

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

INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA
“FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA”

TESIS DE POSGRADO

**DESBALANCE ENTRE CÉLULAS EFECTORAS DE
MEMORIA Y CELULAS T REGULADORAS Y SU
CORRELACION CON LA CLASIFICACIÓN VISA EN
ORBITOPATIA DE GRAVES EN HUMANOS**

PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD DE

OFTALMOLOGÍA

PRESENTA

DRA. MARÍA SANDRA SALAZAR RAMOS

TUTORA DE TESIS

DRA. MARIA DEL CARMEN JIMENEZ MARTÍNEZ

ASESOR DE TESIS

DR. JOSÉ LUIS TOVILLA CANALES

AGOSTO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE GENERAL

	Pág.
Índice general.....	2
Índice de figuras.....	3
Índice de tablas.....	3
Abreviaturas.....	4
Resumen.....	5
Abstract.....	6
Introducción.....	7
Fisiología de la tiroides.....	7
Enfermedad de Graves.....	8
Orbitopatía tiroidea.....	10
Clasificación Clínica de la Orbitopatía de Graves.....	10
Inmunopatología de la enfermedad de Graves.....	12
Linfocitos T.....	14
Células T reguladoras y células efectoras (Treg vs Th17/CD57+).....	15
Antecedentes.....	16
Planteamiento del problema.....	17
Hipótesis.....	17
Justificación.....	17
Objetivo general.....	18
Objetivos particulares.....	18
Diseño del estudio.....	18
Criterios de inclusión.....	19
Criterios de exclusión.....	19
Criterios de eliminación.....	19
Metodología.....	19
Tamaño de la muestra	19
Consideraciones éticas.....	19
VARIABLES DEL ESTUDIO.....	20
Pacientes con Orbitopatía de Graves	20
Anticuerpos Monoclonales y Reactivos.....	21
Células Mononucleares de Sangre Periférica.....	21
Tinción de Inmunofluorescencia de marcadores de superficie celular.....	21
Tinción de Inmunofluorescencia de proteínas celulares.....	22
Análisis por Citometría de Flujo.....	22
Análisis estadístico.....	22
Resultados.....	23
Discusión.....	27
Conclusiones.....	29
Anexos.....	30
Bibliografía.....	37

Índice de figuras

Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo.....	8
Figura 2. Autoanticuerpos presentes en la enfermedad tiroidea autoinmune.....	9
Figura 3 Datos demográficos de la muestra estudiada.....	23
Figura 4. Puntaje de la clasificación VISA según grupo de estudio.....	24
Figura 5. Determinación de linfocitos T CD8CD57.....	24
Figura 6. Determinación de linfocitos T CD8CD103.....	25
Figura 7. Determinación de linfocitos T CD4CD57.....	25
Figura 8. Determinación de linfocitos T CD4CD25FOXP3.....	26
Figura 9. Determinación de linfocitos T CD57.....	26

Índice de tablas

Tabla 1 Evaluación de Actividad en Orbitopatía de Graves.....	10
Tabla 2 Clasificación de Severidad en Orbitopatía de Graves (OG).....	11
Tabla 3 Clasificación VISA de actividad y severidad de la orbitopatía tiroidea.....	11
Tabla 4 Correlación del VISA vs Poblaciones Linfocitarias.....	27

ABREVIATURAS

ACT	Pacientes activos con tratamiento
AST	Pacientes activos sin tratamiento
CAS	<i>Clinical activity score</i> , por sus siglas en inglés
CD	Cluster of differentiation, por sus siglas en inglés
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, por sus siglas en inglés
EUGOGO	Grupo Europeo de Orbitopatía de Graves
FOXP3	Forkhead box P3, por sus siglas en inglés
GCSF	Granulocyte colony stimulant factor, por sus siglas en inglés
GRO- α	Growth regulated oncogene alpha, por sus siglas en inglés
HLA	Human leukocyte antigen, por sus siglas en inglés
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1, por sus siglas en inglés
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1, por sus siglas en inglés
OG	Orbitopatía de Graves
PGE-2	Prostaglandina E 2
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TBG	Thyroxine-binding globuline, por sus siglas en inglés
Tg	Tiroglobulina
TGF β	Factor de crecimiento tumoral beta
Th	Linfocitos T cooperadores
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPO	Peroxidasa
Treg	Linfocitos T reguladores
TSH	Hormona Estimulante de Tiroides
TSHR	Receptor de Hormona Estimulante de Tiroides

RESUMEN

La enfermedad de Graves es un trastorno autoinmunitario producido por autoanticuerpos dirigidos contra el receptor TSH y es la causa más frecuente de hipertiroidismo endógeno, presenta su máxima incidencia entre los 20 y 40 años y se presenta más frecuente en mujeres.

Recientemente, se ha propuesto que el desequilibrio entre las células T efectoras y reguladoras que parece ser crucial en la patogénesis de la enfermedad de Graves en modelo murino. Fenotípicamente, las células Tregs CD4+CD25+FOXP3+ son células que suprimen la proliferación de las células T CD8+ efectoras.

En éste trabajo se evaluó la frecuencia de las células T reguladoras y efectoras en pacientes con oftalmopatía de Graves y los datos obtenidos se correlacionaron con la clasificación clínica VISA.

En el estudio se incluyeron en total 24 pacientes. Se utilizaron como procedimientos base de este estudio la tinción de Inmunofluorescencia de los Marcadores de la superficie celular y la tinción de Inmunofluorescencia de Proteínas Intracelulares; los resultados de las tinciones intracelulares se analizaron por Citometría de Flujo.

Durante el análisis llevado a cabo se sugirió que los cambios clínicos puedan estar relacionados con la actividad y frecuencia de las células efectoras además de las citocinas producidas por las mismas, sin embargo se requieren estudios funcionales para corroborar los hallazgos.

Se puede concluir que existe una diferencia significativa entre las concentraciones de Linfocitos T efectores entre los pacientes con y sin enfermedad de Graves, así como una diferencia significativa en las concentraciones de Linfocitos T reguladores entre los pacientes con Orbitopatía activa e inactiva y los pacientes sin enfermedad de Graves; además de existir una correlación entre la clasificación clínica VISA y las concentraciones de poblaciones linfocitarias.

ABSTRACT

Graves' disease is an autoimmune system disorder produced by antibodies targeted against the TSH receptor and it is considered the most frequent cause of endogenous hyperthyroidism, it has its highest incidence between 20 and 40 years and is more common among women.

Recently, it has been suggested that an imbalance between the effector and regulatory T cells appears to be critical in the pathogenesis of Graves' disease in the murine model. Phenotypically, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg cells suppress the proliferation of the CD8⁺ effector T cells.

In this thesis it was evaluated the frequency of the effector and regulatory T cells on patients with Graves's ophthalmopathy, the data obtained were correlated with the VISA clinical classification.

The study included 24 patients. The principal procedures utilized on this study were Intracellular Immunofluorescence staining and Cellular Surface Immunofluorescence markers; the results of the intracellular staining were analyzed by Flow cytometry.

During the analysis it was suggested that clinical modifications may be related to the activity and frequency of the effector cells as well as the cytokines that they produced; nonetheless, more functional studies are needed in order to corroborate the findings.

