA

DR. ERICK DOMINGUEZ CANO

ASESOR

DR. ARMANDO FLORES REBOLLAR



México D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

DR. ARMANDO FLORES REBOLLAR

A S E S O R D E T E S I S

MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE MEDICINA INTERNA DEL INCMNSZ

DR. ALFONSO GULÍAS HERRERO

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE MEDICINA INTERNA DEL INCMNSZ

DR. LUIS FEDERICO USCANGA DOMÍNGUEZ

JEFE DE ENSEÑANZA DEL INCMNSZ

AGRADECIMIENTOS

A Dios y todos los que están muy cerca de Él, por todo lo que significan en mi vida.

A mis papás, por el apoyo y comprensión que siempre me han brindado a lo largo de mi camino.

A mi hermana, y a Luis, por estar a mi lado.

A Andrea, por su amor y paciencia.

Al INCMNSZ, por dejar cumplir este sueño.

Al Dr. Armando Flores Rebollar, por haber confiado en mí y por todo su apoyo técnico y moral.

A mis amigos y compañeros por su constante estímulo.

ÍNDICE

	<i>página</i>
<i>RESUMEN</i>	5
<i>INTRODUCCIÓN</i>	7
<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i>	15
<i>JUSTIFICACIÓN</i>	17
<i>OBJETIVOS</i>	18
<i>DISEÑO DEL ESTUDIO</i>	19
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	20
<i>Variables</i>	21
<i>Criterios de inclusión</i>	21
<i>Criterios de exclusión</i>	22
<i>Análisis estadístico</i>	22
<i>RESULTADOS</i>	24
<i>DISCUSIÓN</i>	27
<i>CONCLUSIONES</i>	30
<i>ANEXOS</i>	31
<i>REFERENCIAS</i>	39

RESUMEN

Antecedentes:

La selección de personas eutiroideas, utilizando los criterios de la National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) y en conjunto con el ultrasonido del tiroides; ofrece bases sólidas para establecer intervalos de referencias para los anticuerpos anti peroxidasa tiroidea (TPO Ac). En la actualidad se recomienda que los valores de referencia para anticuerpos TPO Ac deban ser estandarizados para cada población en particular.

Objetivos:

Establecer el intervalo de referencia para los anticuerpos anti peroxidasa tiroidea basados en los criterios de la NACB. Registrar la prevalencia de TPO Ac positivos y la disfunción tiroidea en nuestra población estudiada.

Material y métodos:

Se seleccionaron sujetos eutiroideos en base a los criterios de la NACB y de nuestro grupo. Se analizaron sus datos demográficos, exploración del tiroides, resultados de laboratorio y ultrasonido tiroideo. Estas variables fueron comparadas entre sí. Se realizó un análisis estadístico descriptivo de los datos demográficos, el promedio aritmético de los TPOAc fue transformado logarítmicamente y se utilizarán como límites para el rango de referencia la percentila 2.5 y 97.5. Se realizó un análisis univariado comparando las variables clínicas y de laboratorio para determinar diferencias, considerando como significativa un valor de $p < 0.05$.

Resultados:

Para nuestro conocimiento este es el primer estudio de intervalos de referencia para TPO Ac en población mexicana; obtuvimos un valor promedio de TPO Ac de 3.81 UI/mL para los del grupo de NACB y 3.46 UI/mL para el grupo que utilizo nuestros criterios de normalidad, estableciendo los rangos de referencia en 2 UI/mL – 9.68 UI/mL y 2 UI/mL – 9 UI/mL respectivamente.

Conclusiones:

Los TPO Ac están presentes frecuentemente en sujetos eutiroideos; su determinación parece ser útil como escrutinio inicial en sujetos bien seleccionados. El obtener valores de referencia para TPO Ac en cada población en particular es necesario. El significado de los valores bajos de anticuerpos antitiroideos en individuos clínicamente eutiroideos no se conoce, mas sin embargo, estudios sugieren que pueden ser un factor de riesgo de futura disfunción tiroidea.

INTRODUCCION

Los síndromes tiroideos autoinmunes incluyen diferentes enfermedades íntimamente relacionadas, estos síndromes están asociados por una fisiopatología similar y mecanismos inmunológicos comunes ¹⁻⁴.

Diversos anticuerpos han sido relacionados a estas enfermedades tiroideas ¹.

La enfermedad tiroidea autoinmune (ETA) causa daño celular y altera la función tiroidea por mecanismos humorales y celulares ³⁻⁵. Se produce daño 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 autoanticuerpos estimulantes o bloqueantes sobre los receptores de membrana de las células. Tres autoantígenos principales participan en ETA ^{1, 6}: Peroxidasa Tiroidea (TPO), Tiroglobulina (Tg), y Receptor de TSH (TR).

Los métodos de laboratorio que determinan los procesos autoinmunes mediados por células no están disponibles por el momento ⁶. Sin embargo, en la mayoría de los laboratorios clínicos se dispone de anticuerpos antitiroideos ⁷⁻¹⁰. Estos ensayos se deben emplear selectivamente; la utilidad clínica de estas pruebas para definir la naturaleza del trastorno tiroideo es relativa, son válidos para establecer un diagnóstico diferencial entre las distintas patologías tiroideas, orientando sus niveles en suero hacia un proceso inmune, pero no

permiten establecer el diagnóstico definitivo ¹¹⁻¹⁴. Por otra parte, no necesariamente informan sobre la severidad del proceso, ya que unas veces están ausentes a pesar de que exista dicha alteración y en otras son detectables en individuos sanos ^{1, 5, 8, 10}.

En los síndromes tiroideos autoinmunes los anticuerpos de mayor prevalencia son TPOAc y TRAc, con un 51.2% y 45.1% respectivamente ^{1, 6, 8}; Bjoro y colaboradores han informado en estudios de población abierta que la prevalencia de TPOAc es de un 13.9% para mujeres y 2.8% para varones y que cuando existen manifestaciones de hipotiroidismo puede incrementar hasta un 85%, sin embargo, a veces los pacientes con ETA tienen anticuerpos negativos ¹⁵⁻²⁰. Los anticuerpos anti-receptor de TSH (TRAc) están presentes en la mayoría de los pacientes con enfermedad de Graves pasada o presente, la prevalencia de anticuerpos tiroideos aumenta cuando los pacientes tienen enfermedades autoinmunes no tiroideas, el envejecimiento también se asocia con la aparición de anticuerpos antitiroideos y con un aumento en la prevalencia de ETA ²¹⁻²⁵. El significado de los valores bajos de anticuerpos antitiroideos en individuos clínicamente eutiroideos no se conoce ⁶. Sin embargo, estudios longitudinales sugieren que los TPOAc pueden ser un factor de riesgo de futura disfunción tiroidea incluyendo tiroiditis post-parto y complicaciones autoinmunes después del tratamiento con algunos agentes terapéuticos ²⁶⁻³³. Generalmente no se recomienda el uso de los anticuerpos antitiroideos para el control del

tratamiento de la ETA, ya que este se dirige a la consecuencia (disfunción tiroidea) y no a la causa (autoinmunidad) de la enfermedad ⁶.