It can be concluded that there is a significant difference between the concentrations of the effector T lymphocytes between patients with Graves' disease and without Graves's disease, as well a significant difference in the levels of regulatory T lymphocytes from patients with active and with inactive orbitopathy and patients without Graves' disease; in addition it is present a correlation between the VISA clinical classification and concentrations of lymphocyte populations.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Graves es una afectación autoinmune órgano específica con manifestaciones multisistémicas, caracterizada por hiperplasia glandular difusa (bocio), hiperfunción glandular (tirotoxicosis), oftalmopatía y mixedema pretibial, se le denominó así en honor a Robert Graves, un médico Irlandés, quien fue el primero en describir esta forma de hipertiroidismo, hace 150 años aproximadamente.¹

Fisiología de la tiroides

Las células tirotróficas del lóbulo anterior de la hipófisis liberan TSH (tirotropina) hacia la circulación en respuesta a factores tróficos procedentes del hipotálamo. La TSH actúa en la tiroides, promoviendo que las células epiteliales de los folículos capten el coloide mediante pinocitosis (proceso biológico que permite a determinadas células y organismos unicelulares obtener líquidos orgánicos del exterior para ingresar nutrientes u otra función) y conviertan la tiroglobulina en tiroxina (T4), y en cantidades menores de triyodotironina (T3) (Figura. 1). Estas sustancias son liberadas a la circulación sistémica donde, se unen de manera reversible en su mayoría a proteínas plasmáticas circulantes, entre las cuales se encuentra la globulina de unión a la tiroxina (TBG, thyroxine-binding globuline), que las transportan hacia los tejidos periféricos. Las proteínas de unión sirven para mantener las concentraciones séricas de T3 y T4 libre dentro de los límites normales, así mismo aseguran la disponibilidad de las hormonas para los tejidos. Tanto T3 como T4 libres penetran a las células e interactúan con los receptores nucleares, lo cual produce un cambio en la expresión genética, finalmente se traduce en un aumento del catabolismo de carbohidratos y lípidos así como de una estimulación de la síntesis de proteínas en una amplia variedad de células. (Figura 1)

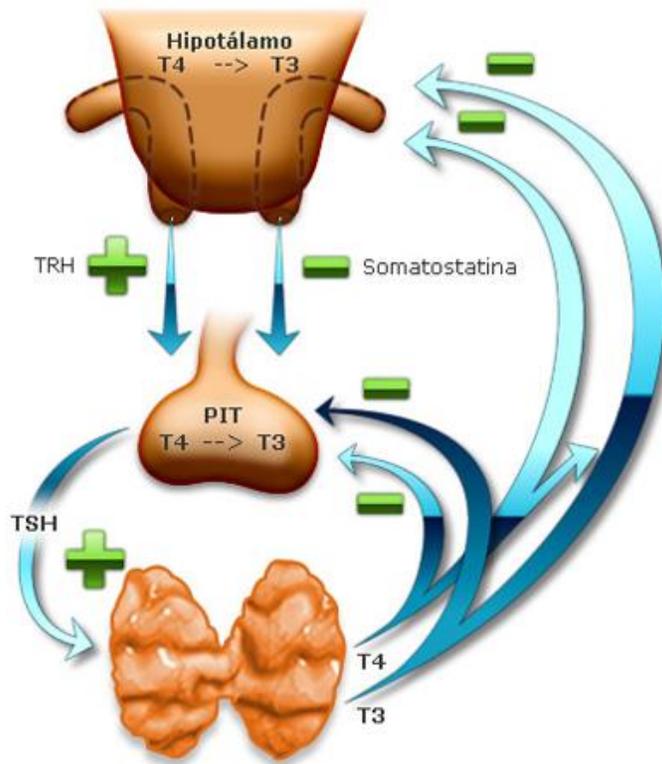


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo

[SARTD-CHGUV Sesión de Formación Continua Valencia 18 de Junio de 2013]

La glándula tiroides es uno de los órganos con más capacidad de respuesta del organismo y se encuentra en un estado de adaptación constante, por lo tanto los desórdenes de la misma pueden conducir al desequilibrio de la respuesta a gran cantidad de estímulos, por lo cual estas patologías son muy importantes². Las enfermedades de la tiroides se pueden considerar de tres tipos: en aquellas que se encuentran asociadas a la liberación excesiva de hormonas tiroideas (hipertiroidismo), las asociadas al déficit de hormonas tiroideas (hipotiroidismo) y las lesiones tumorales de la tiroides. Una de éstas enfermedades es la Enfermedad de Graves.

Enfermedad de Graves

La enfermedad de Graves es un trastorno autoinmunitario producido por autoanticuerpos dirigidos contra el receptor TSH y es la causa más frecuente de hipertiroidismo endógeno. (Figura 2).

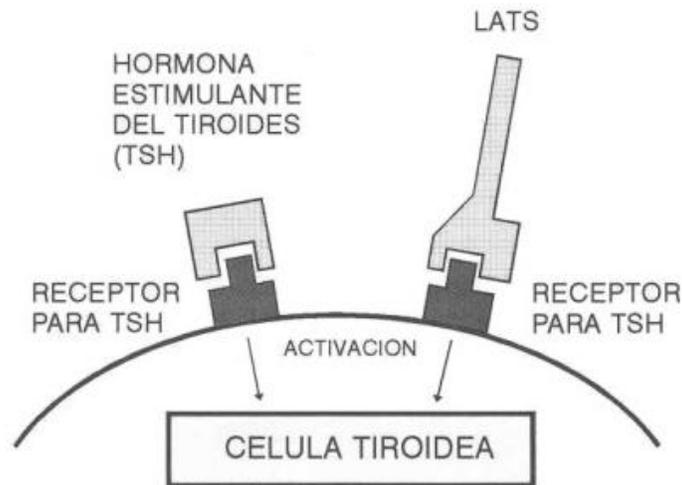


Figura 2. Autoanticuerpos presentes en la enfermedad tiroidea autoinmune.

[<http://hgculiacan.com/biblioteca%20medica/inmunologia/humorales.htm>]

Se caracteriza por una triada de manifestaciones clínicas:

1. Hipertiroidismo, debido al aumento difuso e hiperfuncional de la tiroides.
2. Oftalmopatía infiltrante, que provoca exoftalmos.
3. Dermatopatía infiltrante localizada, a veces denominada mixedema pretibial, afectando solo a algunos pacientes.

La enfermedad de Graves presenta su máxima incidencia entre los 20 y 40 años; se presenta más frecuente en mujeres que en los varones, hasta siete veces más. En su patogenia son importantes los factores genéticos, se ha visto una mayor incidencia en pacientes miembros de la misma familia.³

La enfermedad tiene una fuerte asociación con los halotipos HLA-B8 Y HLA-DR3, aunque no se conoce la forma en que estas asociaciones incrementan la susceptibilidad.

El estado hipermetabólico que genera la elevación de los niveles de T3 y T4 libres produce las manifestaciones clínicas de la tirotoxicosis además de la hiperplasia difusa de la tiroides, la oftalmopatía y la dermatopatía.⁴

Todos los casos se asocian a un aumento difuso del tamaño de la tiroides, esto puede acompañarse de incremento del flujo sanguíneo por la glándula hiperactiva. Así mismo la oftalmopatía infiltrativa se debe a una combinación de la hiperactividad que acompaña a

la tirotoxicosis y al depósito de los componentes de la matriz extracelular detrás del globo ocular.

Orbitopatía tiroidea

La orbitopatía tiroidea se presenta en un 25 a 50% de los pacientes que padecen enfermedad de Graves. Es más frecuente en mujeres que en hombres y su edad de aparición más común está entre los 20 y 50 años de edad.

El mecanismo exacto por el cual existe enfermedad orbitaria es complejo ya que participan una gran cantidad de mecanismos inmunológicos.¹

Clasificación Clínica de la Orbitopatía de Graves

Existen diferentes escalas de graduación de actividad y severidad de la Orbitopatía de Graves, lo cual ha sido útil para homogeneizar criterios y estandarizar terapias.

La Tabla 1 muestra la escala de actividad más utilizada, que es la CAS (Clinical Activity Score).⁵ Los pacientes que tienen un índice CAS > 3/7 en esta escala suponen una enfermedad ocular activa.

Tabla 1 Evaluación de Actividad en Orbitopatía de Graves
Dolor retrobulbar espontáneo
Dolor en la mirada hacia arriba o abajo
Eritema palpebral
Eritema de conjuntiva
Edema palpebral
Inflamación de la carúncula
Edema Conjuntival

La Tabla 2 muestra la clasificación de severidad que se aplica en el consenso del Grupo Europeo de Orbitopatía de Graves (EUGOGO)⁶. Ambas clasificaciones son de gran utilidad para enfrentar el tratamiento.

Tabla 2 Clasificación de Severidad en Orbitopatía de Graves (OG)

Riesgo Visual en OG	Pacientes con Neuropatía Óptica distiroidea y/o disrupción corneal
OG Moderada a Severa	Presenta uno o más de los siguientes signos: <ul style="list-style-type: none"> - Compromiso de tejido blando moderado o severo, - Exoftalmos >3mm sobre el normal para raza y sexo - Retracción palpebral >2mm - Diplopía inconstante o constante
OG Leve	Presenta uno o más de los siguientes signos: <ul style="list-style-type: none"> - Compromiso leve de tejido blando - Exoftalmos <3 mm sobre el normal para raza y sexo - Retracción palpebral <2mm

Finalmente la Tabla 3 muestra la clasificación VISA₇, la cual mide distintos parámetros en base a los datos de severidad y actividad de la enfermedad, siendo la clasificación que se tomará como referencia en esta investigación.