Ciertos problemas específicos han obstaculizado el uso de los ensayos para anticuerpos antitiroideos ⁶. Los estudios muestran que los resultados varían ampliamente dependiendo del método utilizado ^{6, 31-34}. Esto se debe a diferencias tanto en la sensibilidad como en la especificidad, y a la ausencia de una estandarización adecuada ^{6, 5, 10}. 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 ¹.

En consecuencia, los resultados de los ensayos dependen fundamentalmente de la estructura molecular del antígeno utilizado en el mismo ^{1, 6, 16}. 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 ³⁵⁻³⁹.

Se conoce desde hace mucho tiempo que los autoanticuerpos están dirigidos contra unos pocos epitopes en comparación con los anticuerpos heterólogos ^{1, 6, 16}. Los métodos actuales presentan amplias diferencias en cuanto al reconocimiento de epitopes ¹. Específicamente, que pueden provenir de un reconocimiento erróneo de un epitope que introduce un sesgo en la población de autoanticuerpos analizada ^{40, 41}. Esto genera intervalos de referencia muy

diferentes, incluso cuando los métodos están estandarizados contra la misma preparación de referencia internacional ⁴²⁻⁴⁸. Cualquiera que 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 ¹⁶.

Las diferencias en la sensibilidad de los métodos para autoanticuerpos pueden derivar tanto del diseño del ensayo como del tipo de señal ^{9, 35-39}. Las diferencias en especificidad pueden ocurrir como resultado de la contaminación de la preparación del autoantígeno con otros autoantígenos ^{10, 36-38}.

Además, el error en el reconocimiento de un epítipo puede llevar a la subestimación de la cantidad total de autoanticuerpos circulantes presentes, y una disminución en la sensibilidad ⁶. La estandarización de los ensayos de anticuerpos antitiroideos no ha alcanzado todavía un nivel óptimo ³⁵⁻³⁹. Se dispone de Preparaciones Internacionales de Referencia MRC 65/93 para TgAc, y MRC 66/387 para TPOAc del National Council for Biological Standards and Control en Londres, Reino Unido. Estos estándares de referencia se prepararon y se liofilizaron a partir de una mezcla de suero de pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune ³⁷⁻³⁹.

La determinación de TPOAc es el método más sensible para la detección de enfermedad tiroidea autoinmune, los TPOAc habitualmente son la primera anomalía bioquímica que aparece en la evolución del desarrollo de hipotiroidismo secundario a la tiroiditis de Hashimoto ⁷. De hecho, cuando se determinan TPOAc mediante un inmunoensayo sensible, más del 95% de los individuos con tiroiditis de Hashimoto tienen valores detectables de TPOAc. Estos métodos también detectan TPOAc en la mayoría de los pacientes con enfermedad de Graves ^{2, 13, 19, 22}.

Los TPOAc 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 microosomal se identificó como TPO. Los antiguos métodos inmunofluorescentes para AMA así como los métodos de aglutinación pasiva con glóbulos rojos, o micropartículas de gel sensibilizadas, todavía se utilizan en la actualidad, además de los nuevos inmunoensayos de TPOAc, más sensibles, tanto competitivos como no competitivos ¹. Estos nuevos inmunoensayos para TPOAc han venido reemplazando en gran medida a los antiguos métodos de aglutinación para AMA porque son cuantitativos, más sensibles y se les puede automatizar con facilidad. Sin embargo, su variabilidad en cuanto a sensibilidad y especificidad es muy amplia ¹⁶. 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 ⁵. 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 ^{44, 45}. 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 TPOAc se cuantifican en unidades internacionales usando la preparación de referencia MRC 66/387 ^{36, 39, 47}. Lamentablemente, el uso de este estándar primero no disminuye las variaciones entre métodos como resulta evidente 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 ^{8, 5, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 48}.

La estimación de la prevalencia de los TPOAc depende de la sensibilidad y especificidad del método utilizado ^{8, 5}. El reciente estudio NHANES III en EUA de 17,000 individuos sin enfermedad tiroidea aparente, informó niveles detectables de TPOAc en el 12% de los individuos utilizando un inmunoensayo competitivo. Aun no está claro si los valores bajos de TPOAc destacados 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 ^{6, 37-39}.

Los valores de referencia para los ensayos TPOAc son altamente variables y a menudo se establecen arbitrariamente, de modo que se obtengan resultados positivos en una amplia mayoría de pacientes con ETA y negativos en la mayoría de individuos sin evidencia clínica de ETA ³⁶⁻³⁹. El límite inferior normal parece estar relacionado con factores técnicos ⁶. Específicamente, los ensayos que tienen un límite de detección bajo (<10KUI/L) informan valores no detectables de TPOAc en individuos normales estrictamente seleccionados. Estos métodos sugieren que la presencia de TPOAc es un hallazgo patológico ^{36, 37}. Por el contrario, los ensayos de TPOAc que reportan límites de detección altos (>10KUI/L) citan un rango normal de referencia ^{1, 6, 35}. Como estos últimos, no parecen tener una mayor sensibilidad para detectar ETA, estos valores del rango normal pueden representar ruido inespecífico del ensayo y es posible que no tengan significado patológico ³⁷⁻³⁹.

El estudio de seguimiento de la cohorte de Whickham realizado durante 20 años informo que la presencia de títulos detectables de TPOAb (medidos como AMA) no solo era un factor de riesgo para hipotiroidismo sino que la detección de AMA precedía el desarrollo de un aumento en la TSH ^{7, 29}. Esto sugiere que TPOAc detectables constituyen un factor de riesgo para ETA ⁶. Sin embargo, individuos con niveles bajos de TPOAc hubieran tenido AMA no detectables con los métodos más antiguos utilizados en este estudio ^{29, 38}.