Tabla 3. Clasificación VISA de actividad y severidad de la orbitopatía tiroidea

Visión	<ul style="list-style-type: none"> Agudeza visual Capacidad visual Visión cromática Reflejos pupilares Apariencia del nervio Hay o no neuropatía
--------	--

Inflamación	Dolor en reposo o con movimientos oculares Edema Hiperemia palpebral o conjuntival Quemosis Dolor
Estrabismo	Diplopía o no Intermitente o constante Limitaciones Medición de desviación
Apariencia	Edema de párpado Retracción palpebral Fat pockets, SCE Resequedad o lagrimeo Proptosis Queratopatía por exposición.

Inmunopatología

Se puede perder la tolerancia a los antígenos propios presentados durante la etapa fetal, llevando a reacciones inmunitarias que clínicamente se manifiestan como enfermedades autoinmunes. Los mecanismos propuestos para la autoinmunidad incluyen mimetismo molecular, modificaciones proteínicas anormales, liberación de antígenos secuestrados y difusión de epítomos.⁸

La enfermedad de Graves es una enfermedad órgano específico caracterizado por autoanticuerpos dirigidos contra tres diferentes antígenos tiroideos: la tiroglobulina (Tg), la peroxidasa tiroidea (TPO) y el receptor de TSH (TSHR) ².

Estos anticuerpos pueden tener acción activadora o bloqueadora del TSHR; cuando predominan funcionalmente los de acción estimulante aumentan la síntesis de hormona tiroidea, lo que da lugar a hipertiroidismo.

Aunado a esto, se ha encontrado un aumento de TSHR en las células grasas y fibroblastos de la órbita, por lo tanto se sospecha que los anticuerpos anti TSHR se unen a su receptor

en fibroblastos orbitarios, los cuales pueden reaccionar de dos maneras diferentes según la subpoblación que se vea afectada mayoritariamente, desarrollándose un mayor compromiso muscular o adiposo.⁹

Una vez activado el fibroblasto por la acción de citocinas, secreta una gran cantidad de glicosaminoglicanos, los cuales atraen agua por sus propiedades hidrofílicas y esto genera un aumento de volumen importante en la matriz de las células de los músculos extraoculares, sin afectar la miofibrilla, provocando el compromiso muscular. Sin embargo si el fibroblasto activado es un pre adipocito, se desarrolla un proceso de adipogénesis con aumento del tejido graso en la órbita. Ambos efectos, provocan un aumento en la presión dentro de la órbita, por lo q disminuye el retorno venoso, provocando la proptosis y los signos inflamatorios locales tales como quemosis y edema periorbitario. Por ser la órbita una cavidad ósea inexpandible y presentar un aumento de los tejidos, se produce la protrusión del globo ocular, siendo esto en cierto modo beneficioso ya que evita la compresión del nervio óptico. Aquellos pacientes que poseen un gran engrosamiento de los músculos extra oculares y no presentan proptosis son más proclives al compromiso visual por compresión del nervio óptico.^{10,11}

La historia natural de esta enfermedad no es totalmente conocida, pero sí se ha observado un período de actividad inflamatoria inicial progresiva tras el cual la gran mayoría de los pacientes mejoran siendo el tiempo de duración de la fase activa entre 2 y 5 años; posteriormente presentando cambios fibrosos y secuelas de la inflamación.

Las células efectoras de memoria CD8⁺ tienen un papel en la defensa inmunitaria de células infectadas por patógenos intracelulares y son un factor clave en la respuesta inmune antitumoral¹², es posible que se activen mediante células dendríticas a través de mecanismos que incluyan la transpresentación de antígenos¹³. Su función protectora se realiza a través de dos mecanismos básicos: citotoxicidad y contribución a la producción de citocinas como IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10.¹²

La respuesta específica de las células T CD8⁺ contra un patógeno se inicia a través del reconocimiento de antígenos presentados de modo adecuado por moléculas MHC I y señales derivadas de coestimulación, sobre todo a través de CD40.^{14,15}

Linfocitos T

Los linfocitos T tienen una participación importante en la activación de los fibroblastos orbitarios, que expresan CD40. Esta molécula se une a su ligando CD40L (CD154) expresado en la superficie de los linfocitos T, lo que provee una coestimulación a las células T produciendo una expansión clonal de linfocitos y aumentando la producción de citocinas pro inflamatorias incluyendo a la IL1, IL6 y IL8. Estas citocinas activan la expresión de PGE-2, hialuronana sintasa y UDP glucosa deshidrogenasa llevando a la producción de hialuronana y a la inflamación.¹⁶

La fase inflamatoria de la enfermedad que es caracterizada por la infiltración de células T frecuentemente está acompañada de mastocitos, linfocitos B y macrófagos. En dichos infiltrados orbitarios de forma temprana aparecen numerosas células T CD4+CD45RO+ activadas, las cuales producen citocinas y agentes quimiotácticos que amplifican la respuesta inmune.¹⁷

La infiltración es guiada por linfocitos T cooperadores CD4+ a las fibras musculares y la grasa orbitaria, lo cual nos sugiere que el tejido conectivo es la principal diana de la enfermedad autoinmune. ¹⁸

Se han descrito a las células Th1, Th2 o Th17 en otros modelos de enfermedades autoinmunes como las células infiltrantes ya que se comportan como células efectoras modulando el proceso autoinmunitario.

Se ha reportado evidencia inmunohistoquímica de citocinas incluyendo al interferón gamma (IFN γ), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e IL1 como moléculas asociadas a la infiltración de células Th1. ¹⁷

Estas citocinas pueden ser producidas por células mononucleares infiltrantes y fibroblastos residentes puesto que también han sido detectadas en áreas desprovistas de infiltración mononuclear⁶. Específicamente la IL 1 a es una citocina proinflamatoria producida por monocitos, macrófagos y fibroblastos que juega un papel crítico en la promoción de inflamación y de proteínas de la matriz extracelular ¹⁹.

El patrón predominante de las citocinas de Th1 encontradas en la enfermedad activa puede cambiarse por citocinas de Th2 como la IL4, IL5, e IL13 durante la fase estable de la

enfermedad ⁷. Este cambio altera el tráfico de células inmunes promoviendo la fibrosis tisular y la resolución de la enfermedad.²⁰

Células T reguladoras y células efectoras (Treg vs Th17/CD57+)

El CD57+, también conocido como HNK-1 (*Human Natural Killer-1*)²¹ es un marcador que puede expresarse en algunas subpoblaciones de linfocitos T (Focosi). Se ha demostrado que la pérdida de CD28 aumenta la expresión de CD57+ en células estimuladas por respuestas inmunes en primates más no en ratones.^{22,23}

La disminución de las células T reguladoras (Treg), acompañada de un incremento de las células T efectoras, puede resultar en enfermedades autoinmunes severas mientras, inversamente, el aumento de Treg, está asociado a remisión de enfermedad.²⁴

Las células Treg confieren un papel importante en el balance de la respuesta inmune manteniendo la tolerancia periférica a antígenos múltiples incluyendo autoantígenos y suprimiendo a las células T efectoras con fenotipo tanto Th1, Th2 y Th17.²⁵

Las células Treg, son células productoras de TGF-fundamentales: modula la proliferación celular, generalmente como supresor, y promueve el depósito de matriz extracelular promoviendo su síntesis e inhibiendo su degradación, además de ser inmunosupresor por una gran variedad de mecanismos. Regula al sistema inmunitario por medio de las células T reguladoras CD25+ estimulando su desarrollo al igual que el de las células Th17. Bloquea la activación de linfocitos y de monocitos derivados de fagocitos. Cualquier alteración que afecte la señalización de TGF- generará inflamación, desórdenes autoinmunes, fibrosis, cáncer y cataratas.²⁶

Naturalmente las células T reguladoras CD4+CD25+ (Tregs) representan una población linfocitaria mayor que participa en el control de las respuestas T autorreactivas y el mantenimiento de la tolerancia inmune.^{1,27} En modelos de ratones las células Tregs CD4+CD25+ forman una población que representa del 1 al 10% de todas las células T CD4+ en sangre periférica; en los humanos, el 3 al 10% de las células T CD4+ circulantes son Tregs.² Fenotípicamente, las células Tregs CD4+CD25+ son FOXP3+, éstas células suprimen la proliferación de las células T CD4+ efectoras.³ Recientemente, se ha propuesto que el desequilibrio entre las células T efectoras y reguladoras parece ser crucial en la

patogénesis de la enfermedad de Graves murina. En humanos se ha reconocido que las células portadoras de CD57 son subconjuntos de células T diferenciadas terminales y las células T (CD8+) que expresan la molécula CD57 actúan como células efectoras de memoria.²⁸