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 TPOAc pueden ser clínicamente significativos ^{38, 39}. En consecuencia, todavía sigue debatiéndose si los individuos con niveles bajos de TPOAc y/o TgAc 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 ⁶.

Recientes estudios sugieren que un número significativo de individuos con TSH entre 2.6 y 4 mUI/ml tienen un perfil hipoecoico al ultrasonido, sugestivo de infiltración linfocítica, por lo cual el examen morfológico de la tiroides por ultrasonido es actualmente el modo más sensible de determinar de manera temprana ETA ⁴⁹⁻⁵¹. Sin embargo, el TPOAc es el marcador de riesgo de ETA más fácilmente accesible, aunque la especificidad y sensibilidad de los inmunoensayos actuales sean aun subóptimas para detectar enfermedad temprana en individuos con hipoecogenicidad ^{52, 53}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El establecimiento de los intervalos de referencia para los anticuerpos anti-tiroideos (TgAc, TPOAc, TRAc) ha cambiado durante las últimas décadas. En los primeros estudios que se realizaron buscando establecer intervalos de referencia, se agruparon poblaciones sumamente heterogéneas, esto ocasionó una amplitud importante en los límites de referencia, varios de los estudios fueron realizados en donadores de sangre, con escasa selección de la muestra tomada, agregándose a esto la limitación de los kits o técnicas de laboratorio utilizadas en ese período.

En el 2003 la NACB (National Academy Clinical Biochemistry) publicó sus Guías de consenso para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tiroidea, en ellas se definió la población de referencia recomendada para la determinación del intervalo de referencia para anticuerpos antitiroideos. Esta debe establecerse a partir de los límites de confianza del 95% de los valores logarítmicamente transformados de por lo menos 120 individuos sanos que cumplan las siguientes condiciones:

- Hombres, menores de 30 años de edad.
- Niveles de TSH sérica entre 0.5 a 2 mUI/L.
- Sin bocio (ultrasonido tiroideo).
- Sin antecedentes personales ni familiares de enfermedad tiroidea.
- Sin enfermedad autoinmune no tiroidea.

Por la importancia que ha adquirido el uso del ultrasonido en la evaluación del tiroides y el establecimiento de la hipoecogenicidad como la manifestación inicial de la enfermedad tiroidea autoinmune, incluso antes de la aparición de anticuerpos anti TPO, este se ha utilizado como parte del escrutinio de esta población de referencia, considerando a la hipoecogenicidad como un datos de exclusión.

JUSTIFICACION

En población mexico-americana la prevalencia de enfermedad tiroidea autoinmune es alta; hasta el momento, no se han descrito los intervalos de referencia para anticuerpos antitiroperoxidasa en nuestro medio; es necesario que cada población describa sus valores de referencia. La NACB ha hecho recomendaciones para establecer dichos intervalos. Hoy en día en México, no existen estudios realizados que hayan tratado este punto. Hasta la fecha será el único estudio realizado en población mexicana, utilizando la población de referencia aconsejada por la NACB. Cada laboratorio debería comprobar si los intervalos de referencia pueden aplicarse a su grupo de pacientes y, en caso necesario, establecer sus propios valores.

OBJETIVOS

Primarios

Establecer el intervalo de referencia para los anticuerpos anti tiroperoxidasa (TPOAc) basados en los criterios de la National Academy of Clinical Biochemistry (NACB).

Secundarios

Registrar la prevalencia de TPO Ac positivos y la disfunción tiroidea en nuestra población estudiada.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Prospectivo, observacional, trasversal

Sub-estudio realizado en sujetos voluntarios convocados dentro del INCMNSZ sin enfermedad tiroidea conocida. El número de sujetos a estudiar se ha fijado en 120; límite aconsejado por la NACB para una población de referencia. Se les aplicará un cuestionario, para definir sus datos demográficos, antecedentes heredofamiliares, comorbilidades y medicamentos consumidos, exploración física de la glándula así como ecografía tiroidea. Todos los voluntarios se someterán a una flebotomía entre las 6:00 y 10:00 a.m., después de un ayuno no menor de 10:00 hrs. De las muestras obtenidas se medirán las concentraciones séricas de TSH, T4, T3, TPOAc y TgAc. Los valores obtenidos para TPOAc serán transformados logarítmicamente y los límites se fijarán entre la percentila 2.5 y 97.5.

MATERIAL Y METODOS

Se realizará una sola flebotomía en cualquier miembro torácico, después de un ayuno mayor a 10 hrs, entre las 6:00 y 10:00 am. Se recolectará en un tubo rojo sin anticoagulante 10 ml de sangre venosa. En el suero extraído de la muestra se determinarán: TSH, T4, T3, TPOAc y TgAc. Las pruebas de función tiroidea se medirán con el método de radioinmunoensayo utilizando el equipo de CIS BIO Internacional (France) y SELco MEDIPAN GMBH (Dahlewitz/Berlin, Germany).

Con los siguientes rangos de valores:

	Reproducibilidad	Rangos
Sensibilidad Analítica		
T4 libre	<10% imprecisión total CV	(8.64-23.19 pmol/L)
0.50 pmol/L		
(RIA-GNOST® FT4)		
T3 total	<10% imprecisión total CV	(1.28-2.73 nmol/L)
0.30 ng/ml		
(RIA-GNOST® T3)		
TSH	<10% imprecisión total CV	(0.4 - 4.0 µIU/ml)
0.05 µIU/ml		
(RIA-GNOST® TSH)		
Anti PO	<10% imprecisión total	(<50 IU/ml)
2.0 IU/ml		

(SELco® anti-PO)

Anti TG <10% imprecisión total (≤100 IU/ml)

6.0 IU/ml

(SELco® anti-TG)

El volumen tiroideo será calculado por medio de ultrasonido (Logic pro 100 General Electric, transductor lineal 7.5 mHz) utilizando la fórmula de Brunn et al y será expresada en centímetros cúbicos.

Variables a medir

Las variables que se registrarán como categóricas nominales son el género de los voluntarios (dicotómico), presencia de bocio (dicotómico), tabaquismo (dicotómico), antecedentes familiares de distiroidismo (dicotómico), uso de medicamentos (dicotómico). Como variables numéricas continuas se registrará la edad, TSH, T4, T3, TPOAc, TgAc y volumen tiroideo calculado por US.