Existen cambios cuantitativos al incrementarse las poblaciones de células CD8+ y CD57+ en enfermedades autoinmunes crónicas como esclerosis múltiple, DMI, enfermedad de Graves (6), artritis reumatoide y espondilitis anquilosante; el incremento de estas células muestra una actividad citotóxica muy alta.¹²

Las células CD103+ se encuentran principalmente en tejidos no linfoides y están especializadas en la presentación cruzada de antígenos asociados a células.²⁹

Se ha visto que ciertas células de CD4+/FOXP3- expresan CD103+ debido a actividades regulatorias antiinflamatorias y de homeostasis. El CD103+ es un importante regulador de respuesta inmune que comparte orígenes y funciones con el CD8+, no obstante producen diferentes citoquinas y quimiocinas; el CD103+ produce niveles más altos de IL-1 β , IL-6 e IL-1 que favorecen la diferenciación de Th17.³⁰

Por lo anterior en éste trabajo se evaluó la frecuencia de las células T reguladoras y efectoras en pacientes con oftalmopatía de Graves y los datos obtenidos se correlacionaron con la clasificación clínica VISA.

ANTECEDENTES

En un estudio preliminar, llevado a cabo en el Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”, con los mismo grupos de estudio: grupo A con diagnóstico de Orbitopatía de Graves inactiva, grupo B con Orbitopatía de Graves activa sin tratamiento (AST), grupo C con actividad con tratamiento (ACT), se encontró un cambio entre la frecuencia de linfocitos T CD4+CD25+FOXP3+ y los linfocitos T CD8CD57₁₂; sin embargo en éste estudio preliminar la muestra de pacientes fue muy pequeña y no suficiente para generar resultados estadísticamente significativos.

Además de que no se logró asociar este desequilibrio con la actividad clínica, por lo que un estudio con las características planteadas en esta tesis podría ayudar para el mejor conocimiento de la patogenia de esta enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se cree que los cambios entre la frecuencia de linfocitos T CD4+CD25+FOXP3+ y los linfocitos T CD8CD57 producen la etiopatogenia de ésta enfermedad^{2,16} por lo tanto se podrían correlacionar los niveles de linfocitos T con la clasificación de severidad y actividad.

HIPÓTESIS

Existe un desequilibrio en los pacientes con orbitopatía tiroidea entre las células efectoras (CD8+CD57+CD103+) y reguladoras (CD4+CD25+FOXP3+), así mismo éste desequilibrio se correlaciona con puntajes más altos en la clasificación de VISA.

- Ho: No existe diferencia significativa entre las concentraciones de Linfocitos (CD8+CD57+CD103+) y Linfocitos T CD4+CD25+FOXP3+ entre los pacientes con Orbitopatía tiroidea activa, inactiva y sanos.
- HA: Existe diferencia significativa entre las concentraciones de Linfocitos T (CD8+CD57+CD103+) y Linfocitos T CD4+CD25+FOXP3+, entre los pacientes con Orbitopatía tiroidea activa e inactiva.
- Ho: No existe correlación con la clasificación VISA y las concentraciones de linfocitos T efectores y T reguladores entre los pacientes con Orbitopatía tiroidea activa e inactiva.
- HA: Existe correlación con la clasificación VISA y las concentraciones de linfocitos T efectores y T reguladores entre los pacientes con Orbitopatía tiroidea activa e inactiva.

JUSTIFICACIÓN

Recientemente, se ha propuesto que existe un desequilibrio entre las células T efectoras y reguladoras para la patogénesis de la enfermedad de Graves murina. Sin embargo esto no se ha confirmado en humanos o en algún modelo de la enfermedad. Fenotípicamente, las

células Tregs CD4+CD25+FOXP3+ son células que suprimen la proliferación de las células T CD8+ efectoras.

OBJETIVO GENERAL

Comparar los niveles de Linfocitos T CD8+CD57+CD103+ efectoras y las células T regs CD4+CD25+FOXP3+ en pacientes con Orbitopatía tiroidea activa, inactiva y controles, así como su correlación con la clasificación VISA.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Reclutar pacientes voluntarios con Diagnostico de Enfermedad de Graves y Orbitopatía Tiroidea
- 2) Obtener muestras de suero de pacientes voluntarios con Diagnostico de Enfermedad de Graves y Orbitopatía Tiroidea activa o inactiva.
- 3) Determinar las concentraciones de las células efectoras (CD8+CD57+CD103+) y reguladoras (CD4+CD25+FOXP3+) empleando citometría de flujo.
- 4) Correlacionar los niveles de las células efectoras (CD8+CD57+CD103+) y reguladoras (CD4+CD25+FOXP3+) con la puntuación obtenida en la clasificación VISA.
- 5) Determinar mediante el análisis estadístico de prueba ANNOVA las posibles diferencias significativas entre los niveles de células T efectoras y reguladoras.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Prospectivo, transversal y comparativo.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con diagnóstico de Orbitopatía tiroidea por Graves, ya sea por perfil tiroideo o por anticuerpos antitiroideos.
- Pacientes con o sin actividad inflamatoria.
- Controles sanos

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con conjuntivitis alérgica o infecciosa que puedan enmascarar algún cuadro de actividad tiroidea.
- Pacientes con alguna otra enfermedad inflamatoria autoinmune.
- Pacientes con enfermedades crónico-degenerativas
- Pacientes con alguna otra enfermedad oftalmológica

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Muestra insuficiente o condiciones relativas al procesamiento inadecuado de la muestra (suero).

METODOLOGÍA

Todos los materiales, reactivos y equipos usados en la presente fueron proporcionados por el Departamento de Inmunología del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. Los estudios de diagnóstico fueron realizados con cargo al paciente (ver Anexo 1)

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se incluyeron 10 pacientes por grupo de estudio. En total se incluyeron 30 pacientes en el estudio. De acuerdo a los resultados obtenidos la muestra poblacional se podría ampliar para incrementar la significancia estadística del análisis.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

A los pacientes que participaron en este estudio se les tomó muestra de suero ANEXO II (CONSENTIMIENTO INFORMADO) bajo consentimiento informado. Este estudio fue realizado de acuerdo a las normas de Declaración de Helsinki.

VARIABLES DEL ESTUDIO

Las variables independientes del estudio fueron el sexo y edad de los pacientes, la agudeza visual misma que fue tomada con cartilla de Snellen con y sin estenopeico. Se reportó en escala logMAR para los datos demográficos del estudio, además de exoftalmometría de Hertel.

El puntaje total de la estadificación del VISA: fue medido por un mismo especialista en Orbitopatía distiroidea, y se realizó durante la primera visita.

La concentración de Linfocitos efectores (CD8+CD57+CD103+) y reguladores (CD4+CD25+FOXP3+): fueron obtenidos por Inmunofluorescencia y Citometría de flujo.

PACIENTES CON ORBITOPATÍA DE GRAVES

A todos los pacientes con Orbitopatía de Graves (OG), con diagnóstico confirmado por estudio de laboratorio para enfermedad distiroidea como hormonas tiroideas y anticuerpos antitiroideos, se les realizó una revisión oftalmológica completa, incluyendo una agudeza visual, exploración biomicroscópica, presión intraocular, gonioscopía, fundoscopia bajo dilatación en una lámpara de hendidura, además de exoftalmometría de Hertel, estrabograma y prueba de visión cromática de Ishihara para su estadificación y clasificación de VISA₅ para determinar el grado de actividad y severidad de la Orbitopatía.

En base a la primera exploración se dividió a los pacientes en tres grupos: pacientes con OG activa (Grupo A), pacientes con OG inactiva (Grupo B) que no hubieran tomado terapia inmunosupresora o cualquier esteroide en un periodo de más de 6 meses de iniciado el estudio y pacientes sin patología ocular o sistémica (Grupo C). Cada grupo contó con quince voluntarios informados.

A todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión se les solicitó en forma libre u voluntaria su participación en el estudio, la cual se hizo oficial mediante la firma de un Formato de Consentimiento Informado (Anexo 1). Posteriormente a todos los pacientes se les tomó la muestra de sangre periférica necesaria para realizar el análisis de citometría de

flujo e inmunofluorescencia y determinar la presencia de Linfocitos efectores (CD8+CD57+CD103+) y reguladores (CD4+CD25+FOXP3+). Se analizaron los resultados de todos los pacientes para encontrar el diferencial entre grupos.

ANTICUERPOS MONOCLONALES Y REACTIVOS:

Los anticuerpos monoclonales IgG de ratón (mAbs) contra CD25 humano y los anticuerpos monoclonales CD57 con isotiocinato de fluoresceína etiquetados fueron comprados BD PharMingen (San Diego, CA, USA). Los mAbs anti-CD8 PE-Cy5-etiquetados, y FITC-etiquetado FOXP3 mAbs fueron obtenidos de e-Biosciences (San Jose, CA, USA). Lymphoprep (Ficoll densidad 1.077) fueron obtenidos de Nycomed Pharma (Nyegaard, Oslo, Norway).

CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA. (PBMC)

La sangre periférica total heparinizada fue diluida 1:2 en PBS (Buffer salino fosfato), pH 7.2. PBMC fueron separados en un gradiente de densidad ficoll por centrifugación a 1700 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, la interfase celular fue recolectada, lavada dos veces y contada utilizando un hemocitómetro para obtener la viabilidad por tinción de azul de trípamo.³²

TINCIÓN DE INMUNOFLORESCENCIA DE LOS MARCADORES DE LA SUPERFICIE CELULAR

Se realiza doble o triple tinción sobre las células PMN por inmunofluorescencia, utilizando mAbs etiquetados con PE-Cy5 contra CD4 o CD8 humano y mAbs etiquetados FITC contra anti-CD 57, o mAbs etiquetados con PE-Cy5 contra CD 25 humano.

Por corto periodo de tiempo se suspenden 2×10^5 células en 20 microlitros de PBS suplementado con 0.2% de albúmina sérica bovina y 0.2% de Ácida Sódica (PBA), e incubada con Anticuerpos monoclonales etiquetados con fluorocromo por 30 minutos a 4° C. Posterior a la incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBA, fijadas en formaldehído al 1% y analizadas por citometría de flujo. Las PBMC se tiñeron con mAbs contra CD4-PECy5 y CD25-PE y fueron fijadas con formaldehído al 4% en PBS por 10

minutos a 4°C para ser procesadas por tinción de inmunofluorescencia de las proteínas intracelulares.³³

TINCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA DE PROTEÍNAS INTRACELULARES.

Después de fijar las células en formaldehído al 4%, se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizaron con buffer saponizado (0.1% saponina y 10% de BSA en PBS) agitando suavemente por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron incubadas con mAbs etiquetados con FITC contra FOXP3 humano. En todos los casos se utilizó controles de isotipo. Después de 30 minutos, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, fijadas nuevamente con formaldehído al 1% y analizadas por citometría de flujo.

ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se obtuvieron 5000 eventos utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, CA, USA) y analizados con BD CellQuest Pro software. Para analizar el marcador teñido en la superficie de las células, se trazó una puerta alrededor de la población linfocitaria, basada en sus propiedades físicas (dispersión frontal y lateral) y una segunda puerta fue trazada basada en la positividad de la fluorescencia de los anticuerpos unidos a CD4 o CD8. Para analizar la tinción intracelular, una tercera puerta fue trazada en las CD4 marcadas basada en la positividad de la fluorescencia de CD25. Los datos son presentados en histogramas y gráficas de puntos en dos dimensiones. La tinción del fondo fue 1% y fue sustraída de los valores experimentales.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron empleando la prueba de U Mann Whitney para detectar diferencias significativas entre grupos. Se realizó una prueba de Spearman para determinar el coeficiente de correlación entre variables analizadas. Se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con ayuda del Programa GRAPHPADPRISM 5.0.

RESULTADOS

Pacientes reclutados

Se reclutaron un total de 30 pacientes, 10 pacientes por grupo, de los cuales se excluyeron 6 pacientes por alteraciones durante la toma de la muestra y procesamiento de los resultados. Se incluyeron 9 pacientes en el grupo 1 de OG sin Actividad, 7 pacientes en el grupo 2 de OG con Actividad y 8 pacientes en el grupo Control pareados por edad y sexo a los otros dos grupos.

De los 24 pacientes, 87.5 % (n=21) fueron mujeres y 12.5 % (n=3) de los pacientes fueron hombres, con un rango de edad de 14 a 71 años, una media de 39 años de edad. Los datos demográficos se resumen en la Figura 3.

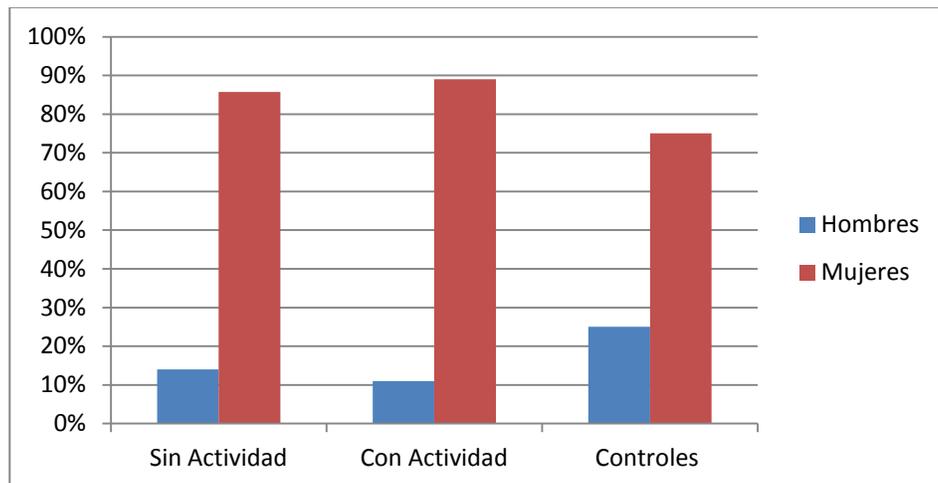


Figura 3. Pacientes reclutados para el estudio de Orbitopatía de Graves.

Clasificación VISA

De acuerdo a la clasificación VISA, en cada grupo, cada paciente obtuvo una calificación según el grado de inflamación, presencia de estrabismo y/o restricción muscular y apariencia.

El grupo 1 (Orbitopatía Sin actividad) tuvo una media de 1.8 con un intervalo de 0 a 3. El grupo 2 (Orbitopatía Con actividad) tuvo una media de 5.8 con un intervalo de 4 a 9. En el grupo 3 (Control), ningún paciente presentó datos de inflamación o estrabismo. Estos datos se muestran en la Figura 4.

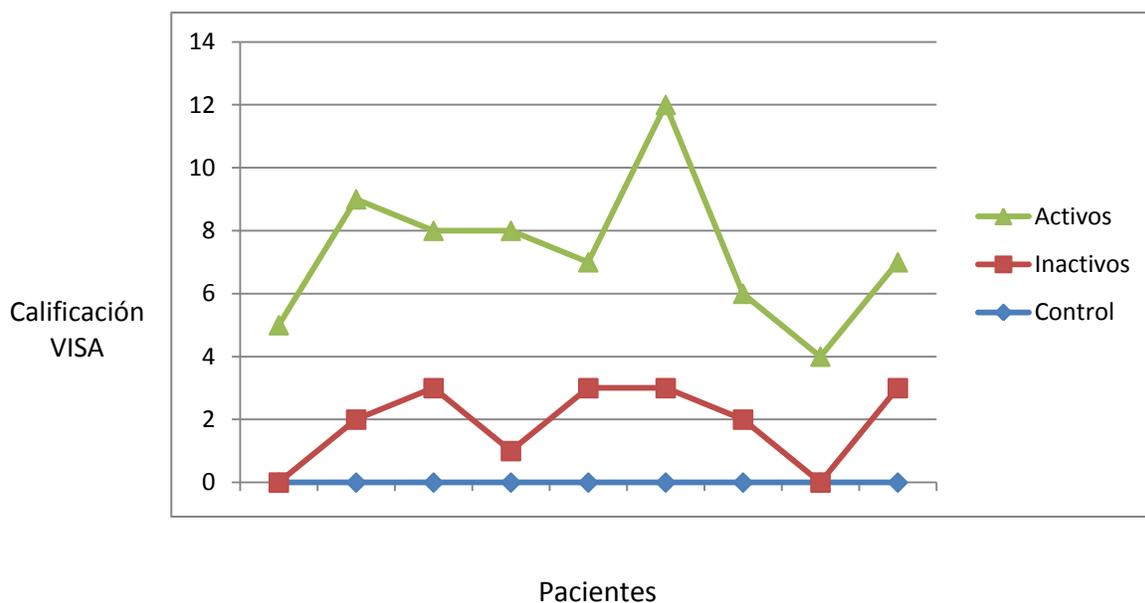
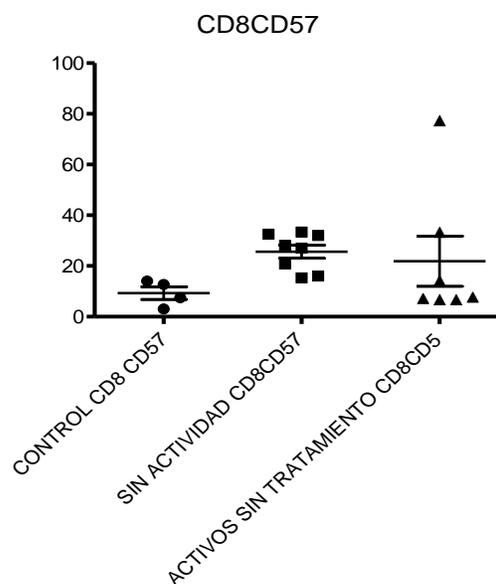