Criterios de inclusión

Serán sometidos a escrutinio todo los individuos voluntarios que respondan a nuestra convocatoria, sin enfermedad tiroidea conocida. La población sometida a escrutinio será de 500 sujetos mayores de 18 años. De acuerdo a la NACB 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.

- Varones
- Menores de 30 años de edad
- Niveles de TSH sérica entre 0.5 a 2 mUI/L
- Sin bocio (ultrasonido tiroideo)
- Sin antecedentes personales ni familiares de enfermedad tiroidea
- Sin enfermedad autoinmune no tiroidea

Este riguroso proceso de selección ofrece mínimas probabilidades de incluir individuos con predisposición a enfermedad tiroidea autoinmune.

Criterios de exclusión

- Historia personal de antecedentes heredero familiares de distiroidismo
- Presencia de bocio
- Comorbilidad de enfermedades autoinmunes
- Alteración del patrón ecográfico de la glándula tiroides
- Embarazo

Estrategia de análisis estadístico

Se realizará un análisis estadístico descriptivo de los datos demográficos, el promedio aritmético de los TPOAc será transformado logarítmicamente y se utilizarán como límites del rango de referencia la percentila 2.5 y 97.5.

En el análisis final se integrara un grupo de pacientes que cumpla con los criterios de normalidad de nuestro grupo, por lo que se excluyeron los individuos con AHF de distiroidismo, con exploración tiroidea anormal, los valores extremos (“outliers”) de acuerdo a la regla de 4 DE por arriba del promedio de los APO y se excluyeron los valores fuera del rango de TSH de 0.4 a 4.0 mUI/L. Se usó *Chi* cuadrada para la comparación de variables categóricas, *t* de Student para contrastar variables numéricas continuas de distribución normal y *U* de Mann-Whitney en variable con distribución anormal, considerando como significativa un valor de $p < 0.05$. Fue utilizado el paquete estadístico SPSS v 15.0

RESULTADOS

Se reclutaron 267 voluntarios, 122 (45.7%) hombres y 145 (54.3%) mujeres; en esta población base se registró que 14.6% manifestaron tener AHF de primer grado de distiroidismo. A la exploración física de la glándula tiroides se detectó que esta era anormal en 18 (7.1%), siendo mayor en las mujeres que en hombres, 9.9 vs 3.5%. La principal anomalía fue el incremento de la consistencia (n=11). En la exploración ultrasonográfica se detectó en 18 personas (7.1%) uno o más nódulos tiroideos, más prevalentes en mujeres que en varones, 9.9 y 3.5 % respectivamente. De acuerdo a la escala de Zingrillo, se consideró que el 46 % de los examinados ultrasonográficamente tenían una ecogenicidad normal, un 9% una hipoecogenicidad acentuada y el resto se distribuían en los otros apartados diagnósticos de la escala. De esta población 24 individuos (9%) tenían positividad para ambos anticuerpos anti tiroideos, 29 individuos (10.9%) tienen niveles de positividad para TPO Ac y 33 individuos (12.4%) tienen niveles de positividad para Tg Ac así como 39 voluntarios tuvieron positividad para TPO Ac y/o Tg Ac (14.6%). Las mujeres mostraron en todos estos rubros porcentajes notoriamente mayores que los varones de positividad para anticuerpos antitiroideos.

La media de TSH fue de 2.9 UI/L; resultando 117 individuos (43.8%) con valores por arriba de 2.5 UI/L de TSH (límite superior sugerido por la NACB),

siendo significativamente mayor en el grupo de mujeres que en el de hombres (p 0.036). Para T4L la media fue de 15.7 pmol/L, siendo significativamente mayor en el grupo de los hombres (17.7 pmol/L vs 14.1 pmol/L con una p 0.001). Las características de la población total se detallan en el cuadro 1.

El grupo constituido por individuos que cumplen criterios de la NACB, está conformado por 52 sujetos con una edad promedio de 25 años, siendo la media de TSH 1.5 UI/L, para T4L 17.8 pmol/L, T3 total de 2.0 nmol/L y un volumen tiroideo de 11.9 ml.

Se integró también, un grupo de acuerdo a nuestros criterios: ausencia de AHF de distiroidismo, exploración tiroidea normal, TSH de 0.4 a 4.0 UI/L, ultrasonografía estructuralmente normal (no bocio, no nódulos) y excluyendo aquellos individuos con un Zingrillo 3 (glándula con una hipoeogenicidad generalizada y acentuada similar al músculo esternocleidomastoideo). Estos criterios fueron cumplidos por 171 sujetos, de los cuales 95 son hombres y 76 mujeres, con edad promedio de 28 años, siendo 2.2 UI/mL la media de TSH, en el grupo el volumen tiroideo y la T4L resultó ser mayor en los varones. Las características de este grupo se detallan en el cuadro 2.

Los intervalos de referencia que se establecen basados en los criterios de la NACB son 9.68 UI/mL para la percentila 97.5 y 2 UI/mL para la percentila 2.5, con una media de 3.81 UI/mL, el número de sujetos fue de 52. Los intervalos de

referencia que se establecen de acuerdo a los criterios de nuestro grupo son 9.0 UI/mL para la percentila 97.5 y 2.0 UI/mL para la percentila 2.5, con una media de 3.46 U/mL, el número de sujetos fue de 171. No hubo diferencias estadísticas entre los grupos. Cabe mencionar que a diferencia de otros autores, nosotros encontramos en nuestra población, que el patrón de distribución de los TPO Ac y Tg Ac es no Gaussiana y al someter los resultados a transformación logarítmica estos no se corrigen a la normalidad. Por lo tanto los resultados mostrados son de las percentilas empíricas, además se eliminaron los valores extremos (“outliers”), considerando a aquellos, como los iguales o mayores a la media mas 4 desviaciones estándar. Ver Cuadro 4.

En el análisis total de la población, se encontró que 29 sujetos (10.9 %) tienen niveles de TPO Ac por arriba del límite recomendado por el fabricante, siendo predominante en el grupo de las mujeres; cuando se utilizo el nivel de TPO Ac por arriba del límite fijado en nuestra población de referencia se encontró un 15% de la población (40 sujetos), siendo predominante en el género femenino.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la selección de personas eutiroideas, de acuerdo con los criterios de la NACB y en conjunto con el ultrasonido del tiroides; ofrece bases sólidas para establecer intervalos de referencias para TPO Ac.

Hoy en día se recomiendan inmunoensayos cuantitativos altamente sensibles, que emplean como antígeno preparaciones de TPO humana, nativa o recombinante (hTPO) que elimina el riesgo de contaminación. Nosotros utilizamos el equipo SELco MEDIPAN GMBH (Dahlewitz/Berlin, Germany), un radioinmunoensayo competitivo de una fase estandarizado con la preparación internacional de referencia MRC 66/387 de la OMS. El fabricante considera a los TPO Ac positivos como aquellos niveles por arriba de 50 UI/mL, con una sensibilidad analítica de 2.0 UI/mL (zona gris de 40-50 UI/mL, valores normales (< 40 UI/mL)). Saxony et al reportó un estudio con 1295 sujetos eutiroideos según los criterios de la NACB, reportando un 98.6% de títulos detectables para TPO Ac, con niveles promedio de 0.45 UI/L, en su análisis demostró una distribución gaussiana de los títulos, independiente de edad y género; con un punto de corte para esta de 1.1 UI/L, sugiriendo que virtualmente todos los sujetos tienen títulos bajos de TPO Ac. En nuestro estudio obtuvimos un valor promedio de TPO Ac de 3.81 UI/mL para los del grupo de NACB y 3.46 UI/mL para el grupo que utilizó nuestros criterios de normalidad, estableciendo los

rangos de referencia en 2.0 – 9.68 UI/mL y 2.0 – 9.0 UI/mL respectivamente. Nosotros no observamos una distribución gaussiana de los resultados analizados. El obtener valores similares entre estos grupos nos sugiere que la población ideal para obtener valores de referencia puede ser equiparada cuando se utilizan criterios similares en una población sin déficit de yodo, como los que utilizamos nosotros. Es interesante ver que el grupo total un 32.2% de los sujetos mostró una TSH superior a 2.5 UI/L, sin tener títulos positivos para TPO Ac. Al igual que en otros reportes, observamos que en nuestra población existe una relación de la TSH y los niveles de TPO Ac, los estratos de TSH mayores contienen los individuos con concentraciones más altas de TPO Ac y similarmente se observa lo mismo con la ecogenicidad, al disminuir esta se incrementa las concentraciones de TPO Ac, corroborando el hallazgo de otros grupos, además de confirmar la utilidad del ultrasonido como una herramienta para predecir autoinmunidad tiroidea. Ver Fig 1 y 2.

Estudios a gran escala en población abierta han establecido una prevalencia de TPO Ac en sujetos eutiroideos “sanos”. Por ejemplo, en el NHANES III (17,000 sujetos) se reportó una prevalencia de 11.3% presentándose más frecuente en el género femenino. Nosotros (267 sujetos) reportamos una prevalencia global de 10.9%, hombres 4.9%, mujeres 16.6% con una $p = 0.003$. Sin embargo se debe tomar en cuenta que nuestra población tiene una mediana de 26 años y la prevalencia de TPO Ac sabemos que se incrementa con la

edad. Si tomamos como punto de corte 9.0 UI/mL para TPO Ac, la prevalencia se eleva a 15%.

Los TPO Ac están presentes frecuentemente en sujetos eutiroideos, existe evidencia fuerte; sugerente de que esto constituye una forma preclínica de hipotiroidismo, claro que también se ha asociado con un riesgo leve de hipertiroidismo. La determinación de TPO Ac parece ser útil como escrutinio inicial en sujetos seleccionados. La pregunta es porque unos pacientes con anticuerpos positivos no desarrollan enfermedad tiroidea y cuál es la implicación de los títulos “normales” que se están reportando con estos nuevos métodos cuantitativos. Solo estudios prospectivos pueden contestar estas preguntas.

Para nuestro conocimiento este es el primer estudio de intervalos de referencia para TPO Ac en población mexicana, con el que se establecen los valores de referencia para nuestra comunidad en 2.0 UI/mL (percentila 2.5) y 9.0 UI/mL (percentila 97.5) con una media de 3.46 UI/mL, utilizando el equipo SELco MEDIPAN GMBH (Dahlewitz/Berlin, Germany).

CONCLUSIONES

Los TPO Ac están presentes frecuentemente en sujetos eutiroideos; su determinación parece ser útil como escrutinio inicial en sujetos bien seleccionados. El obtener valores de referencia para TPO Ac en cada población en particular es necesario. El significado de los valores bajos de anticuerpos antitiroideos en individuos clínicamente eutiroideos no se conoce, mas sin embargo, estudios sugieren que pueden ser un factor de riesgo de futura disfunción tiroidea.

ANEXOS

Cuadro 1. Demografía y resultados del total de la población (n = 267).

	Total	Hombres	Mujeres	<i>P</i>
	n = 267	n = 122	n = 145	
Edad (años)	28.7 (±8.2)	26.6 (±5.3)	30.5 (±9.7)	0.028
Exploración física anormal del tiroides	18 (7.1%)	4 (3.5%)	14 (9.95%)	0.047
Volumen tiroideo (ml)	10.1 (±4.6)	11.5 (±4.36)	9.0 (±4.5)	0.001
T3 total (nmol/l)	2.02 (±0.4)	2.07 (±0.42)	2.0(±0.38)	0.068
T4 L (pmo/L)	15.7 (±3.9)	17.7 (±3.8)	14.1 (±3.3)	0.001
TSH (UI/L)	2.9 (±3.3)	2.65 (±2.3)	3.2 (±3.9)	0.042
TSH > de 2.5 (UI/L)	117 (43.8%)	45 (36.9%)	72 (49.7%)	0.036

Ac TG o Ac PO positivo	39 (14.6%)	9 (7.4%)	30 (20.7%)	0.002
Ac TG positivos ^a	33 (12.4%)	8 (6.6%)	25 (17.2%)	0.008
Ac PO positivos ^b	29 (10.9%)	6 (4.9%)	24 (16.6%)	0.003
Ambos anticuerpos positivos	24 (9%)	5 (4.1%)	19 (13.1%)	0.010

a. Ac TG positivos se consideran de acuerdo al fabricante las cifras medidas por arriba de 100 UI/L.

b. Ac PO positivos de acuerdo al fabricante del kit, son aquellos niveles por arriba de 50 UI/L.

Cuadro 2. Población de referencia de acuerdo a los criterios de nuestro grupo¹.