Figura 4. Puntaje de la Clasificación VISA según grupo de estudio.

Al realizar la comparación entre la determinación de linfocitos CD8+CD57+ en el grupo control contra el grupo de Orbitopatía sin actividad se observó una diferencia estadísticamente significativa con una $p=0.002$, sin embargo entre ambos grupos de Orbitopatía no hubo una diferencia significativa, así como tampoco la hubo entre el grupo control y el grupo de Orbitopatía Activa. (Figura 5).

Figura 5. Determinación de linfocitos CD8+CD57, por citometría de flujo, en los tres grupos experimentales: Control, Sin Actividad, Activos sin tratamiento.



Sin embargo no se encontraron diferencias entre los grupos en la población de linfocitos CD8+CD103+. (Figura 6)

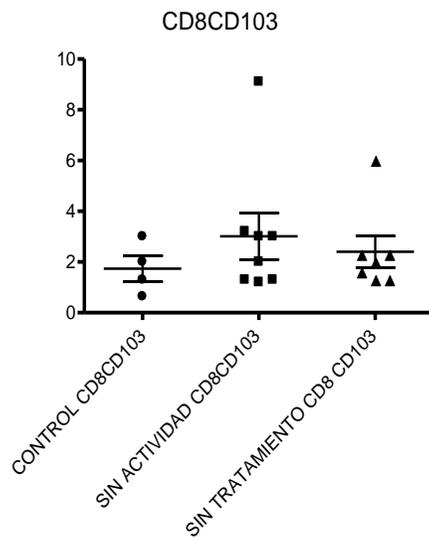
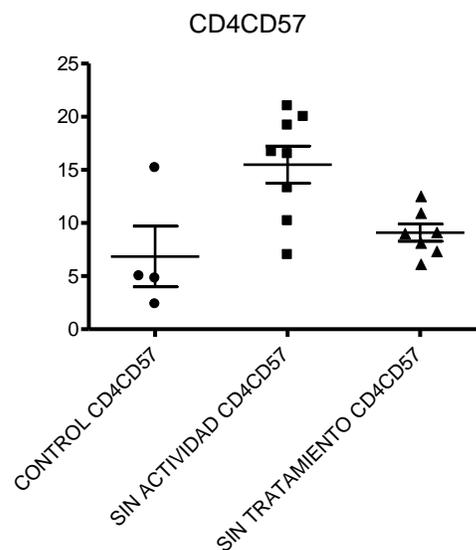


Figura 6. Determinación de linfocitos CD8+CD103+ por citometría de flujo.

También se observó una diferencia significativa en la población de linfocitos T CD4+CD57+ en el grupo control comparado con el grupo de Orbitopatía Sin Actividad ($p=0.014$) y una diferencia a su vez significativa del grupo de Orbitopatía sin actividad contra el grupo con Actividad ($p=0.010$) (Figura 7).

Figura 7. Determinación de linfocitos T CD4+CD57+, por citometría de flujo.



En la determinación de las poblaciones de Linfocitos T CD4+CD25+FOXP3+ no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos. (Figura 8)

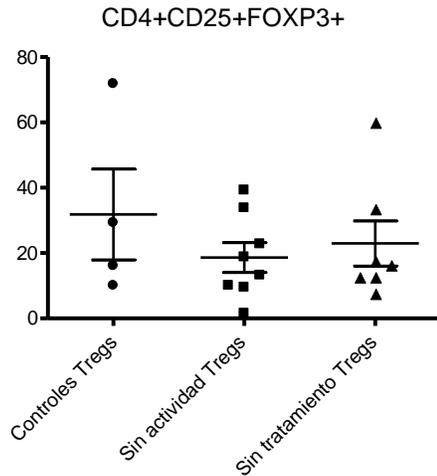
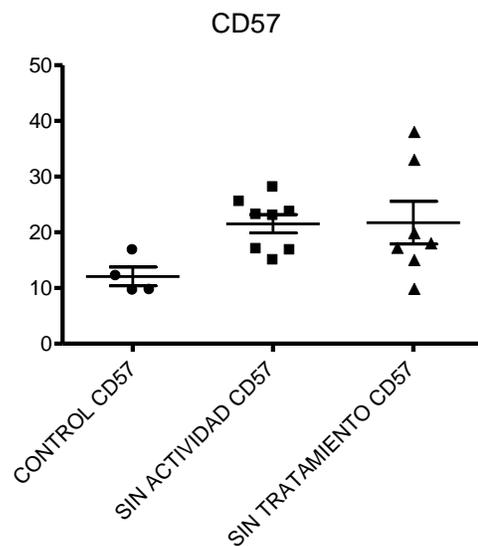


Figura 8. Determinación de linfocitos T CD4+CD25+FOXP3+ por citometría de flujo.

Por último, en la Figura 9 se muestra el análisis de la población de linfocitos T CD57+, en el cual para el grupo con actividad sin tratamiento se encontró un aumento significativo ($p=0.021$) comparado con el grupo control, al igual que en el grupo de Orbitopatía sin actividad comparado con el grupo control ($p=0.0086$).

Figura 9. Determinación de linfocitos T CD57+, por citometría de flujo.



En la Tabla 4 se realiza la correlación de la clasificación VISA con las poblaciones de Linfocitos T reguladores y Linfocitos T Efectores de Memoria.

Tabla 4. Correlación del VISA vs Poblaciones Linfocitarias

Grupos	VISA	CD4+ (%)	CD8+ (%)	CD57+	CD4+ CD25+	CD8+ CD103+	CD8+ CD57+	CD4+ CD57+	CD4+ CD25+ FOXP3+
sin Actividad	1.8	44.6	21.85	18.66	21.25	1.87	26.53	15.48	19.03
Con Actividad	5.8	37.88	28.41	21.74	17.21	2.11	21.87	9.1	22.94
Control	0	40.62	20.33	12.07	17.37	1.88	9.29	6.84	29.3

DISCUSIÓN

La enfermedad de Graves es un padecimiento órgano-específico en el que se presentan diversos mecanismos que producen un desequilibrio inmunológico, entre las manifestaciones de éste desequilibrio se encuentra la Orbitopatía.

Se han realizado cada vez más estudios que relacionan a las células T reguladoras con ésta patología. Se sabe que las células T reguladoras CD4+CD25+ están involucradas en el control y modulación de la tolerancia inmunológica del organismo, y que su disminución o alteración funcional puede ser la causa primaria del desarrollo de enfermedades autoinmunes ³⁴. Así mismo en modelos murinos se ha reportado que las células T reguladoras CD4+CD25+ son capaces de transferir protección contra enfermedades autoinmunes órgano-específicas, suprimiendo la proliferación de otras células T después de la estimulación policlonal *in vitro* por medio del contacto celular y la liberación de diversas citocinas ³⁵. También se ha reportado en modelo murino la presencia de un desequilibrio entre las células T reguladoras y las células T efectoras en la enfermedad de Graves ²⁸.