	Total	Hombres	Mujeres	<i>P</i>
	n = 171	n = 95	n = 76	
Edad	28.0 (±7.0)	27.0 (±5.6)	29.1 (±8.5)	0.699
Volumen tiroideo (ml)	9.9 (±3.9)	11.1 (±3.8) (3.7 – 18.5)	8.2 (±3.3) (1.7 – 14.7)	0.001
T3 total (nmol/L)	2.0 (±0.4)	2.1 (±0.4)	2.0 (±0.4)	0.028
T4L (pmol/L)	16.4 (±3.7)	17.9 (±3.5)	14.5 (±3.0)	0.001
TSH (UI/L)	2.2 (±0.9)	2.1 (±0.9)	2.3 (±0.8)	0.185
TSH > de 2.5 UI/L	55 (32.2%)	26 (27.4%)	29 (38.2%)	0.133

¹ Se excluyeron los individuos con AHF de distiroidismo, con exploración tiroidea anormal, los valores extremos (“outliers”) de acuerdo a la regla de 4 DE por arriba del promedio de los APO y se excluyeron los valores fuera del rango de TSH de 0.4 a 4.0 mUI/L.

Cuadro 3. Grupo de voluntarios seleccionados de acuerdo a los criterios de la NACB.

	Total
	n = 52
Edad	25.6 (\pm2.6)
Volumen tiroideo (ml)	11.9 (\pm4.0)
T3 total (nmol/L)	2.0 (\pm0.4)
T4L (pmol/L)	17.8 (\pm3.2)
TSH (UI/L)	1.5 (\pm0.4)

Cuadro 4. Intervalos de referencia para TPO Ac (UI/mL).

	n	Media	Mediana ³	DE	Percentilas	
					2.5	97.5
Intervalos de referencia de acuerdo a los criterios de nuestro grupo ¹	171	3.46	3.0 (2.0 – 13.0)	2.01	2.0	9.0
Intervalos de referencia basados en los criterios de la NACB ²	52	3.81	3.0 (2.0 – 10.0)⁴	2.17	2.0	9.68

1. Se excluyeron a los voluntarios con AHF para distiroidismo, con exploración física tiroidea anormal, los valores de TSH fuera del rango de 0.4 a 4.0 mUI/L y los valores extremos (“outliers”) 4 DE.
 2. Se eligieron los voluntarios de acuerdo a los criterios de la NACB para la población de referencia para APO y se excluyeron los valores extremos (“outliers”) utilizando el valor de 4 DE.
 3. No hubo diferencia estadística entre los 2 grupos ($p = 0.30$)
 4. Valores mínimo y máximo
-

Cuadro 5. Prevalencia de TPO

	Total	Hombres	Mujeres
	n = 267 (%)	n = 122 (%)	n = 145 (%)
APO por arriba del límite recomendado por el fabricante	29 (10.9)	5 (4.1)	24 (16.6)
APO con valores por arriba del límite fijado en nuestra población de referencia	40 (15.0)	10 (8.2)	30 (20.7)

Figura 1. El promedio de los TPO Ac para cada estrato de TSH se incrementa notablemente después a una TSH > de 3.0 UI/L (p 0.001).

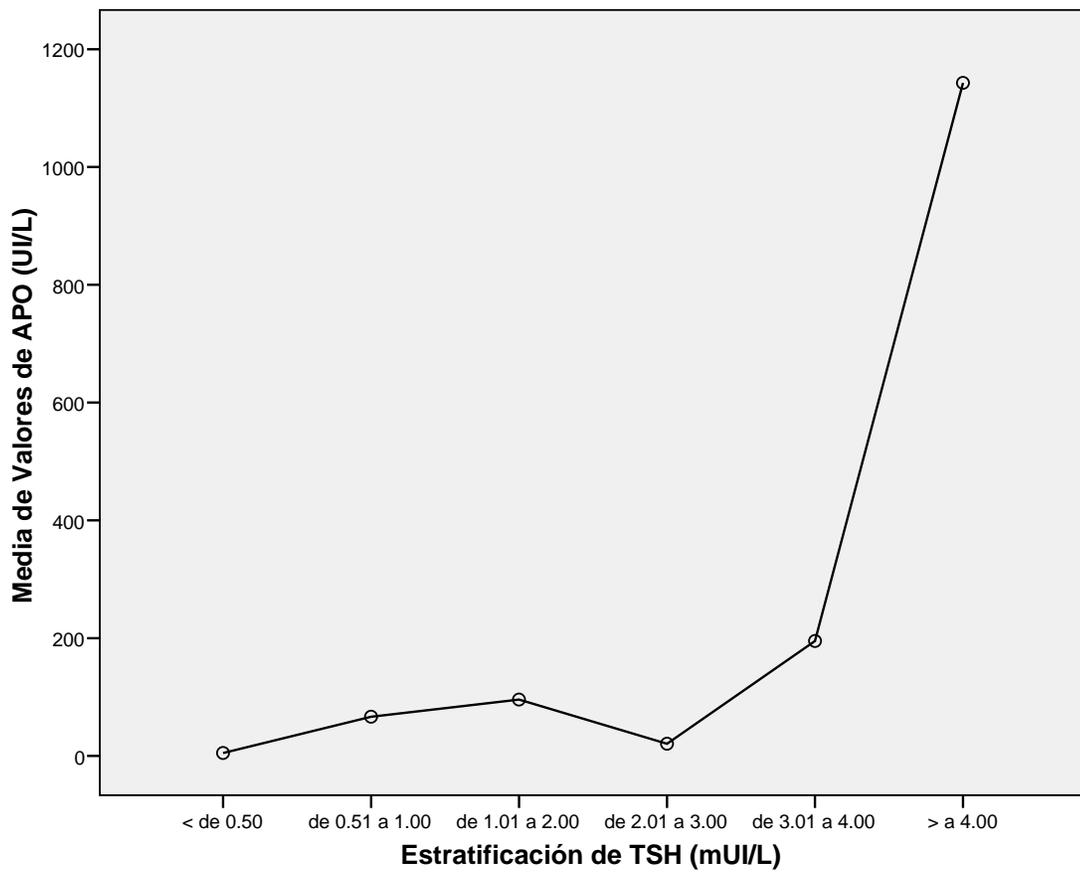
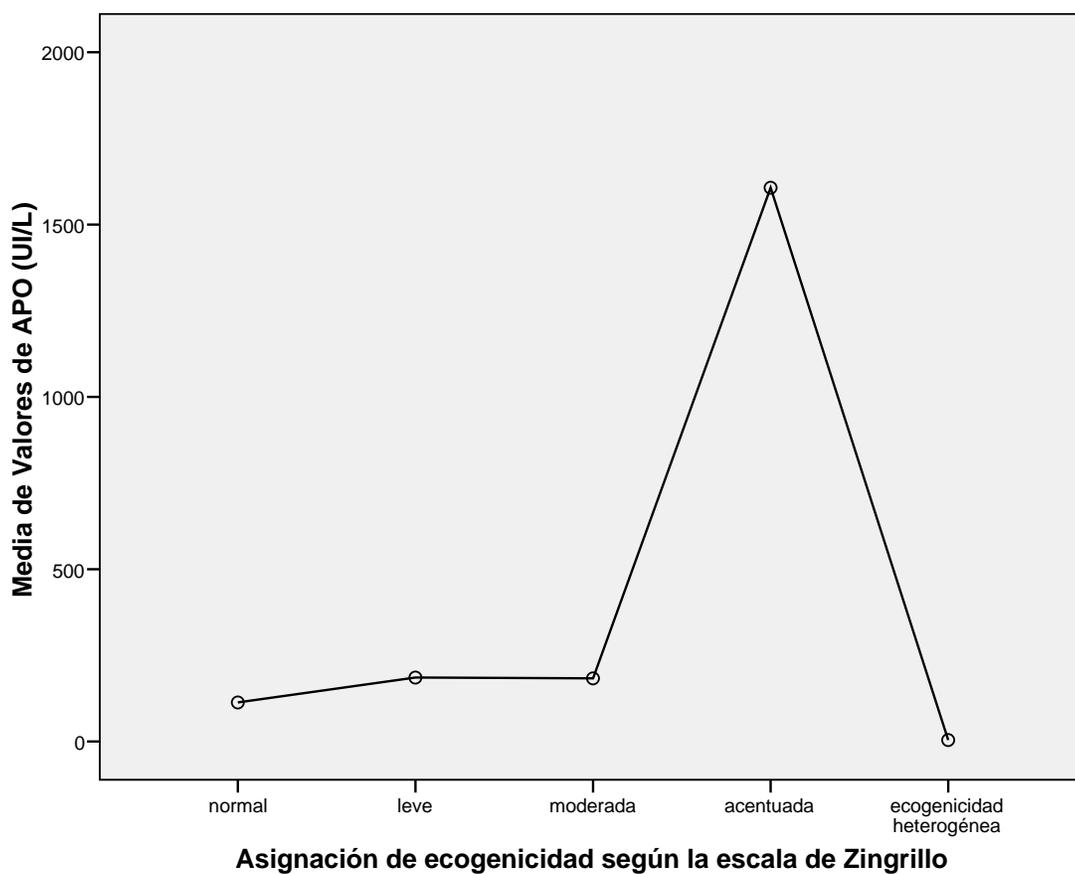


Figura 2. El Incremento de los promedios de TPO Ac es notable al disminuir la ecogenicidad, corroborando el hallazgo de otros grupos ($p < 0.001$). La creación de una cuarta categoría, ecogenicidad heterogénea, no fue útil como se demuestra en la gráfica.



REFERENCIAS

1. Saravanan P, Dayan CM. Thyroid autoantibodies. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001; 30: 315–337.
2. Mariotti S, Caturegli P, Piccolo P et al. Antithyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 661–669.
3. Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr Rev* 1994; 15: 788–830.
4. Yoshida H, Amino N, Yagawa K et al. Association of serum antithyroid antibodies with lymphocytic infiltration of the thyroid gland: studies of seventy autopsied cases. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 46: 859–862.
5. Hubl W, Schmieder J, Gladrow E, Demant T. Reference intervals for thyroid hormones on the Architect analyzer. *Clin Chem Lab Med* 2002 40: 165-166.
6. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devoix B, Demers LM et al. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease *Thyroid* 2003; 13: 3-126.
7. Roberts CG, Ladenson PW. Hypothyroidism. *Lancet* 2004; 363: 793–803.
8. Bjoro T, Holmen J, Kruger E et al. Prevalence of thyroid disease, thyroid dysfunction and thyroid peroxidase antibodies in a large, unselected population. The Health Study of Nord-Trøndelag (HUNT). *European Journal of Endocrinology* 2000; 43 639-647.

9. Davies L, Gather U. The identification of multiple outliers. *J Am Stat Assoc* 1993; 782-792.
10. Petitclerc C, Solberg HE. Approved recommendation on the theory of reference values and selection of individuals for the production of reference values. *J Clin Chem Biochem* 1987 25: 639-644.
11. Strieder TG, Prummel MF, Tijssen JG et al. Risk factors for and prevalence of thyroid disorders in a cross-sectional study among healthy female relatives of patients with autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol* 2003; 59: 396–401.
12. Dayan CM & Daniels GH. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med* 1996; 335: 99–107.
13. Kohno Y, Hiyama Y, Shimojo N et al. Autoantibodies to thyroid peroxidase in patients with chronic thyroiditis: effect of antibody binding on enzyme activities. *Clin Exp Immunol* 1986; 65: 534–541.
14. Kaczur V, Vereb G, Molnar I et al. Effect of anti-thyroid peroxidase (TPO) antibodies on TPO activity measured by chemiluminescence assay. *Clin Chem* 1997; 43: 1392–1396.
15. Okamoto Y, Hamada N, Saito H et al. Thyroid peroxidase activity-inhibiting immunoglobulins in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 730–734.
16. Prummel MF & Wiersinga WM. Autoimmune thyroid diseases. In Gill RG, Harmon JT & Maclaren NK (eds.) *Immunologically mediated endocrine*

- diseases. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2002, pp. 373–396.
17. McLachlan SM & Rapoport B. Autoimmune response to the thyroid in humans: thyroid peroxidase; the common autoantigenic denominator. *Int Rev Immunol* 2000; 19: 587–618.
 18. Rapoport B & McLachlan SM. Thyroid autoimmunity. *J Clin Invest* 2001; 108: 1253–1259.
 19. Chardes T, Chapal N, Bresson D et al. The human anti-thyroid peroxidase autoantibody repertoire in Graves' and Hashimoto's autoimmune thyroid diseases. *Immunogenetics* 2002; 54: 141–157.
 20. Jaume JC, Costante G, Nishikawa T et al. Thyroid peroxidase autoantibody fingerprints in hypothyroid and euthyroid individuals. I. Cross-sectional study in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 994–999
 21. Nishikawa T, Costante G, Prummel MF et al. Recombinant thyroid peroxidase autoantibodies can be used for epitopic 'fingerprinting' of thyroid peroxidase autoantibodies in the sera of individual patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 944–949.
 22. Jaume JC, Burek CL, Hoffman WH et al. Thyroid peroxidase autoantibody epitopic 'fingerprints' in juvenile Hashimoto's thyroiditis: evidence for conservation over time and in families. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 115–123.