En un estudio previo realizado en el Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” se encontró la presencia de un incremento significativo de producción de TGF- β en pacientes con Orbitopatía tiroidea activa clínicamente, dicha citocina es importante para favorecer

o inhibir la diferenciación de linfocitos Th17, por lo tanto sugieren que su aumento podría explicar la actividad o no de la enfermedad ³⁶.

En nuestro estudio, se corroboró primero que la relación hombre: mujer de nuestra muestra coincide con la literatura, en la que se destaca una mayor prevalencia de enfermedades autoinmunes en el género femenino.

También, en nuestro estudio, no se observaron diferencias entre los grupos en las poblaciones de linfocitos T CD4+CD25+ (reguladores), lo cual sugiere que no existe una disminución en la cantidad de éstas células, pero si puede haber una depleción en la función de las mismas, lo cual requiere de estudios funcionales para ser corroborado.

Tampoco se evidenció una diferencia entre los grupos de estudio en la población de linfocitos T efectores CD8+CD103+, sin embargo el análisis de linfocitos T CD57+, demostró un aumento en ambos grupos con Orbitopatía tiroidea, además de que también se presentó un aumento de linfocitos CD8+CD57+ en ambos grupos de Orbitopatía, lo cual va de acuerdo con la afirmación de que un mayor número de células efectoras de memoria propicien el desarrollo de un desequilibrio inmunológico, sin embargo no se relacionan con el grado de actividad puesto que entre éstos grupos no hubo una diferencia entre dichas poblaciones.

Por lo tanto se sugiere que los cambios clínicos puedan estar relacionados con la actividad y frecuencia de las células efectoras, además de las citocinas producidas por las mismas; sin embargo, se requieren estudios funcionales para corroborar los hallazgos.

La población de linfocitos T CD4+CD57+ únicamente se mostró incrementada en los pacientes con Orbitopatía sin actividad, esto se traduce en un aumento de las células T reguladoras en estos pacientes para poder compensar el desequilibrio inmunológico presentado y al disminuir nuevamente esta población en los pacientes con la enfermedad se manifestaría como actividad de la misma, lo que va de acuerdo a los resultados obtenidos.

Al realizar la correlación clínica del puntaje obtenido en la clasificación VISA en cada grupo de estudio, podemos observar que a mayor puntaje en el VISA mayor porcentaje de células T CD8+, mayor cantidad de células CD57+ y aunque no directamente proporcional

si se correlaciona el grado de actividad con un menor porcentaje de Linfocitos CD4+. Así mismo se pudo corroborar que en los pacientes con enfermedad de Graves pero sin actividad de la Orbitopatía, es decir un menor puntaje en el VISA, tuvieron un aumento de las células T reguladoras CD4+CD25+ y CD4+CD57+, lo cual coincide con otros autores en explicar que su depleción pudiera correlacionarse con una presentación clínica más severa y viceversa. En este trabajo se observó que las células CD4+CD25+FOXP3+ en ambos grupos de pacientes con Orbitopatía se encontraban disminuidas independientemente del valor en el VISA.

Existen diversos estudios que han comparado los pacientes con actividad de Orbitopatía tiroidea bajo tratamiento esteroideo y pacientes sin tratamiento, encontrando un incremento en las células CD4+CD57+ y CD25+FOXP3+ lo cual proponen se traduce en una regulación inmunológica posterior a la utilización de esteroides como la dexametasona ¹⁶.

Nuestros resultados proponen que las células CD4+CD57+ en éstos casos tengan una función de regulación y las células T CD8+CD57+ una función bimodal, según el estadio de la enfermedad, ya sea como células efectoras en pacientes inactivos y células supresoras en pacientes activos, como lo demostrado en estudios previos ¹⁶.

CONCLUSIONES

Como resultado de la investigación realizada se presentan las siguientes conclusiones, las cuales validan las Hipótesis planteadas al inicio:

- Existe una diferencia significativa entre las concentraciones de Linfocitos T efectores entre los pacientes con y sin enfermedad de Graves, así como una diferencia significativa en las concentraciones de Linfocitos T reguladores entre los pacientes con Orbitopatía activa e inactiva y los pacientes sin enfermedad de Graves.

- Existe una correlación entre la clasificación clínica VISA y las concentraciones de poblaciones linfocitarias puesto que: a mayor concentración de linfocitos T CD8+ y T CD57+, mayor puntaje en la clasificación VISA y a mayor concentración de Linfocitos T CD4+CD25+ y CD4+CD57+ menor puntaje en la clasificación VISA en los pacientes con Orbitopatía de Graves.

ANEXO 1.

FINANCIAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

Los pacientes financiaron los estudios complementarios (Laboratorios) que se necesitaron para llevar a cabo el diagnóstico de su patología y el tratamiento (metilprednisolona) de la misma, de la manera convencional en el protocolo del resto de los pacientes con Orbitopatía de Graves.

Se solicitó ayuda financiera al departamento de inmunología del Instituto de oftalmología Conde de Valenciana, para realizar el análisis por inmunofluorescencia y citometría de flujo para la determinación de los linfocitos efectores y reguladores en sangre periférica en los tres grupos del estudio.

DECLARACION DE CONFLICTO DE INTERESES DE LOS INVESTIGADORES

No existe ningún conflicto de interés por parte de ninguno de los investigadores, para la realización de este estudio clínico, experimental.

Financiación para reuniones y congresos, asistencia a cursos (inscripciones, bolsas de viajes, NO alojamiento...)

Honorarios como ponente (conferencias, cursos...)	NO
Financiación de programas educativos o cursos (contratación de personal, alquiler de instalaciones...)	NO
Financiación por participar en una investigación	NO
Consultoría para una compañía farmacéutica/otras tecnologías	NO
Accionista o con intereses comerciales en una compañía (patentes...)	NO
Intereses económicos en una empresa privada relacionada con la salud (como propietario, empleado, accionista, consulta privada...), que puede ser significativo en relación a la autoría de la guía	NO
Conflictos de intereses de índole no económico que pueden ser significativos en relación a la autoría en la guía	NO
Financiación o ayudas económicas para la creación de la unidad o servicio	NO
Dotación significativa de material a la unidad o servicio	NO
Contratación o ayudas económicas para contratar personal en la unidad o servicio	NO
Ayuda económica para la financiación de una investigación	NO
Financiación de programas educativos o cursos para la unidad	NO

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA*

Título del protocolo: Desbalance entre células efectoras de memoria (CD8+CD57+) y células T reguladoras (CD 4+CD25+FOXP3) y su correlación con la clasificación VISA en Orbitopatía de Graves en humanos.

Investigador Principal: Dra. Sandra Salazar Ramos, residente de tercer año del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. Telefono: 5442- 1700, 044 55 3901 9660

Lugar donde se realizará el estudio: Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana

Nombre del paciente: _____.

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

Se realizará un estudio científico con la finalidad de saber la relación del grado de actividad y severidad clínica y las células linfocitos efectores y reguladores, así como su diferencia entre pacientes con y sin tratamiento, para la mejor comprensión de la patología y su posible terapéutica.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivos

Investigar la asociación entre las células linfocitarias efectoras y reguladoras y la enfermedad de Orbitopatía Tiroidea activa e inactiva y su modificación posterior al tratamiento antiinflamatorio esteroideo, además de la relación con el estadio clínico de la enfermedad.

El objetivo se llevará a cabo con la recolección de una muestra de sangre periférica y su posterior medición en el laboratorio.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y Antecedentes médicos.

Se le solicitara un estudio de laboratorio, que es solicitado a todos los pacientes que presentan Orbitopatía tiroidea, el cual pagará usted como lo realizan todos los pacientes como parte de su diagnóstico.

Posteriormente se le tomará una muestra de sangre periférica por personal calificado para el análisis de la misma en el laboratorio en el departamento de inmunología del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, la cual no tendrá ningún costo extra.

MOLESTIAS O RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio consta de las siguientes fases:

La primera fase: Revisión oftalmológica en el departamento de oculoplástica, con la realización de evaluación clínica según la clasificación clínica de la enfermedad y confirmación del diagnóstico de Orbitopatía de Graves.

Segunda fase: Se les realizará un análisis celular de sangre para lo cual se tomará una muestra de sangre periférica en el departamento de inmunología del Conde de Valenciana.

Puede haber efectos secundarios por la toma de la muestra como hematoma en el sitio de la herida, dolor local, mareo, debilidad, entre otros.