23. Jaume JC, Guo J, Pauls DL et al. Evidence for genetic transmission of thyroid peroxidase autoantibody epitopic 'fingerprints'. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1424–1431.
24. Feldt-Rasmussen U. Analytical and clinical performance goals for testing autoantibodies to thyroperoxidase, thyroglobulin, and thyrotropin receptor. *Clin Chem* 1996; 42: 160–163.
25. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 2003; 13: 3–126.
26. Zophel K, Saller B, Wunderlich G et al. Autoantibodies to thyroperoxidase (TPOAb) in a large population of euthyroid subjects: implications for the definition of TPOAb reference intervals. *Clin Lab* 2003; 49: 591–600.
27. Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L et al. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods* 1998; 216: 117–137.
28. Gilmour J, Brownlee Y, Foster P et al. The quantitative measurement of autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase by automated microparticle based immunoassays in Hashimoto's disease, Graves' disease and a follow-up study on postpartum thyroid disease. *Clin Lab* 2000; 46: 57–61.
29. Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM 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.

30. Konno N, Yuri K, Taguchi H et al. Screening for thyroid diseases in an iodine sufficient area with sensitive thyrotrophin assays, and serum thyroid autoantibody and urinary iodide determinations. *Clin Endocrinol* 1993; 38: 273–281.
31. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders W Det al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 489–499.
32. Prentice LM, Phillips DI, Sarsero D et al. Geographical distribution of subclinical autoimmune thyroid disease in Britain: a study using highly sensitive direct assays for autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase. *Acta Endocrinol Copenh* 1990; 123: 493–498.
33. Bjoro T, Holmen J, Kruger O et al. Prevalence of thyroid disease, thyroid dysfunction and thyroid peroxidase antibodies in a large, unselected population. The Health Study of Nord-Trondelag (HUNT). *Eur J Endocrinol* 2000; 143: 639–647.
34. Mariotti S, Sansoni P, Barbesino G et al. Thyroid and other organ-specific autoantibodies in healthy centenarians. *Lancet* 1992; 339: 1506–1508.
35. Pedersen IB, Laurberg P, Knudsen N et al. A population study of the association between thyroid autoantibodies in serum and abnormalities in thyroid function and structure. *Clinical Endocrinology* 2005; 62, 713–720.
36. Kratzsch J, Fiedler GM, Leichtle A et al. New Reference Intervals for Thyrotropin and Thyroid Hormones Based on National Academy of

- Clinical Biochemistry Criteria and Regular Ultrasonography of the Thyroid. *Clinical Chemistry* 2005; 51:8 1480–1486.
37. González C, Hernando M, Cava F et al. Biological Variability of Thyroid Autoantibodies (Anti-TPO and Anti-Tg) in Clinically and Biochemically Stable Patients With Autoimmune Thyroid Disease. *J Clin Lab Anal* 2002; 16:37– 39.
38. Hoogendoorn EH, Hermus AR, Vegt F et al. Thyroid Function and Prevalence of Anti-Thyroperoxidase Antibodies in a Population with Borderline Sufficient Iodine Intake: Influences of Age and Sex. *Clinical Chemistry* 2006; 52:104–111.
39. Walsh JP, Bremner AP, Feddema P et al. Thyrotropin and Thyroid Antibodies as Predictors of Hypothyroidism: A 13-Year, Longitudinal Study of a Community-Based Cohort Using Current Immunoassay Techniques. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1095–1104.
40. Scofield RH. Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet* 2004; 363: 1544–1546.
41. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R et al. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin Endocrinol* 1977; 7: 481–493.
42. Surks MI, Ortiz E, Daniels GH et al. Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. *JAMA* 2004; 291: 228–238.

43. Helfand M. Screening for subclinical thyroid dysfunction in adults: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2004; 140: 128–141.
44. Tait KF & Gough SC. The genetics of autoimmune endocrine disease. *Clin Endocrinol* 2003; 59: 1–11.
45. Prummel MF, Strieder T & Wiersinga WM. The environment and autoimmune thyroid diseases. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 605–618.
46. Peter C, O’Leary, Peter H, Feddema, Valdo P et al. Investigations of thyroid hormones and antibodies based on a community health survey: the Busselton thyroid study. *Clinical Endocrinology* 2007; 64, 97–104.
47. Robert J. McConnell, Alina V, et al. Factors associated with elevated serum concentrations of anti-TPO antibodies in subjects with and without diffuse goiter. Results from the Ukrainian–American Cohort Study of Thyroid Cancer and Other Thyroid Diseases Following the Chernobyl Accident. *Clinical Endocrinology* 2007; 67:6, 879-890.
48. Jensen EA, Petersen P, Blaabjerg O et al. Establishment of reference distributions and decision values for thyroid antibodies against thyroid peroxidase (TPOAb), thyroglobulin (TgAb) and the thyrotropin receptor (TRAb). *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(8):991–998.
49. Gutekunst R, Hafermann W, Mansky T & Scriba PC. Ultrasonography related to clinical and laboratory findings in lymphocytic thyroiditis. *Acta Endocrinol Copenh* 1989; 121: 129–135.

50. Pedersen OM, Aardal NP, Larssen TB et al. The value of ultrasonography in predicting autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2000; 10: 251–259.
51. Mazziotti G, Sorvillo F, Iorio S et al. Grey-scale analysis allows a quantitative evaluation of thyroid echogenicity in the patients with Hashimoto's thyroiditis. *Clin Endocrinol* 2003; 59: 223–229.
52. Schiemann U, Gellner R, Riemann B et al. Standardized grey scale ultrasonography in Graves' disease: correlation to autoimmune activity. *Eur J Endocrinol* 1999; 141: 332–336.
53. Raber W, Gessl A, Nowotny P & Vierhapper H. Thyroid ultrasound versus antithyroid peroxidase antibody determination: a cohort study of four hundred fifty-one subjects. *Thyroid* 2002; 12: 725–731.
-