En caso de que usted desarrolle algún efecto secundario a la toma de la muestra será tratado en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana.

BENEFICIOS QUE PUEDE OBTENER DEL ESTUDIO

En estudios realizados anteriormente por otros investigadores donde se ha observado que existe una diferencia entre los linfocitos efectores y reguladores entre los pacientes sanos y los pacientes con Orbitopatía de Graves, sin embargo no se ha hecho la correlación clínica, por lo tanto podría cambiar la comprensión de ésta enfermedad, mejor conocimiento de la patogenia y proponer nuevas formas de tratamiento.

Con este estudio conocerá de manera clara si la actividad y severidad clínica se relaciona con la actividad celular sanguínea en la Orbitopatía de Graves.

Este estudio permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido del estudio celular y las opciones terapéuticas planteadas para la patogenia.

ACLARACIONES:

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria
- En el proceso del estudio usted podrá solicitar información sobre cualquier pregunta y/o aclaración de cualquier duda acerca de los procedimientos riesgos y beneficios. Si requiere ampliar información sobre su participación en el estudio puede comunicarse al Comité de Ética en Investigación, al teléfono 54421700 ext. 3212 con la Lic. Edith Romero Chávez
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo manifestar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. Sin que esto cree perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- El investigador tiene la obligación de proporcionarle información actualizada sobre los avances del estudio.
- En caso de requerir información adicional
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
- No recibirá pago por su participación
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación a participar en este estudio.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la
Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la

información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicado o difundidos con fines científicos.

Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante o del padre o tutor

Fecha:

Testigo 1

Nombre:

Parentesco:

Fecha:

Domicilio:

Testigo 2:

Nombre:

Parentesco:

Fecha:

Domicilio:

Esta parte debe ser completada por el investigador (o su representante):

He explicado al Sr (a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y

beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda.

Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Firma del investigador:

Fecha:

Bibliografía

1. Garrity JA, Van RS, Pathogenesis of Graves Ophthalmopathy: Implications for prediction, prevention and Treatment. *AM J of Ophthalmology* 2006; 142: 147-153.
2. Gianoukakis AG, Khadavi N, Smith TJ, Cytokines, Graves' disease, and thyroid associated ophthalmopathy. *Thyroid*, 2008; 18: 953-8.
3. Young, P., Finn, B. C., Bruetman, J. E.. La enfermedad de Graves, signos y síntomas. *An. Med. Interna, Madrid*, v. 24, n. 10, oct. 2007.
4. Longo, DL. *Harrison Principios de Medicina Interna* ed18. Mc Graw Hill, 2012, pp 2911-39.
5. Mouritis, M et al. Clinical activity score as a guide in the management of patients with Graves' ophthalmopathy. *Clinical Endocrinology*, 1997; 47(1): 9-14.
6. Bartalena, L. Declaración de consenso del Grupo europeo sobre la orbitopatía de Graves (EUGOGO) sobre el tratamiento de la orbitopatía de Graves (OG). *Eur J Endocrinol*. 2008;158:273-85 [*Thyroid*. 2008;18:281-2].
7. Dolman, PJ & Rootman J. VISA Classification for Graves orbitopathy. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2006 Sep-Oct;22(5):319-24.
8. Heufelder AE & Bahn RS. Detection and localization of cytokine immunoreactivity in retro ocular connective tissue in Graves ophthalmopathy. *Eur J Clin Invest* 1993; 23 (1):10-9.
9. Sun Z, Zhong W, Lu X, Shi B, Zhu Y, Chen L, Zhang G, Zhang X. Association of Graves' disease and prevalence of circulating IFN-gamma-producing CD28) T cells. *J Clin Immunol* 2008; 28:464-72.
10. Ponto KA et al. Clinical Relevance of Thyroid-Stimulating Immunoglobulins in Graves' Ophthalmopathy. *Ophthalmol* 2011; 118(11):2279-85.
11. Vibhavari M, Naik MD, Milind N Naik MD et al, Immunopathogenesis of Thyroid Eye Disease: Emerging Paradigms, *Sur Ophthalmology* 55 (3) May June 2010 pp 215-225.
12. Strioga, M, Pasukoniene, V, Characiejus, D. CD8⁺ CD28⁻ and CD8⁺ CD57⁺ T cells and their role in health and disease. *Immunology* 2011; 134, 17-32.

13. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004; 114: 1198-1208.
14. Hernández-Ruiz, J, Becker, I. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. *Salud Pública Méx* 2006; Vol. 48(5):430-439.
15. Díaz Martín, A. Prieto Martín, M. Úbeda Cantera, M. Álvarez-Mon Soto, Linfocitos T, *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, Volume 11, Issue 28, March 2013, Pages 1699-1709.
16. García Jiménez, Tovilla Canales, Maria C Jiménez Martínez, Determinación de la frecuencia de linfocitos T reguladores y efectores en pacientes con oftalmopatía de Graves *Rev Mex Oftalmol*; Julio- Agosto 2009; 83 (4): 209-213
17. Weetman AP, Yateman ME, Ealey PA et al. Thyroid stimulating antibody activity between different immunoglobulin G subclasses. *J Clin Invest*. 1990; 86 (3): 723-7.
18. Hufnagel TJ, Hickey WF, Cobbs WH et al, Immunohistochemical and ultrastructural studies on the exenterated orbital tissues of a patient with Graves disease. *Ophthalmology*. 1984; 91: 1141-9.
19. Han R, Smith TJ, T Helper type 1 and type 2 cytokines exert divergent influence on the induction of prostaglandin E2 and synthesis by Interleukin 1 beta in orbital fibroblasts: implications for the pathogenesis of thyroid associated opthalmopathy, *Endocrinology*. 2006; 147 (1): 13-9.
20. Coles AJ, Wing M, Smith S et al. Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis. *The Lancet* . 1999; 354 (9191): 1691-5.
21. Focosi D, Bestagno, M. CD57⁺ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J. Leukoc. Biol.* 87: 107–116; 2010
22. Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. CD28⁺ T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol* 2009; 30:306–12.
23. Yamada H, Kaibara N, Okano S, Maeda T, Shuto T y cols. Interleukin-15 selectively expands CD57⁺ CD28⁻ CD4⁺ T cells, which are increased in active rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* 2007;124(3):328-335.

24. Yu, Q. and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14,163 -176.
25. Cytokines and cells pathfinder encyclopaedia, Horst Ibelgaufts COPE ver 31.4 (2013).
26. Taipale, J., Miyazono, K., Heldin, C. H. and Keski-Oja, J. (1994). Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J. Cell Biol.* 124,171 -181
27. Jameson JL, Weetman AP, Disorders of the thyroid gland, *Harrisons Principles of internal medicine*, New York, Mc Graw Hill, 2001, pp 2060-71.
28. Saitoh O, Nagayama Y. Regulation of Graves Hyperthyroidism with Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Mouse Model. *Endocrinology* 2006; 147: 2417-2422.
29. Ginhoux, F et al. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med.* Vol. 206 No. 13 3115-3130. Dec 2009.
30. Jiao Z, Bedoui S, Brady JL, Walter A, Chopin M, et al. The Closely Related CD103+ Dendritic Cells (DCs) and Lymphoid-Resident CD8+ DCs Differ in Their Inflammatory Functions. *PLoS ONE*, 2014; 9(3): e91126.
31. Jameson JL, Weetman AP, Disorders of the thyroid gland, *Harrisons Principles of internal medicine*, New York, Mc Graw Hill, 2001, pp 2060-71.
32. Fisher M. Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from whole blood and subsequent culture of macrophage cells. Roslin Institute Hume Macrophage Lab (2011). <http://www.macrophages.com/isolation-peripheral-blood-mononuclear-cells-pbmcs-whole-blood-and-subsequent-culture-macrophage-cel>
33. Hernández-Ramírez D & Cabiedes J. Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatol Clin.* 2010;6(3):173–177.

34. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann Rev Immunol* 2004; 22: 531-562.
35. Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4(+)cd25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 2001; 31:1247-1254.
36. Pérez Triana Berenice, Jiménez Martínez Ma.Carmen, Robles Contreras Atzín. Cambios de la Concentración de Interleucina 17 y Factor de Crecimiento Tumoral Beta en pacientes con Orbitopatía de Graves. Tesis de Licenciatura. Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana IAP. México, DF. Agosto 1999.